



**HAL**  
open science

# **Nouvelles altérations métaboliques des cancers bronchiques non à petites cellules : rôle de l'efflux du cholestérol et de la mitophagie**

Emma Guilbaud

## ► To cite this version:

Emma Guilbaud. Nouvelles altérations métaboliques des cancers bronchiques non à petites cellules : rôle de l'efflux du cholestérol et de la mitophagie. Biologie cellulaire. Université Côte d'Azur, 2021. Français. ⟨NNT : 2021COAZ6021⟩. ⟨tel-03767538⟩

**HAL Id: tel-03767538**

**<https://theses.hal.science/tel-03767538v1>**

Submitted on 2 Sep 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

# THÈSE DE DOCTORAT

## Nouvelles altérations métaboliques des cancers bronchiques non à petites cellules

Rôle de l'efflux du cholestérol et de la mitophagie

**Emma GUILBAUD**

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)

**Présentée en vue de l'obtention  
du grade de docteur en** Sciences de la  
Vie et de la Santé, Recherche Clinique et  
Thérapeutique **d'Université Côte d'Azur**  
**Dirigée par :** le Dr. Laurent YVAN-  
CHARVET et le Dr. Stoyan IVANOV  
**Soutenue le :** 19 Octobre 2021

**Devant le jury, composé de :**  
Pr. Paul HOFMAN, PU-PH, LPCE Nice  
Dr. Sandrine MARCHETTI, CR, C3M Nice  
Pr. Catherine MULLER, PU-PH, IPBS Toulouse  
Dr. Rodrigue ROSSIGNOL, DR, MRGM Bordeaux  
Dr. Flavie STRAPPAZZON, CR, IRCCS Rome  
Dr. Laurent YVAN-CHARVET, DR, C3M Nice



# Nouvelles altérations métaboliques des cancers bronchiques non à petites cellules :

## Rôle de l'efflux du cholestérol et de la mitophagie

### **Jury :**

#### **Président du jury :**

Pr. Paul HOFMAN, PU-PH, LPCE (Nice, France)

#### **Rapporteurs :**

Pr. Catherine MULLER, PU-PH, IPBS (Toulouse, France)

Dr. Rodrigue ROSSIGNOL, DR, MRGM (Bordeaux, France)

#### **Examineurs :**

Dr. Flavie STRAPPAZZON, CR, IRCCS (Rome, Italie)

Dr. Sandrine MARCHETTI, CR, C3M (Nice, France)



## RESUME

---

Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC), représentant jusqu'à 85% des cas de cancer de poumon, est la principale cause de décès par cancer dans le monde. La majorité des patients sont diagnostiqués à un stade avancé de cancer et malgré les progrès thérapeutiques, le taux moyen de survie à 5 ans est d'environ 20%. De ce fait, une meilleure compréhension de la biologie des cellules cancéreuses et l'exploration des vulnérabilités des CBNPC devraient ouvrir de nouvelles voies pour le développement de stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte, je me suis intéressée aux altérations métaboliques des CBNPC.

Ma première étude s'est portée sur le rôle de l'efflux cellulaire du cholestérol durant le développement des CBNPC. Les lipoprotéines de haute densité (HDLs), principalement constituées de l'apolipoprotéine A-I (ApoA-I) sont impliquées dans le processus d'efflux cellulaire du cholestérol dans lequel les HDLs épurent le cholestérol en excès des cellules des tissus périphériques. Ce processus implique un transport actif du cholestérol médié par les transporteurs membranaires ABC de types A1 et G1 (ABCA1 et ABCG1). Grâce à l'utilisation d'un modèle murin de cancer du poumon ( $CCSP^{CRE-ERTM/+};Kras^{G12D/+}$ ), nous avons pu mettre en évidence que l'inactivation spécifique des transporteurs ABCA1 et ABCG1 dans les cellules cancéreuses augmente la taille des lésions tumorales pulmonaires, ainsi que l'infiltration immunitaire vers un profil permissif. A l'inverse, l'augmentation des taux des HDLs plasmatiques grâce à la surexpression de l'ApoA-I permet d'une part de limiter l'accumulation du cholestérol pulmonaire, mais également de diminuer le développement d'adénocarcinome induit par la mutation KRAS<sup>G12D</sup>. En effet, l'efflux cellulaire du cholestérol réduit l'activation des voies de signalisation de survie des cellules cancéreuses *in vivo*, diminuant ainsi l'expansion cellulaire. De plus, nous avons montré que l'élimination du cholestérol membranaire à l'aide de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine induit la régression des adénocarcinomes pulmonaires établis. Les perturbations locales et systémiques des voies d'efflux du cholestérol ont été confirmées chez les patients atteints de CBNPC. Nos résultats positionnent la thérapie d'élimination du cholestérol comme une cible métabolique potentielle afin de réduire le développement des CBNPC.

Ma seconde étude consista à élucider le rôle de la mitophagie durant le développement des CBNPC. L'élimination sélective des mitochondries endommagées par la machinerie de l'autophagie est cruciale afin de réguler l'activité des mitochondries, un processus appelé mitophagie. La voie de mitophagie la mieux caractérisée implique la kinase PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) et l'E3 ubiquitine ligase PARKIN. Nous avons alors exploré le rôle de la mitophagie médiée par PINK1 dans la lignée cellulaire de cancer du poumon LLC-1 et la lignée cellulaire dérivée d'adénocarcinome de souris  $Kras^{G12D/+};p53^{-/-}$  (KP) *in vitro* et *in vivo*. Dans un premier temps, nous avons démontré *in vitro* la capacité des cellules LLC-1 et KP à éliminer les mitochondries endommagées par la mitophagie, nécessitant la formation des

autophagosomes par la protéine ATG7 (*autophagy related 7*). Nous avons également pu mettre en évidence que les dommages mitochondriaux des cellules LLC-1 et KP stabilisent et activent PINK1, mais pas PARKIN, qui n'est pas exprimée dans ces cellules. Nous avons finalement observé que la perte de PINK1 dans les tumeurs implantées chez des souris immunocompétentes, tout comme de la perte d'ATG7, augmente la croissance des tumeurs LLC-1. D'un point de vue mécanistique, la production de cytokines inflammatoires est diminuée dans les tumeurs déficientes pour PINK1, ce qui entraîne une réduction de l'infiltration des neutrophiles. Ces résultats suggèrent que la mitophagie dépendante de PINK1 contribue au contrôle de la croissance des tumeurs pulmonaires, notamment en modulant la réponse immune anti-tumorale.

**Mots clefs :** Cancer du poumon, Efflux du cholestérol, ABCA1/ABCG1, Mitophagie, PINK1

## ABSTRACT

---

Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide, with non-small cell lung cancer (NSCLC) accounting for up to 85% of all cases. Most of patients are diagnosed with late-stage lung cancer and despite recent advances in effective therapies such as targeted therapies and immunotherapies, the average 5-year survival rate is around 20%. Therefore, a better biological insights of cancer cells to exploit their vulnerabilities are essential to improve potential therapeutic targets and patient outcome. In this context, I got interested in metabolic alterations in NSCLC.

First, I focused on the role of cholesterol efflux pathways during NSCLC development. High density lipoproteins (HDLs), mainly consisting of apolipoprotein A-I (ApoA-I), are involved in the process of cellular cholesterol efflux. HDLs remove cholesterol excess from peripheral tissue cells by active cholesterol transport, mediated by ABC transporters ABCA1 and ABCG1. Using a mouse model of lung-tumor bearing KRAS<sup>G12D</sup> mutation (*CCSP<sup>CRE-ERTM/+</sup>;Kras<sup>G12D/+</sup>*), we identified that disruption of cholesterol efflux pathways by specific inactivation of *Abca1* and *Abcg1* in cancer cells promoted a pro-tolerogenic tumor microenvironment and tumor growth. Overexpression of the apolipoprotein A-I, to raise HDL levels, limited the cholesterol lung retention and protected these mice from tumor development and dire pathologic consequences. Cholesterol removal therapy with methyl- $\beta$ -cyclodextrin inhalation also reduced tumor burden in progressing tumor by suppressing the proliferation and expansion of epithelial progenitor cells of tumor-origin. Local and systemic perturbations of cholesterol efflux pathways was confirmed in human lung adenocarcinoma. Our results position cholesterol removal therapy as a putative metabolic target in lung cancer progenitor cells.

Next, I studied the role of mitophagy during NSCLC development. The selective elimination of damaged mitochondria by the machinery of autophagy is crucial to regulate mitochondrial activity, a process called mitophagy. The most-characterized mitophagy pathway relies on the PTEN-induced kinase 1 (PINK1) and the ubiquitin E3 ligase PARKIN. Hence, we explored the role of PINK1-mediated mitophagy in two murine lung cancer cell lines, LLC-1 and tumor-derived cell line from *Kras<sup>G12D/+</sup>;p53<sup>-/-</sup>* mouse (KP), *in vitro* and *in vivo*. First, we demonstrated *in vitro* the ability of two murine lung cancer cell lines, LLC-1 and KP cells, to remove damaged mitochondria by mitophagy following mitochondrial damages. This process requires the formation of autophagosomes by the ATG7 (*autophagy related 7*) protein. We also demonstrated that mitochondrial damages in LLC-1 and KP cells stabilize and activate PINK1, but not PARKIN, which is not expressed in those cells. Finally, using immunocompetent mice, we identified that disruption of PINK1-dependent mitophagy, similar to ATG7 loss as a complete autophagy/mitophagy inhibition, significantly increased LLC-1 tumor growth *in vivo*. PINK1-deficient tumors accumulated aberrant mitochondria and reduced inflammatory cytokines production, correlating with reduction of neutrophil infiltration. Those preliminary data suggest that PINK1-dependent PARKIN-

independent mitophagy in lung cancer cells contributes to the control of lung tumor growth. We hypothesize that it may be based, at least in part, on the induction of an effective anti-cancer immune surveillance.

**Key words:** Lung cancer, Cholesterol Efflux, ABCA1/ABCG1, Mitophagy, PINK1

*À la mémoire  
du mercredi 1 mai 2019  
et du vendredi 2 octobre 2020*



## REMERCIEMENTS

---

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse. Je souhaiterais remercier le Dr. Catherine Muller et le Dr. Rodrigue Rossignol pour leur temps consacré à l'évaluation de ce manuscrit ; le Dr. Flavie Strappazon et le Dr. Sandrine Marchetti pour l'examen de ce travail de thèse ; et enfin le Pr. Paul Hofman d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je me souviens encore du jour où j'ai pris conscience du travail et du parcours à suivre pour devenir chercheur en biologie. C'était en 2010, en classe de Seconde, lors d'une présentation des métiers dans la bibliothèque du lycée. Après un baccalauréat scientifique, une licence en biologie moléculaire et génétique, un master en génétique, immunologie et développement animal, et enfin, un doctorat en recherche clinique et thérapeutique, me voilà au bout du chemin de la vie étudiante et au début de la carrière professionnelle. Je souhaite ainsi sincèrement remercier l'Université Côte d'Azur et la faculté des Sciences de Valrose, en particulier les nombreux enseignants-chercheurs, à commencer par le Dr. Christian Ghiglione, le Dr. Thomas Lamonerie, le Dr. Nicolas Glaichenhaus et bien d'autres, pour m'avoir transmis leurs connaissances et leur passion pour la recherche scientifique. J'aimerais également remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation pour avoir subventionné mon doctorat.

### ***À mes deux amies de l'IBV,***

À Sophie Polès et Aline Chessel : je n'ai eu de cesse de penser à vous durant ce doctorat, loin de la génétique et du poisson-zèbre. J'espère que vous serez fière de ce travail accompli par la scientifique que je suis devenue grâce à vous. Sophie chérie, toi qui m'as accompagnée en master durant mes premiers pas de laborantine, toi qui m'as tant appris, qui m'as fait progresser et qui a été présente pour moi dans les moments difficiles comme dans les moments de joies. Aline, je te remercie pour ce que tu m'as transmis, pour ta joie et ta bonne humeur qui ont été mon moteur au moment où j'en avais besoin, pour ta passion pour la danse que j'ai (tant bien que mal) essayé de suivre ! Je ne saurai jamais vous remercier assez de m'avoir guidé jusqu'à l'élaboration de mon doctorat.

### ***Aux membres de l'équipe 13,***

À Nathalie, que je remercie du fond du cœur, et sans qui je n'aurais pas pu réaliser ce travail. Merci pour ton aide quotidienne dans mes recherches sur mes deux projets, ainsi que pour tous tes précieux conseils en microscopie. Merci aussi pour ces pauses-café salvatrices, nos échanges, ton soutien et ta fidélité. Merci pour ta justesse, ta bienveillance, ton écoute, ta franchise, ton empathie et ta bonne humeur, qui m'ont toujours permis de trouver la force de continuer d'avancer.

À Stoyan et Rodolphe, je suis sincèrement reconnaissante de l'aide que vous m'avez apportée, de tout ce temps que vous avez consacré au projet cholestérol, de vos nombreuses participations aux sacrifices, et de ces échanges scientifiques de qualité. Vous m'avez transmis un savoir et une expertise inestimable. Rodolphe, merci de m'avoir pris sous ton aile à mon arrivée au laboratoire, de m'avoir épaulée et d'avoir cru en moi. Je n'oublierai jamais nos discussions, car « c'est tellement mystérieux le pays des larmes ». Stoyan, Rodolphe, je vous souhaite le meilleur pour la suite.

À Julie, pour ton aide et tes précieuses connaissances sur le cholestérol. Et bien que nous ayons eu des débuts difficiles, je te remercie pour ton amitié et la stabilité que tu m'as apportée. Je vous souhaite à toi et ta petite famille, la vie épanouie que tu attendais tant et que tu mérites.

À Alexandre et Thibault, merci pour vos conseils, votre aide pour la cytométrie en flux et de m'avoir aidée dans mon second projet. Alexandre, je te souhaite de bien terminer ton doctorat et de continuer à t'épanouir en sciences ! Thibault, j'espère que ton retour dans le monde scientifique te conduira à l'endroit désiré.

À Adélie et Alexia, je vous remercie pour votre temps et les différents échanges qu'on a pu avoir. J'ai été ravie de vous rencontrer, bien que déçue que nous n'ayons pas eu l'occasion de beaucoup travailler ensemble. Je vous souhaite une belle réussite !

À Johanna et Marion. A, vous m'avez grandement aidée à mon arrivée en master dans le laboratoire, merci de m'avoir encadrée et guidée.

### ***Aux membres de l'équipe 3,***

À Sonia et Pauline, mes deux amies chéries de l'équipe 3, je vous remercie pour votre aide si précieuse à la réalisation de ce projet, pour tous ces beaux moments partagés ensembles et pour tous ces jeudis verts que je ne regretterai pas. Vous avez embelli mes journées et permis de m'épanouir dans ce travail, parfois stressant bien qu'excitant. Votre bonne humeur et vos rires vont me manquer. Je vous souhaite un beau futur et de belles réussites ! ¡¡Esa chica como mola se merece una ola!!

À Johanna, je te remercie sincèrement pour toutes nos discussions professionnelles et personnelles, pour ton écoute, pour ton aide, pour tous tes conseils avisés sur le métabolisme et ton implication dans le projet mitophagie. Merci aussi de m'avoir consacré du temps, ton temps si précieux entre travail intense et vie de famille. Merci pour ce partage.

À Rachel, certains diront que tu es stricte et tendue, d'autres que tu es organisée et carrée. J'appartiens à la deuxième catégorie, et te suis reconnaissante pour l'ordre et la propreté de notre laboratoire. Je m'aventurerai à dire que sans toi, le laboratoire ne pourrait fonctionner, tant ton travail est essentiel.

À Els, merci beaucoup pour ton expertise scientifique et ton aide pour toutes nos productions de nanoblades qui ont été indispensables à notre projet. Sois tranquille, tu ne m'entendras plus parler toute seule désormais !

À Hussein, Adrien, Manuel et Adriana, je vous remercie pour votre aide dans le laboratoire, vos conseils scientifiques et techniques. Je souhaite plein de bonheur au jeune marié et beaucoup de courage aux trois futurs Docteurs !

À Ashaina, Blandine et Romain, merci de m'avoir accueilli les bras ouverts dans le laboratoire, merci de m'avoir aidée à trouver mes marques et d'avoir répondu à mes nombreuses questions. Je suis arrivée lorsque vous étiez sur le départ, mais j'ai été heureuse de pouvoir faire un bout de chemin avec vous !

### ***À mes encadrants,***

Au Dr. Laurent Yvan-Charvet. Merci Laurent de m'avoir permis d'intégrer ton équipe en master puis en thèse. Merci pour toutes les choses que tu m'as apprises, à commencer par l'expérimentation des souris et la cytométrie en flux. Je te remercie également pour la transmission de tes connaissances sur le métabolisme du cholestérol. Notre travail ensemble m'a permis de grandir et d'évoluer, en tant que chercheuse mais aussi en tant qu'individu. Il m'est difficile de trouver les mots justes pour expliquer et exprimer mes ressentis de ces dernières années. Ce fut une longue route, parfois très périlleuse, composée de hauts et de bas tels des montagnes russes, mais nous voilà au bout... De nombreuses personnes m'ont dit que le conflit entre l'élève et son maître était nécessaire, et que de cela naît des idées plus abouties et plus justes. Peut-être que nos désaccords étaient nécessaires pour arriver au bout de ce travail de doctorat. Néanmoins, je te remercie de m'avoir encadrée et accompagnée jusqu'à la fin et d'avoir rendu possible ce doctorat.

Je souhaite exprimée toute ma reconnaissance au Dr. Jean-Ehrland Ricci et au Dr. Sandrine Marchetti. Vous m'avez accordée une chance inespérée et exceptionnelle en m'intégrant dans votre équipe et travail. Je vous remercie sincèrement pour votre confiance et votre soutien. A mon tour, j'espère que mes efforts et mon travail ont comblé vos attentes. Jean-Ehr, merci de m'avoir confié ton projet mitophagie et de m'avoir fait une place à part entière parmi ton équipe. Tes conseils ont été précieux et m'ont permis de grandement progresser. Sandrine, mes mots ne seront probablement pas à la hauteur de mes pensées, mais à tes côtés, j'ai été l'étudiante en thèse la plus chanceuse. Suivre ton rythme n'a pas été chose facile au début de notre collaboration mais cela m'a énormément poussé et m'a permis de m'approprier rapidement le projet, notre projet. Tu es débordante d'énergie et pleines de ressources et je te remercie de tout ce que tu m'as appris et transmis. Merci de m'avoir soutenue et aidée tant sur le plan professionnel que sur le plan privé ; merci pour le temps consacré à la rédaction de ma thèse. La belle équipe que nous formons va grandement me manquer. Tu joues un rôle essentiel et central au sein du laboratoire, toujours prête à aider ceux qui sont dans le besoin. Avec toi, il n'y a jamais de problèmes, que des solutions. Cette philosophie de vie m'a tellement inspirée. A ton grand damne, je n'ai jamais quitté ton bureau en claquant la porte. Comment cela aurait-il été possible, avec ces magnifiques cartes d'animalerie que tu réalises ? Je te souhaite de poursuivre encore et encore, tes beaux projets, d'écrire de nombreux papiers et ton accompagnement d'étudiants qui auront la chance, comme moi, de

travailler à tes côtés. Tu es source d'inspiration, et je serai fière de devenir une chercheuse aussi grande que toi.

### ***À mes proches,***

À Maya Mando, Diane Mihajlovic et Ornella Graza, mes amies de longue date, mes meilleures amies, mes chéries depuis le début. Nous voilà devenues grandes ; qu'il semble loin le temps du lycée, de l'innocence et de la naïveté. Mais je suis tellement heureuse d'avoir traversé ces années avec vous. Vous, cheffes de projet, business developer et manager ; vous qui n'avez jamais vraiment compris pourquoi je travaillais avec des souris... Mais nos différences ont toujours fait notre force et je vous remercie pour votre soutien et d'être restées à mes côtés malgré le peu de temps dont je disposais et que je n'ai malheureusement pas pu vous consacrer.

À Gaël, toi qui as toujours été là. Tu n'imagines pas à quel point tu m'as aidée et ton soutien m'a permis de me relever de nombreuses fois sur cette route pleine d'obstacle. Ta présence m'a permis de partager tant de moments de joie. Je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté personnellement, mais également pour tout ce que tu m'as appris scientifiquement et de ton temps consacré à répondre à mes nombreuses questions sur le métabolisme : tu m'as permis de concevoir la science différemment. Gaël, à nos discussions houleuses scientifiques autour d'une bière, à toutes nos grandes questions, tous nos doutes, à nos dépressions, mais surtout, à notre passion commune pour la science et la recherche. Je te serais toujours reconnaissante.

### ***À ma famille,***

À mes grands frères et grandes sœurs, Jérémie, Sébastien, Laure-Anne et Iris, sans oublier mes beaux-frères Arnaud et Alexandre, ainsi que mes nièces chéries Eden et Aliénor. Merci pour votre soutien, votre amour, merci pour ces moments qui m'ont toujours redonné la force de continuer. Je suis si fière de vous, de vos parcours, de ce que vous accomplissez et construisez. Fallait que je vous dise, parce que parfois les mots ne sortent pas, comme je vous aime. À mes parents Mireille et Pierre qui ont tant sacrifié pour nos études, mes longues études, pour que je puisse être dans les meilleures conditions afin de réussir. Merci pour votre aide, pour votre amour inconditionnel, merci Maman de m'avoir tant supportée et soutenue durant les épreuves compliquées. De m'avoir toujours poussée plus haut et d'avoir cru en moi, coûte que coûte. Ma belle et grande famille, je vous souhaite le meilleur pour aujourd'hui et pour demain.

À toutes les personnes atteintes de cancer de poumon et à la mémoire des défunts, je dédie également ce travail.





## SOMMAIRE

---

<b>RESUME</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTES DES FIGURES</b> .....	<b>21</b>
<b>LISTES DES TABLES</b> .....	<b>22</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>23</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>29</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>31</b>
<b>1. Le cancer du poumon</b> .....	<b>31</b>
<b>1.1. La biologie du poumon</b> .....	<b>31</b>
1.1.1. La structure pulmonaire et les échanges gazeux.....	31
1.1.2. Les types cellulaires pulmonaires et leurs rôles.....	32
1.1.3. Les mécanismes de défense des poumons.....	34
1.1.3.1. Les mécanismes physiques de défense .....	34
1.1.3.2. Les réponses immunes pulmonaires .....	35
1.1.3.2.1. La réponse innée, l'inflammation et la réponse adaptative .....	35
1.1.3.2.2. Les macrophages alvéolaires .....	36
<b>1.2. Les cancers pulmonaires</b> .....	<b>39</b>
1.2.1. L'incidence et la mortalité du cancer du poumon .....	40
1.2.2. Les facteurs de risque .....	40
1.2.2.1. Le tabac .....	40
1.2.2.2. L'inflammation chronique .....	41
1.2.3. Les types histologiques du cancer du poumon .....	42
1.2.3.1. Les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC).....	44
1.2.3.2. Les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) .....	44
1.2.3.2.1. Les caractéristiques des adénocarcinomes .....	44
1.2.3.2.2. Les principales mutations .....	45
1.2.3.2.3. Origine cellulaire des adénocarcinomes pulmonaires .....	49
1.2.4. Le diagnostic et les traitements du cancer du poumon.....	50
1.2.4.1. La classification des stades de cancer du poumon .....	50
1.2.4.2. Les traitements du cancer du poumon.....	52
1.2.4.2.1. La chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.....	52
1.2.4.2.2. La thérapie ciblée .....	53
1.2.4.2.3. Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire .....	54
<b>1.3. Les reprogrammations métaboliques de l'environnement tumoral</b> .....	<b>56</b>
1.3.1. Le métabolisme de la cellule cancéreuse : l'effet Warburg .....	57
1.3.1.1. Le métabolisme du glucose .....	57
1.3.1.2. L'effet Warburg et les dérivés intermédiaires du cycle de Krebs .....	61
1.3.2. L'hétérogénéité métabolique des tumeurs de cancer de poumon .....	63
1.3.3. Les perturbations métaboliques de l'environnement tumoral.....	64
1.3.3.1. Les altérations métaboliques inhibant les lymphocytes T.....	64
1.3.3.2. La reprogrammation métabolique des macrophages .....	65

<b>2. Le cholestérol dans le développement tumoral .....</b>	<b>69</b>
<b>2.1. Le cholestérol .....</b>	<b>69</b>
2.1.1. La structure du cholestérol.....	69
2.1.2. Le rôle du cholestérol dans les membranes.....	70
2.1.3. Les transformations du cholestérol .....	71
2.1.4. Les sources du cholestérol.....	73
2.1.4.1. Voie exogène .....	73
2.1.4.2. Voie endogène .....	75
2.1.5. L'apport du cholestérol aux tissus périphériques .....	77
<b>2.2. L'efflux du cholestérol .....</b>	<b>78</b>
2.2.1. Les lipoprotéines de haute densité.....	78
2.2.2. Le transport retour du cholestérol (RCT).....	79
2.2.2.1. Efflux du cholestérol des tissus périphériques .....	79
2.2.2.1.1. L'apolipoprotéine A-I pauvre en lipide .....	80
2.2.2.1.2. ABCA1 efflue le cholestérol vers l'ApoA-I .....	80
2.2.2.1.3. ABCG1 efflue le cholestérol vers les HDLs matures .....	82
2.2.2.1.4. SR-BI dans l'efflux du cholestérol.....	84
2.2.3. Le remodelage plasmatique des HDLs .....	85
2.2.4. La captation hépatique des HDLs .....	87
<b>2.3. Les régulations de l'homéostasie cellulaire du cholestérol.....</b>	<b>88</b>
2.3.1. Régulation de la synthèse du cholestérol : SREBP2 .....	89
2.3.2. Régulation de l'efflux cellulaire du cholestérol : LXR .....	91
<b>2.4. Les liens établis entre cholestérol et cancer .....</b>	<b>93</b>
2.4.1. Les études épidémiologiques.....	93
2.4.2. Les études précliniques.....	95
2.4.2.1. ApoA-1, HDL et développement tumoral .....	95
2.4.2.2. Le rôle de l'efflux dans l'immunité tumorale.....	97
2.4.2.3. Les mécanismes identifiés dans les cellules cancéreuses .....	100
<b>3. La mitophagie dans le développement tumoral .....</b>	<b>105</b>
<b>3.1. La mitochondrie.....</b>	<b>105</b>
3.1.1. Découvertes et structure de la mitochondrie.....	105
3.1.2. Les fonctions mitochondriales .....	107
3.1.2.1. Fonction énergétique de la mitochondrie.....	107
3.1.2.2. La mort cellulaire.....	110
3.1.2.3. Le système immunitaire .....	111
3.1.3. Le contrôle qualité des mitochondries.....	113
3.1.3.1. Le contrôle des protéines.....	113
3.1.3.1.1. Le système ubiquitine-protéasome (UPS).....	113
3.1.3.1.2. Le système d'importation des protéines et les protéases mitochondriales ....	114
3.1.3.1.3. L'UPRmt .....	115
3.1.3.2. Le contrôle de l'organelle .....	117
3.1.3.2.1. La dynamique des mitochondries : fusion/fission .....	117
3.1.3.2.2. Les vésicules dérivées de la mitochondrie .....	118
3.1.3.2.3. La mitophagie .....	119
<b>3.2. La mitophagie : une forme d'autophagie sélective .....</b>	<b>120</b>
3.2.1. L'autophagie.....	120
3.2.1.1. Découverte et caractéristiques .....	120
3.2.1.2. Les sous-types d'autophagie .....	121

3.2.1.3.	Les différentes formes d'autophagie sélective .....	122
3.2.1.4.	La machinerie moléculaire de l'autophagie.....	123
3.2.1.5.	Les mécanismes de régulation de l'autophagie.....	127
3.2.1.6.	Le rôle de l'autophagie dans le cancer .....	129
3.2.1.6.1.	L'autophagie dans la transformation maligne.....	129
3.2.1.6.2.	L'autophagie dans la progression tumorale.....	130
3.2.2.	Découverte de la mitophagie.....	132
3.2.3.	Les différentes voies de la mitophagie .....	133
3.2.3.1.	Les voies médiées par les récepteurs et les cardiolipines.....	133
3.2.3.2.	Les voies médiées par l'ubiquitine .....	135
3.2.3.2.1.	La voie dépendante de PINK1/PARKIN .....	135
3.2.3.2.1.1.	PINK1 : le gardien de la mitochondrie.....	135
3.2.3.2.1.2.	Activation de la voie PINK1/PARKIN.....	137
3.2.3.2.2.	La voie médiée par d'autres E3 ubiquitines ligases .....	140
3.2.4.	Les fonctions de la mitophagie.....	141
3.2.4.1.	Fonctions physiologiques.....	141
3.2.4.2.	Fonctions pathologiques .....	142
<b>3.3.</b>	<b>Les rôles de la mitophagie dans le cancer .....</b>	<b>143</b>
3.3.1.	Protection contre l'oncogenèse .....	143
3.3.2.	Contrôle de l'immunité anti-tumorale.....	143
3.3.3.	Résistance aux traitements.....	144
3.3.4.	Reprogrammation métabolique et la progression tumorale .....	145
3.3.4.1.	L'hypoxie induit la mitophagie et l'effet Warburg .....	145
3.3.4.2.	PINK1 diminue la progression tumorale .....	146
3.3.4.3.	PINK1 et les cancers du poumon .....	147
	<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX .....</b>	<b>149</b>
	<b>ARTICLE 1 : .....</b>	<b>149</b>
	<b>ARTICLE 2 : .....</b>	<b>153</b>
	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>156</b>
<b>1.</b>	<b>Le rôle du cholestérol dans le développement tumoral .....</b>	<b>156</b>
1.1.	Perturbations de l'efflux du cholestérol dans les tumeurs pulmonaires.....	156
1.2.	L'accumulation du cholestérol des macrophages augmente l'hyperplasie.	158
1.3.	L'accumulation du cholestérol des BASCs participe à la progression tumorale .....	159
1.4.	L'efflux du cholestérol réduit la progression tumorale .....	161
<b>2.</b>	<b>Le rôle de la mitophagie dans le développement tumoral.....</b>	<b>164</b>
2.1.	Caractérisation de la mitophagie des cellules cancéreuses pulmonaires murines .....	164
2.2.	La mitophagie dépendante de PINK1 dans le développement tumoral .....	166
2.3.	L'inhibition de l'autophagie dans le développement tumoral.....	170
2.4.	La sensibilisation des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques .....	171
2.5.	Les cancers dans leur environnement pulmonaire.....	171

<b>CONCLUSION</b> .....	<b>174</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>176</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>210</b>

## LISTES DES FIGURES

---

Figure 1.1 : Les épithéliums des voies aériennes inférieures respiratoires. ....	33
Figure 1.2 : Les mécanismes de défense du poumon. ....	38
Figure 1.3 : Pourcentage des cas de cancer du poumon par stade. ....	39
Figure 1.4 : Les principales mutations des adénocarcinomes pulmonaires.....	45
Figure 1.5 : La voie de l'EGFR et des RAS-RAF-MEK-ERK.....	46
Figure 1.6 : L'activation constitutive de KRAS. ....	48
Figure 1.7 : L'origine cellulaire des adénocarcinomes pulmonaires. ....	50
Figure 1.8 : L'activation des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> par les ICBs. ....	55
Figure 1.9 : Le rôle central du métabolisme du glucose dans la cellule.....	59
Figure 1.10 : L'inhibition des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> par le TME. ....	65
Figure 1.11 : La reprogrammation métabolique des TAMs. ....	67
Figure 2.1 : La structure du cholestérol.....	70
Figure 2.2 : La membrane plasmique des mammifères.....	71
Figure 2.3 : L'estérification du cholestérol cellulaire. ....	72
Figure 2.4 : La voie exogène du cholestérol. ....	74
Figure 2.5 : La synthèse du cholestérol. ....	76
Figure 2.6 : Les voies de transport du cholestérol aux tissus périphériques. ....	78
Figure 2.7 : L'efflux du cholestérol vers l'ApoA-I.....	82
Figure 2.8 : L'estérification du cholestérol plasmatique. ....	83
Figure 2.9 : L'efflux du cholestérol vers les HDLs matures.....	84
Figure 2.10 : Les remodelages plasmatiques des HDLs. ....	87
Figure 2.11 : Le métabolisme des lipoprotéines et le transport retour du cholestérol.....	88
Figure 2.12 : La régulation de la synthèse du cholestérol par SREBP2. ....	90
Figure 2.13 : La régulation de l'efflux du cholestérol par LXR.....	92
Figure 2.14 : Le rôle anti-tumoral de l'ApoA-I.....	96
Figure 2.15 : Le cholestérol active les voies pro-inflammatoires des macrophages.....	98
Figure 2.16 : Le double rôle de l'efflux cellulaire du cholestérol.....	100
Figure 2.17 : Le rôle du cholestérol dans la cellule cancéreuse. ....	103
Figure 3.1 : La structure et les compartiments de la mitochondrie. ....	107
Figure 3.2 : Le rôle central de la mitochondrie dans la respiration cellulaire. ....	108
Figure 3.3 : La phosphorylation oxydative. ....	109
Figure 3.4 : La formation des espèces réactives de l'oxygène. ....	110
Figure 3.5 : L'activation des voies pro-inflammatoires par les DAMPs mitochondriaux.....	112
Figure 3.6 : La cascade du système de l'ubiquitine-protéasome (UPS). ....	114
Figure 3.7 : Le système de l'UPRmt.....	116
Figure 3.8 : La dynamique des mitochondries : fusion/fission. ....	118
Figure 3.9 : Contrôle qualité de la mitochondrie. ....	119
Figure 3.10 : Les différentes formes d'autophagies. ....	122
Figure 3.11 : Les formes sélectives de la macro-autophagie et leurs différents substrats. .	123
Figure 3.12 : La machinerie de l'autophagie. ....	124
Figure 3.13 : Les systèmes de conjugaison de l'autophagie. ....	126
Figure 3.14 : Les voies d'activation et d'inhibition de l'autophagie. ....	128
Figure 3.15 : Le double rôle de l'autophagie dans le cancer. ....	131
Figure 3.16 : La mitophagie indépendante de l'ubiquitination des protéines. ....	134
Figure 3.17 : La dégradation et la stabilisation de PINK1. ....	136

Figure 3.18 : Le recrutement de PARKIN et la formation de chaîne d'ubiquitine.....	137
Figure 3.19 : Le recrutement des récepteurs autophagiques au cours de la mitophagie. ...	139
Figure 3.20 : Les rôles de la mitophagie dans le cancer.....	145
Figure 3.21 : L'absence de PINK1 contribue à la progression tumorale.....	147

## **LISTES DES TABLES**

---

Tableau 1.1 : Classification histologiques des tumeurs pulmonaires.....	43
Tableau 1.2 : 8ième classification TNM du cancer du poumon. ....	51

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>A</b>	<b>ABCA1</b>	ATP binding cassette A1
	<b>ABCG1</b>	ATP binding cassette G1
	<b>ACAT</b>	Acyl-CoA cholesterol acyl transferase
	<b>ADNmt</b>	ADN mitochondrial
	<b>AIS</b>	Adénocarcinome in situ
	<b>AM</b>	Macrophage alvéolaire
	<b>AMBRA1</b>	Autophagy and Beclin 1 regulator 1
	<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase
	<b>APAF1</b>	Apoptotic peptidase activating factor
	<b>Apo</b>	Apolipoprotéine
	<b>ARIH1</b>	Ariadne RBR E3 Ub protein ligase 1
	<b>ASC</b>	Apoptosis-associated speck-like protein
	<b>AT1 et 2</b>	Cellule épithéliale alvéolaire de type 1 et 2
	<b>ATFS-1</b>	Activating transcription factor associated with stress-1
	<b>ATG</b>	Autophagy-related gene
	<b>ATM</b>	Ataxia-telangiectasia mutated
	<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
	<b>ATR</b>	Ataxia telangiectasia and rad3-related protein
<b>B</b>	<b>BADJ</b>	Bronchoalveolar duct junction
	<b>BAK</b>	BCL2 antagonist/killer 1
	<b>BASC</b>	Bronchoalveolar stem cell
	<b>BAX</b>	BCL2 associated X
	<b>BCL2L13</b>	BCL2 Like 13
	<b>BECN1</b>	Beclin 1
	<b>BMP-1</b>	Bone morphogenic protein-1
	<b>BNIP3</b>	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
	<b>BNIP3L</b>	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
	<b>BP</b>	Benzo[a]pyrène
	<b>BPCO</b>	Bronchopneumopathie chronique obstructive
	<b>BPDE</b>	BP-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde
	<b>BSEP</b>	Bile salt export pump
<b>C</b>	<b>C-PINK1</b>	PINK1 clivée
	<b>CAV-1</b>	Calvéoline 1
	<b>CBNPC</b>	Cancer bronchique non à petites cellules
	<b>CBPC</b>	Cancer bronchique à petites cellules
	<b>CCSP</b>	Clara cell secretory protein
	<b>CC-LR</b>	CCSP <sup>CRE-ERTM/+</sup> ;Kras <sup>G12D/+</sup>
	<b>CC-LR<sup>DKO</sup></b>	CCSP <sup>CRE-ERTM/+</sup> ;Kras <sup>G12D/+</sup> ;Abca1/Abcg1 <sup>fl/fl</sup>
	<b>CD</b>	Cluster de différenciation
	<b>CD44/HCAM</b>	Homing cell adhesion molecule
	<b>CE</b>	Cholesteryl ester
	<b>CETP</b>	Cholesteryl ester transfer protein
	<b>cGAS-STING</b>	Cyclic GMP–AMP synthase–stimulator of interferon genes

	<b>CHK2</b>	Checkpoint kinase 2
	<b>CICD</b>	Caspase-independent cell death,
	<b>CL</b>	Cholesterol libre
	<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
	<b>CoA</b>	Coenzyme A
	<b>CoA</b>	Complexe co-activateur
	<b>CoR</b>	Complexe corépresseur
	<b>CPA</b>	Cellule présentatrice d'antigènes
	<b>CSF1</b>	Colony stimulating factor 1
	<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
	<b>CYP450</b>	Cytochromes P450
<b>D</b>	<b>DAMP</b>	Dammage-associated molecular pattern
	<b>DC</b>	Cellules dendritique
	<b>DRP1</b>	Dynamin-related protein 1
<b>E</b>	<b>ECD</b>	Extracellular domain
	<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
	<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
	<b>EI</b>	Espace intermembranaire
	<b>ERK</b>	Extracellular signal regulated kinase
	<b>ETC</b>	Electron transport chain
<b>F</b>	<b>FAD</b>	Flavin adenine dinucleotide
	<b>FDA</b>	Food and drug administration
	<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
	<b>FIP200</b>	Focal adhesion kinase-interacting protein of 200 kDa
	<b>FLOT-2</b>	Flotilline-2
	<b>FPP</b>	Farnésyl-pyrophosphate
	<b>FUNDC1</b>	FUN14 domain containing 1
<b>G</b>	<b>G6P</b>	Glucose-6-phosphate
	<b>G6PD</b>	Glucose 6-phosphate dehydrogenase
	<b>GABARAP</b>	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
	<b>GAP</b>	GTPase-activating protein
	<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
	<b>GEF</b>	GTP exchange factor
	<b>GLOBACAN</b>	Global Cancer Statistics
	<b>GLUT1</b>	Glucose transporter 1
	<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
	<b>GTP</b>	Guanine triphosphate
<b>H</b>	<b>HADHA</b>	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha
	<b>HDL</b>	High density lipoprotein
	<b>HDL-C</b>	HDL-Cholestérol
	<b>HECT</b>	Homologous to the E6AP carboxil terminus
	<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia inducible factor-1

	<b>HL</b>	Hepatic lipase
	<b>HMG-CoA</b>	3-hydroxy-3-méthylglutaryl CoA
	<b>HMGCR</b>	HMG-CoA réductase
	<b>HSP</b>	Heat shock protein
	<b>HUWE1</b>	UBA and WWE domain-containing 1
<b>I</b>	<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
	<b>ICB</b>	Immune checkpoint inhibitor
	<b>IDL</b>	Intermediate density lipoproteins
	<b>IFN-I</b>	Interféron de type I
	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interféron $\gamma$
	<b>IGF-1</b>	Insulin-like growth factor-1
	<b>IKK</b>	Inhibitor of nuclear factor kappa kinase
	<b>IL</b>	Interleukine
	<b>IM</b>	Macrophage interstitiel
	<b>INSIG</b>	Insulin-induced gene
	<b>IPP</b>	Isopentényl-diphosphate
	<b>IRF3</b>	Interferon regulatory factor 3
<b>K</b>	<b>KC</b>	Cétocholestérol
	<b>KP</b>	Kras <sup>G12D/+</sup> ;P53 <sup>-/-</sup>
	<b>Kras</b>	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
<b>L</b>	<b>LAG3</b>	Lymphocyte activation gene 3 protein
	<b>LC3</b>	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chaine 3
	<b>LCAT</b>	Lecithin cholesterol acyltransferase
	<b>LDH</b>	Lactate dehydrogenase
	<b>LDL-R</b>	Low density lipoprotein receptor
	<b>LIPG</b>	Endothelial lipase
	<b>LIR</b>	LC3-interacting region
	<b>LKB1</b>	Liver kinase B1
	<b>LLC-1</b>	Lung lewis carcinoma
	<b>LPL</b>	Lipoprotein lipase
	<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides
	<b>LRP</b>	Low density lipoprotein receptor-related proteins
	<b>LRSAM1</b>	HOIL-1 Interacting Protein
	<b>LT</b>	Lymphocyte T
	<b>LXR</b>	Liver-X-receptor
	<b>LXRE</b>	LXR response element
	<b>LYVE1</b>	Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1
<b>M</b>	<b>MAD</b>	Mitochondrial-associated degradation
	<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
	<b>MDSC</b>	Myeloid derived suppressor cells
	<b>MDV</b>	Mitochondrial-derived vesicle
	<b>MFN1 and 2</b>	Mitofusin 1 and 2
	<b>MIA</b>	Adénocarcinome peu invasif
	<b>mitoCPR</b>	Mitochondrial compromised protein response

<b>MME</b>	Membrane mitochondriale externe
<b>MMI</b>	Membrane mitochondriale interne
<b>MMP</b>	Mitochondrial processing peptidase
<b>MMP9</b>	Matrix metalloproteinase 9
<b>MOMP</b>	Mitochondrial outer membrane permeabilization
<b>MPC</b>	Mitochondrial pyruvate carrier
<b>mPOS</b>	Mitochondrial compromised protein response
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>MTP</b>	Microsomal triglyceride transfer protein
<b>MTS</b>	Mitochondrial targeting sequence
<b>MUL1</b>	Mitochondrial ubiquitin ligase activator of NF- $\kappa$ B1
<b>M<math>\beta</math>CD</b>	Méthyl- $\beta$ -cyclodextrine
<b>N</b>	
<b>NADH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen
<b>NBD</b>	Nucleotide binding domain
<b>NBR1</b>	Neighbour of breast cancer 1
<b>NDP52</b>	Nuclear domain 10 protein 52
<b>NET</b>	Tumeurs neuroendocrine
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NLRP3</b>	NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
<b>NPC1L1</b>	Niemman-Pick C1 like 1
<b>Nr1h3 and 2</b>	Nuclear receptor subfamily 1 group h member 3 and 2
<b>O</b>	
<b>OHC</b>	Hydroxycholestérol
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>OPTN</b>	Optineurin
<b>P</b>	
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular pattern
<b>PAQR3</b>	Progesterin and adipog receptor family member 3
<b>PARL</b>	Presenilin-associated rhomboid-like protease
<b>PCPE-2</b>	Procollagen C-proteinase enhancer-2
<b>PCSK9</b>	Proprotein convertase subtilisin/kexin 9a
<b>PD-1</b>	Programmed cell death-1
<b>PD-L1</b>	Programmed cell death-ligand 1
<b>PDH</b>	Pyruvate dehydrogenase
<b>PDHK</b>	Pyruvate dehydrogenase kinase
<b>PE</b>	Phosphatidyléthanolamine
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$
<b>PHB2</b>	Prohibitin 2
<b>Phospho-Ser65 Ub</b>	Phosphorylation de l'ubiquitine sur la sérine 65
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PI3P</b>	Phosphatidylinositol-3-phosphate
<b>PINK1</b>	PTEN-induced putative kinase 1
<b>PL</b>	Phospholipide
<b>PLTP</b>	Phospholipid transfer protein

	<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor
	<b>PPP</b>	Pentose phosphate pathway
	<b>PRR</b>	Pattern recognition receptor
	<b>PS</b>	Phosphatidylsérine
<b>R</b>	<b>RAPTOR</b>	Regulatory-associated protein of mTOR
	<b>RBR</b>	RING-in-Between-RING
	<b>RCT</b>	Reverse cholesterol transport
	<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
	<b>RING</b>	Really interesting new gene
	<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
	<b>RXR</b>	Retinoïd X receptor
<b>S</b>	<b>S1P</b>	Membrane-bound transcription factor site-1 et 2 protease
	<b>SCAP</b>	SREBP cleavage-activating protein
	<b>SH2</b>	Src homoly-2
	<b>SNARE</b>	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
	<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
	<b>SP-A, B, C and D</b>	Surfactant protein A, B, C and D
	<b>SQLE</b>	Squalène monooxygénase
	<b>SQSTM1</b>	Sequestosome 1
	<b>SR-BI</b>	Scavenger receptor class B type 1
	<b>SREBP2</b>	Sterol regulatory element-binding protein 2
<b>T</b>	<b>TAM</b>	Tumor-associated macrophage
	<b>TAX1BP1</b>	Tax1 Binding Protein 1
	<b>TBK1</b>	TANK-binding kinase 1
	<b>TCA</b>	Tricarboxylic acid cycle
	<b>TDM</b>	Transmembrane domain
	<b>TFEB</b>	Transcription factor EB
	<b>TG</b>	Triglycéride
	<b>TGF-β</b>	Transforming growth factor-β
	<b>Th1 and 2</b>	T helper type 1 and 2
	<b>TIM</b>	Translocase of the inner membrane
	<b>TIM3</b>	T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3
	<b>TKI</b>	Tyrosine kinase inhibiteur
	<b>TLR</b>	Toll-lire receptor
	<b>TME</b>	Tumor microenvironment
	<b>TNFα</b>	Tumor necrosis factor α
	<b>TNM</b>	Tumeur, Node, Metastasis
	<b>TOM</b>	Translocase of the outer membrane
	<b>TP53</b>	Tumor protein 53
	<b>TSC2</b>	TSC complex subunit 2
<b>U</b>	<b>Ub</b>	Ubiquitine
	<b>UBD</b>	Ubiquitin binding domain
	<b>Ubl</b>	Ubiquitin-like domain

	<b>UBR2</b>	Ubiquitin protein ligase E3 component N-recogin 2
	<b>ULK1</b>	Unc-51 like autophagy activating kinase 1
	<b>UPRam</b>	Unfolded protein response activated by mistargeting of proteins
	<b>UPRmt</b>	Mitochondrial unfolded protein response
	<b>UPS</b>	Ubiquitine proteasome system
<b>V</b>	<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
	<b>VLDL</b>	Very low density lipoprotein
	<b>VPS</b>	Vacuolar protein sorting
<b>W</b>	<b>WIP12</b>	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2
	<b><math>\alpha</math>-KG</b>	$\alpha$ -ketoglutarate
	<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potentiel membranaire mitochondrial

## AVANT-PROPOS

---

Le cancer est une maladie multifactorielle complexe engendrée par divers facteurs génétiques et environnementaux et constitue un problème majeur de la santé publique mondiale étant donné sa fréquence et sa mortalité élevée. Parmi les différents types de cancers, le cancer du poumon représente le cancer le plus meurtrier dans le monde. Alors qu'une cellule saine de l'organisme doit s'adapter et coopérer avec son environnement – notamment adopter des comportements altruistes tels que d'arrêter de proliférer en cas de dommages cellulaires et déclencher sa propre mort afin de préserver l'intégrité de l'organisme entier – la cellule cancéreuse devient une entité égoïste, qui rompt la coopération multicellulaire et acquiert des caractéristiques individuelles impliquées dans la survie et la prolifération, au détriment de son hôte. Par la suite, ces cellules anormales se divisent et forment une masse de cellules cancéreuses, appelée cancer. Ces cellules tirent profit de leur environnement et détournent les composants cellulaires le constituant ; l'environnement tumoral est ainsi composé de cellules cancéreuses, de cellules immunitaires et de cellules du stroma où de nombreuses interactions moléculaires et cellulaires se déroulent au sein de cette niche particulière, favorisant la croissance tumorale. De telles interactions perturbent la fonctionnalité de l'organe touché et puisque le cancer est également susceptible de se propager et de migrer vers d'autres tissus de l'organisme, la présence de cancer peut aboutir au dysfonctionnement de plusieurs organes vitaux, conduisant aux décès du patient.

Les nombreuses caractéristiques acquises des cellules cancéreuses, l'environnement tumoral complexe dans lequel elles évoluent et leurs capacités à détourner les ressources énergétiques disponibles dans cet environnement, reflétant la forte adaptabilité métabolique des cellules cancéreuses, compliquent l'élaboration de cibles thérapeutiques rationnelles et efficaces. Ainsi, des mécanismes de compensation sont mis en place par les cellules cancéreuses au cours des traitements anti-cancéreux, en plus de la pression sélective favorisant la prolifération des cellules les plus à même de survivre. De ce fait, le développement de thérapie repose d'une part sur la compréhension et l'identification des caractéristiques biologiques spécifiques des cellules cancéreuses et de leur environnement ; d'autre part, différents aspects cellulaires doivent être simultanément ciblés pour diminuer l'adaptabilité des cellules cancéreuses et ainsi réduire le développement de résistance.

La reprogrammation métabolique est désormais considérée comme l'une des caractéristiques majeures des cellules cancéreuses, permettant de répondre aux exigences énergétiques et biosynthétiques élevées des cellules cancéreuses en prolifération incontrôlée. À cet égard, lors de cette thèse, j'ai tenté d'identifier les reprogrammations métaboliques et les vulnérabilités associées aux cancers du poumon. Dans ce contexte, nous avons étudié les altérations du métabolisme du cholestérol des cellules cancéreuses pulmonaires ainsi que les perturbations de l'élimination des mitochondries, l'organelle essentielle dans le métabolisme énergétique cellulaire.



# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

---

## 1. Le cancer du poumon

Le cancer du poumon est une maladie qui se développe à partir des cellules épithéliales pulmonaires. A l'origine saine, une cellule acquérant des mutations oncogéniques va se transformer et présenter de nombreuses propriétés permettant une croissance incontrôlée, un échappement à la mort cellulaire et au système immunitaire, et différentes modifications métaboliques conduisant finalement au phénotype cancéreux (Hanahan and Weinberg, 2011).

### 1.1. La biologie du poumon

Le rôle de l'oxygène dans la respiration, similaire à la combustion, a été découvert par le français Antoine-Laurent Lavoisier et publié dans le traité élémentaire de chimie en 1789. Il met également en évidence la relation entre la consommation d'oxygène et l'activité physique. Mais ce n'est qu'en 1861 que l'importance de la consommation d'oxygène par les cellules vivantes pour leur prolifération a été identifiée par Louis Pasteur (Pasteur, 1861). L'oxygène est utilisé dans les mitochondries durant la respiration cellulaire, ce qui permet principalement de fournir à la cellule de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), générant alors du dioxyde de carbone. Les organismes multicellulaires ont dû relever un défi physiologique majeur puisque les cellules ne sont pas en contact direct avec l'environnement extérieur et doivent compter sur des systèmes spécialisés dans le transport et l'échange comme l'absorption de l'oxygène de l'air et l'élimination du dioxyde de carbone. Ainsi, la fonction des poumons va permettre de répondre aux besoins d'oxygène des voies énergétiques cellulaires des organismes vivant. En effet, les poumons sont des organes appartenant à l'appareil respiratoire dont la composition cellulaire est adaptée aux besoins fonctionnels de l'organisme, en particulier les échanges gazeux. L'épithélium pulmonaire étant à la surface des voies aériennes, il est confronté régulièrement à de nombreux pathogènes et a donc dû mettre en place des mécanismes impliqués dans la défense de l'hôte grâce à l'élimination du mucus et la production de surfactant (Cañadas et al., 2020).

#### 1.1.1. La structure pulmonaire et les échanges gazeux

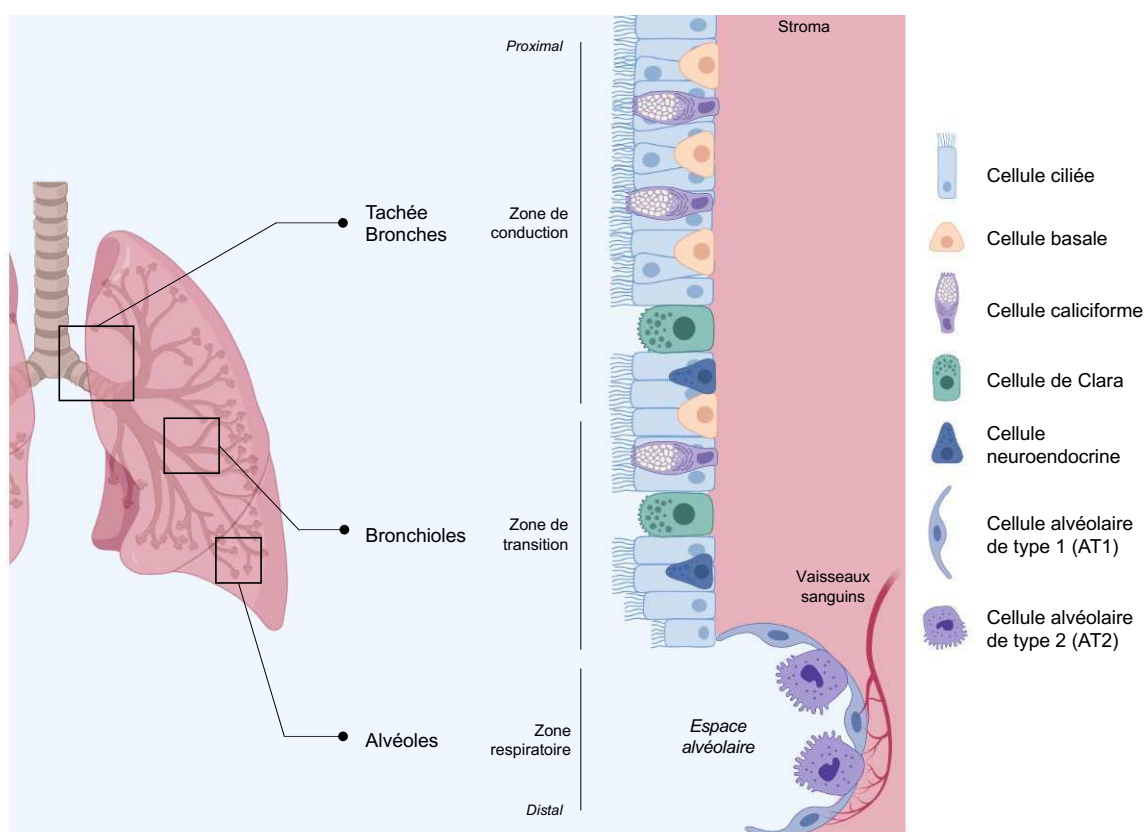
La fonction première des poumons est d'assurer l'oxygénation des tissus. Pour cela, d'un point de vue mécanique, des mouvements d'inspiration et d'expiration sont continuellement réalisés et ceux grâce aux muscles intercostaux externes et au diaphragme (Hsia et al., 2017). Lorsque ces groupes musculaires se contractent, le diaphragme s'abaisse et s'élargit, créant ainsi une dépression dans les poumons ce qui entraîne l'entrée d'air. Le relâchement du diaphragme et la contraction des muscles

abdominaux permettent ensuite l'expiration. Les voies respiratoires sont composées d'organes qui permettent ainsi la circulation de l'air pendant la ventilation et sont subdivisées en voies respiratoires supérieures et inférieures : les voies aériennes supérieures sont constituées du nez, des cavités nasales, de la bouche, du larynx et du pharynx tandis que les voies aériennes inférieures sont constituées de la trachée, des bronches, des bronchioles et des alvéoles. Ainsi, la trachée se sépare en deux bronches distinctes formant alors le poumon droit et gauche. Chez l'Homme, le poumon droit est constitué de trois lobes (supérieur, moyen et inférieur) tandis que le gauche uniquement de deux (supérieur et inférieur) en raison de l'espace occupé par le cœur. Les bronches se trouvant dans chacun de ces deux poumons vont se diviser successivement formant une ramification constituée de bronchioles. A l'extrémité de chacune des bronchioles se trouve de nombreux sacs alvéolaires constitués d'alvéoles. Ces dernières sont composées des cellules épithéliales alvéolaires de type 1 et 2 (AT1 et AT2) où seules les AT1 participent à l'échange gazeux : elles forment un épithélium épais d'une seule cellule, entouré par des capillaires sanguins dont la paroi ne comporte également qu'une seule couche cellulaire. L'interface entre l'air de l'environnement et le sang dans les poumons, constituant la zone d'échange, optimisent la distance que l'air doit parcourir par diffusion. Le processus de diffusion est passif, assuré seulement par la différence de concentration de l'oxygène et du dioxyde de carbone des deux côtés des membranes, et leur solubilité relative dans la membrane plasmique (Wagner, 2015). Ainsi, grâce aux 300 millions d'alvéoles et des 30 milliards de capillaires présents dans chaque poumon, la surface totale respiratoire peut atteindre 80m<sup>2</sup>.

### 1.1.2. Les types cellulaires pulmonaires et leurs rôles

Pour assurer la fonction première du poumon dans l'échange gazeux accompli par les cellules AT1, de nombreux autres types cellulaires sont requis afin de conduire l'air jusqu'aux AT1, de maintenir une structure pulmonaire fonctionnelle ainsi que de purifier l'air inhalé. De ce fait, différents types d'épithélium constituent les voies aériennes inférieures et répondent aux fonctionnalités régionales du poumon, qui, grâce à leurs caractéristiques anatomiques et fonctionnelles, peuvent être subdivisés en trois principaux épithéliums : les voies hautes (trachée et bronches), les bronchioles distales (bronchioles, bronchioles terminales et bronchioles respiratoires) et les espaces alvéolaires (alvéoles) (Figure 1.1) (Plasschaert et al., 2018; Travaglini et al., 2020). Les voies hautes constituent les voies de conduction afin de conduire et distribuer l'air vers les parties distales inférieures du poumon et débutent par la trachée jusqu'aux bronches. Elles sont formées d'un épithélium pseudo-stratifié, composé de cellules basales régénératrices, de cellules caliciformes sécrétrices de mucus et de cellules ciliées qui facilitent l'excrétion du mucus (Rackley and Stripp, 2012). Le mucus contribue à l'humidification et le réchauffement des poumons, mais participe également à la défense de l'hôte comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. Les nombreuses ramifications des bronches, formant les bronchioles, constituent la

zone de transition entre la zone de conduction et la zone respiratoire. Au niveau de cette région, les cellules sécrétrices, les cellules ciliées et neuroendocrines ainsi que les cellules de Clara constituent les principales populations cellulaires. Les cellules de Clara, aussi connues sous le nom des cellules clubs, jouent un rôle primordial dans l'intégrité et la régénération du tissu (Rokicki et al., 2016). Les voies aériennes se terminent au niveau des espaces alvéolaires, ce qui correspond à la zone respiratoire, constituée de nombreuses alvéoles. Deux types majeurs de cellules épithéliales forment les alvéoles (Li et al., 2015; Treutlein et al., 2014), bien que les récents progrès technologiques basés sur le séquençage à haut débit de l'expression génique des cellules individuelles suggèrent la présence et le rôle potentiel d'autres types cellulaires (Travaglini et al., 2020). Néanmoins, la fonction respiratoire d'échange des gaz est assurée par les AT1, cellules aplaties représentant 95% de l'épithélium tapissant les alvéoles. Le bon fonctionnement de ces cellules ne pourrait se faire sans un second type de cellule épithéliale alvéolaire, les AT2 : peu représentées en nombre, elles sont cependant beaucoup plus volumineuses. Ces cellules AT2 sécrètent le surfactant pulmonaire, un film tensioactif qui réduit les tensions de surface et empêche l'effondrement alvéolaire (Cañadas et al., 2020). En plus de ce rôle, le surfactant participe à la défense de l'hôte.



**Figure 1.1 : Les épithéliums des voies aériennes inférieures respiratoires.**

Les voies aériennes proximales sont constituées de la trachée et des bronches et représentent la zone de conduction. Les bronchioles constituent la zone de transition et s'ouvrent sur les sacs alvéolaires composés d'alvéoles, dans la partie la plus distale des voies aériennes : elles représentent les zones respiratoires. Adapté de (Li et al., 2015).

### 1.1.3. Les mécanismes de défense des poumons

Les amples surfaces respiratoires des poumons sont continuellement exposées à une variété de particules inhalées, d'allergènes ou de pathogènes en suspension dans l'air. Par conséquent, de nombreux mécanismes de défense sont mis en place afin de protéger les fines surface d'échange de gaz, tout en maîtrisant les réponses inflammatoires exacerbées qui pourraient abimer les structures pulmonaires.

#### 1.1.3.1. Les mécanismes physiques de défense

L'épithélium représente à lui seul une barrière mécanique physique qui prévient la pénétration des particules dans l'organisme. De plus, l'épithélium des voies hautes est constitué de cellules caliciformes productrices et sécrétrices de mucus. Ce dernier forme une couche de gel permettant la capture des particules inhalées qui seront par la suite transportées grâce à une synchronisation de battement des cellules ciliées et éliminées par expectoration, un processus appelé clairance mucociliaire (Figure 1.2) (Fahy and Dickey, 2010; Thornton et al., 2008). Outre ce rôle de barrière, le mucus possède des propriétés antimicrobiennes. En effet, il est principalement constitué de mucines qui sont de grosses glycoprotéines ; leurs nombreux glycans participent à la reconnaissance et séquestration des pathogènes. De plus, diverses molécules antimicrobiennes telles que les défensines, des lysosymes et des IgA sont sécrétées et incorporées au mucus : les lysosymes dégradent une partie de la membrane bactérienne tandis que les IgA neutralisent les toxines et les virus, et bloque l'entrée des bactéries (Nicod, 2005). Les particules et microbes échappant à cette première ligne de défense atteignent les voies distales du poumon et doivent rapidement être captés et évacués.

Au niveau des voies aériennes distales, les alvéoles sont tapissées de surfactant, produit par les cellules AT2 et sécrété dans l'espace alvéolaire. Sa principale fonction est de maintenir la structure des alvéoles en réduisant les tensions superficielles de l'interface air/eau, favorisant alors les échanges gazeux (Schürch, 1982). Le surfactant est composé d'environ 10% de protéines et de 90% de lipides, dont du cholestérol (Goerke, 1998). Les quatre protéines du surfactant SP-A, -B, -C et -D peuvent être divisées en deux groupes : SP-B et SP-C sont deux petites protéines hydrophobes, tandis que SP-A et SP-D sont de grandes protéines hydrophiles. Ces deux dernières appartiennent à la famille des collectines, famille de protéine caractérisée par leur capacité à reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) tels que les lipopolysaccharides (LPS) bactériens. De ce fait, SP-A et SP-D protègent de la dissémination des pathogènes en s'y associant et en formant des agrégations microbiennes (Figure 1.2). Ces agrégations peuvent ensuite être évacuées par clairance mucociliaire au niveau des voies respiratoires comme cela est le cas du mucus, mais les principaux mécanismes de clairance sont l'opsonisation et l'élimination par recrutement de cellules

phagocytaires environnantes alvéolaires (Cañadas et al., 2020). Il est important de noter que puisque les protéines du surfactant reconnaissent et neutralisent les agents microbiens avant que ces derniers ne soient reconnus par le système immunitaire, leurs actions permettent de réduire et d'empêcher le déclenchement des réactions inflammatoires des cellules immunitaires, limitant ainsi des dégâts cellulaires.

### 1.1.3.2. Les réponses immunes pulmonaires

#### 1.1.3.2.1. La réponse innée, l'inflammation et la réponse adaptative

L'immunité innée est un système de défense de l'hôte contre les pathogènes conservé au cours de l'évolution et présent dans tous les tissus, en particulier au niveau des surfaces barrières telles que la peau ou des muqueuses des voies respiratoires. De nombreuses cellules du système immunitaire participent aux réponses de l'immunité innée dans les poumons, les principales étant les macrophages, les monocytes, les neutrophiles, les cellules tueuse naturelles (NK) et les cellules dendritiques (DCs), mais également les cellules non hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales (Hartl et al., 2018; Juncadella et al., 2013). Les cellules de l'immunité innée sont capables de déclencher et d'exercer des mécanismes de défense inné tels que la phagocytose, l'activation du système du complément et le déclenchement d'une réponse inflammatoire à la suite d'une intrusion d'agents pathogènes par exemple. Ainsi, les récepteurs PRRs (*pattern recognition receptors*) qui peuvent être soit solubles, soit présents à la surface des membranes tels que les TLRs (*toll-like receptors*) des cellules de l'immunité innée reconnaissent les PAMPs des pathogènes. Parmi les cascades de signalisation déclenchées par la reconnaissance des PAMPs, de nombreuses chimiokines telles que les chimiokines CXC et les CC sont produites dont le rôle est particulièrement important pour le recrutement des cellules immunitaires. De plus, des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , IL-6, le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) sont également produites et sécrétées, et participent à l'activation des cellules du système immunitaire afin de moduler les réponses inflammatoires (Chen et al., 2017a) (Figure 1.2). Ainsi, dans les poumons, les neutrophiles représentent les premières cellules de l'immunité innée recrutées sur le site de l'inflammation grâce aux gradients de chimiokines, suivis par les monocytes, qui sont capable de se différencier en macrophages ainsi qu'en cellules dendritiques, en plus de ceux résidents du tissu pulmonaire (Braciale et al., 2012; Gautier and Yvan-Charvet, 2014). Le recrutement des cellules immunitaires sur le site concerné entraîne rougeur, chaleur, gonflement et douleur, des caractéristiques propres à l'inflammation. Les cellules phagocytaires telles que les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques vont permettre d'éliminer les pathogènes par la phagocytose, comme leur nom l'indique. De plus, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages vont produire des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) afin d'entretenir et

d'amplifier le processus inflammatoire, en plus de participer à l'activation des cellules immunitaires impliquées dans la réponse adaptative.

La réponse immunitaire adaptative se développe plus lentement mais permet une réponse spécifique aux antigènes. Elle permet une mémoire immunitaire, en partie générée par les lymphocytes B avec une réponse humorale ainsi qu'une réponse cellulaire grâce aux lymphocytes T (LTs). Certaines cellules de l'immunité innée jouent également un rôle dans l'immunité adaptative, telles que les DCs : en effet, lors de la phagocytose sur le site de l'inflammation, les DCs capturent des antigènes du pathogène et ayant alors le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), elles migrent vers les ganglions lymphatiques drainant le site concerné et présentent les antigènes au sein des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) aux LTs CD4<sup>+</sup> spécifiques et aux LTs cytotoxiques CD8<sup>+</sup>, ce qui déclenche leur activation (Braciale et al., 2012) (Figure 1.2). L'activation des LTs nécessite plusieurs interactions moléculaires dont la reconnaissance du CMH des DCs par les récepteurs des LTs en plus de l'interaction des molécules costimulatrices CD80/CD86 des DCs avec le récepteur CD28 des LTs. Ainsi, après leur rencontre avec des DCs dans les ganglions lymphatiques drainant et l'activation progressive des LTs naïfs et mémoires spécifiques du pathogènes, ces LTs prolifèrent et se différencient pour devenir des LTs effecteurs capables de migrer vers le site de l'infection et de déclencher des réponses immunitaires effectrices. Cependant, l'activation des LTs entraîne par la suite l'expression à la surface membranaire d'un autre type de molécules impliquées cette fois-ci dans le rétrocontrôle de l'activation des LTs, permettant d'éviter une exacerbation de la réponse immunitaire. Ainsi, les molécules costimulatrices CD80/CD86 des DCs sont également reconnues par la protéine CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), qui, dans ce cas, va avoir une fonction inhibitrice des LTs (Waldman et al., 2020). Un autre axe de point de contrôle engageant la protéine PD-1 (*programmed cell death-1*) et son ligand PD-L1, est impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire.

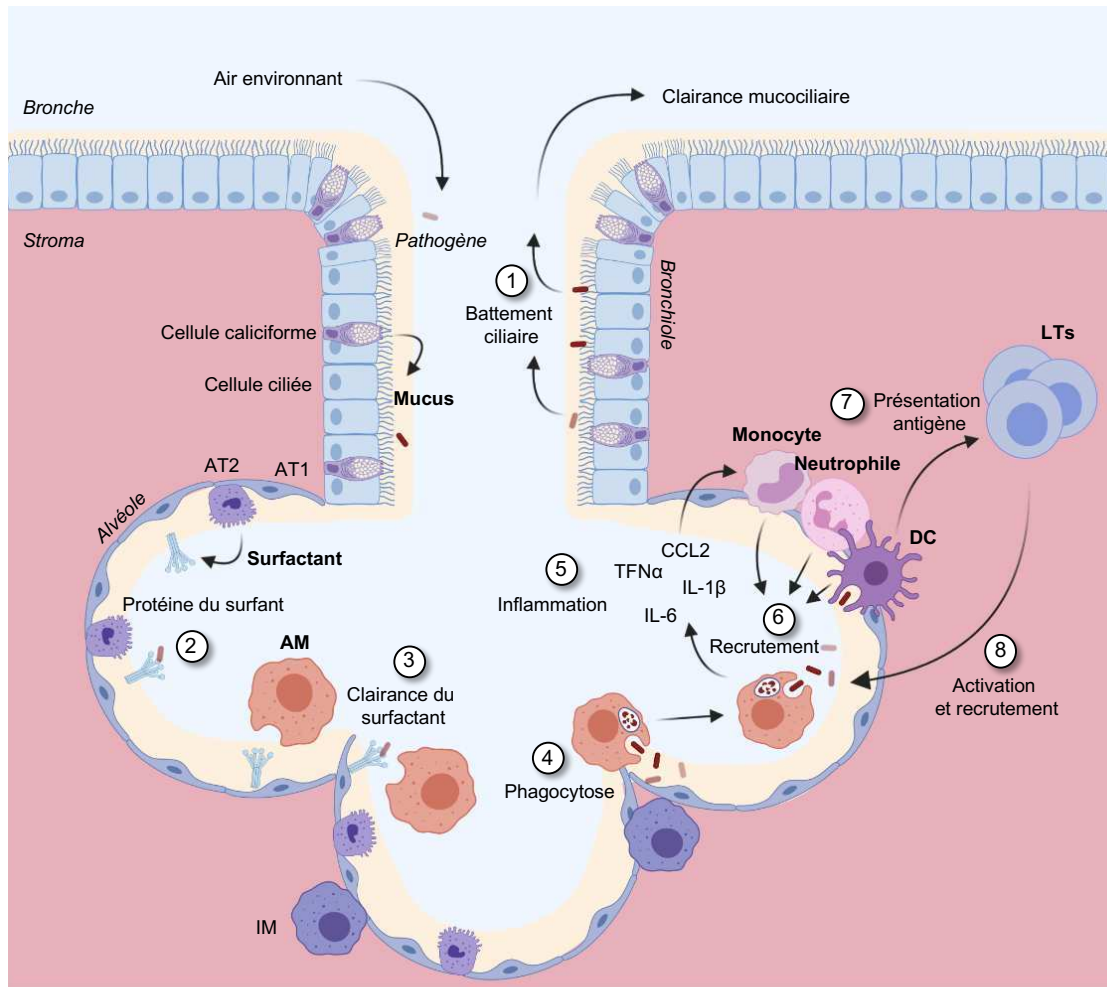
#### 1.1.3.2.2. Les macrophages alvéolaires

La théorie phagocytaire défendue par Metchnikoff en 1892 décrit pour la première fois le rôle d'une cellule dans la qualité de défense de l'hôte (Metchnikoff, 1883). Les macrophages sont des cellules résidentes des tissus possédant plusieurs fonctions telles qu'une fonction phagocytaire ainsi qu'une fonction sécrétrice de molécules. Grâce à ces caractéristiques, les macrophages agissent comme des sentinelles immunitaires pour maintenir l'intégrité des tissus, préserver la tolérance et protéger les tissus des agents pathogènes envahissants. La fonction des macrophages doit être adaptée aux exigences du tissu dans lequel les cellules résident, et de ce fait, ils peuvent adopter un large éventail de phénotypes en fonction de leur environnement (Blériot et al., 2020; Gautier and Yvan-Charvet, 2014; Lavin et al., 2014).

Les macrophages représentent la population immunitaire la plus importante dans les poumons. Deux populations principales de macrophages y sont retrouvées : les macrophages alvéolaires (AMs), résidant dans la lumière de l'espace alvéolaire (Hussell and Bell, 2014) et les macrophages interstitiels (IMs), se localisant dans le parenchyme entre l'endothélium vasculaire et l'épithélium alvéolaire (Misharin et al., 2011). Il a longtemps été pensé que les macrophages résidents des tissus dérivait de la différenciation des monocytes circulants, cependant, il est désormais admis que les AMs proviennent de progéniteurs du foie fœtal peuplant le poumon durant la période embryonnaire (Hashimoto et al., 2013; Tan and Krasnow, 2016). Les AMs sont ensuite capables de s'auto-renouveler et sont dépendants du facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) et du facteur de croissance transformant  $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ) pour leur genèse et leur survie (Lavin et al., 2014). Les AMs représentent la principale population de macrophages, de ce fait, les AMs sont davantage étudiés : ils sont essentiels à l'homéostasie des poumons et exercent des fonctions de clairance du surfactant, de phagocytose des débris cellulaires, en plus de participer au déclenchement et à la résolution de l'inflammation pulmonaire.

Les AMs sont des cellules spécialisées dans le recyclage des molécules de surfactant et l'élimination des particules et débris inhalés (Figure 1.2). Le dysfonctionnement dans la clairance du surfactant par les AMs est à l'origine de la protéinose alvéolaire pulmonaire, ce qui augmente la susceptibilité aux infections (Trapnell et al., 2019). Ainsi, les gènes impliqués dans la clairance du surfactant sont sous le contrôle du facteur de transcription PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), permettant la régulation du métabolisme des lipides (Gautier et al., 2012). De plus, les AMs, comme tout autre macrophage, sont des cellules hautement adaptatives, qui répondent à une pléthore de signaux environnementaux. Cette plasticité des macrophages est largement démontrée *in vitro* et permet d'orienter les macrophages vers une des deux extrémités du spectre des phénotypes possiblement arborés par les macrophages. Ainsi, les cytokines Th1 comme l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou les produits bactériens tels le LPS induisent une polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire classique, autrement appelé « macrophages M1-like », tandis que les cytokines Th2 telles que l'IL-4 polarisent les macrophages vers un phénotype alternatif anti-inflammatoire et réparateur, appelé « M2-like » (Martinez and Gordon, 2014). Alors qu'un tel paradigme n'a pas été montré dans les macrophages des poumons *in vivo*, il semblerait que le rôle des AMs dans l'homéostasie soit anti-inflammatoires afin de favoriser la tolérance aux antigènes inoffensifs, possiblement dans le but de préserver les tissus épithéliaux d'inflammations exagérées. Cependant, les réponses immunitaires efficaces médiées par les macrophages et induites par la présence de pathogènes ne doivent pas être compromises. Les reconnaissances des PAMPs par les TLRs modifient et annulent les mécanismes inhibiteurs des AMs et déclenchent l'inflammation, comme décrit dans le paragraphe précédent. Ainsi, les macrophages sont importants dans l'homéostasie du poumon et la clairance du surfactant, en plus des réponses inflammatoires afin de

protéger l'organisme des intrusions de pathogènes, mais cette inflammation doit être maîtrisée pour ne pas endommager les tissus.



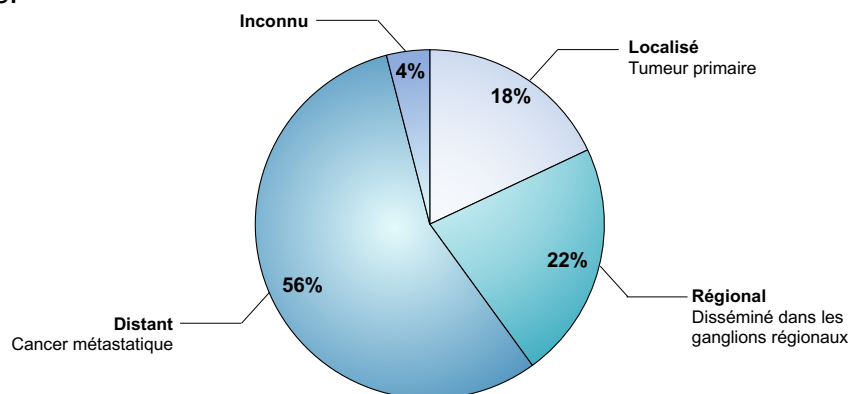
**Figure 1.2 : Les mécanismes de défense du poumon.**

(1) Le mucus tapissant les épithéliums des bronches et des bronchioles, produit par les cellules caliciformes, capte les pathogènes provenant de l'air inhalé et les cellules ciliées permettent la clairance mucociliaire par des battements de cils. (2) Les cellules alvéolaires AT2 sécrètent du surfactant dans l'espace alvéolaire, composés des protéines du surfactant SP-A et SP-D entre autres, qui s'associent aux pathogènes. (3) Les macrophages alvéolaires (AMs) permettent de nettoyer et recycler le surfactant. (4) Les AMs phagocytent les pathogènes (5) ce qui est susceptible d'engendrer une activation des voies pro-inflammatoires intracellulaires et la sécrétion consécutive de chimiokines et cytokines. (6) Les chimiokines et cytokines permettent le recrutement des cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée (7) et les cellules dendritiques (DCs), en tant que cellules présentatrices d'antigènes, vont activer les lymphocytes T (LTs) dans le ganglion drainant le site inflammatoire. (8) Une réponse immunitaire adaptative peut alors se mettre en place afin de participer à l'élimination du pathogène.

## 1.2. Les cancers pulmonaires

Les premières descriptions de la maladie cancéreuse ont été retrouvées en Égypte, 3000 av. J.-C. Hippocrate utilisera en 460-370 av. J.-C. le terme de crabe pour définir ces masses tumorales car le cancer « présente des veines étendues de tous côtés, de même que le crabe a des pieds ». Le terme crabe sera traduit du Grec au Latin pour le mot cancer par Celsus en 50-28 av J.-C. Aujourd'hui, la maladie cancéreuse est mieux définie : elle est causée par des défaillances des mécanismes contrôlant la balance entre croissance, prolifération et apoptose des cellules, et est caractérisée par une dérégulation du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011). Cette perte d'homéostasie cellulaire est engendrée par la dérégulation des systèmes génétiques et moléculaires complexes, et peut toucher différents organes.

Le cancer du poumon n'a été défini comme maladie qu'à partir de 1761 et ne représentait que 1% des tumeurs identifiées au cours des autopsies un siècle plus tard. Cependant, les substances toxiques atmosphériques et l'arrivée des cigarettes industrielles, accompagnée de l'augmentation de la consommation du tabac après la Première Guerre mondiale, ont considérablement augmenté ces chiffres. De nos jours, le cancer du poumon est la cause la plus fréquente de décès par cancer dans le monde et représente 1,8 million de décès pour l'année 2020. Lorsque les cellules cancéreuses migrent et métastasent, le cancer est dit « généralisé » puisque plusieurs organes ou tissus sont touchés et dans une grande majorité des cas, les cancers du poumon sont diagnostiqués à ce stade (Figure 1.3) (Howlader et al., 2021). En effet, la tumeur primaire reste souvent silencieuse, c'est alors l'augmentation du nombre de tumeur et leurs différentes localisations qui, diminuant l'état général du patient, déclenche l'alerte. Les complications liées à la présence de différentes tumeurs dans l'organisme diminuent fortement l'espérance de vie du patient. Il est donc important de diagnostiquer à des stades précoces les patients cancéreux afin de réduire rapidement la progression tumorale. Pour cela, il faut améliorer les connaissances des mécanismes cellulaires qui initient ou participent à la prolifération des cellules cancéreuses.



**Figure 1.3 : Pourcentage des cas de cancer du poumon par stade.**

Adaptée de (Howlader et al., 2021).

### 1.2.1. L'incidence et la mortalité du cancer du poumon

Les estimations statistiques de GLOBACAN (*global cancer statistics*) des incidences et de mortalités des cancers générés par le Centre International de Recherche sur le Cancer (*international agency for research on cancer*, IARC) annoncent 2 206 771 nouveaux cas de cancer du poumon homme et femme confondus pour l'année 2020 (Sung et al., 2021). Cela place le cancer du poumon le deuxième cancer le plus fréquent au monde après le cancer du sein. Cependant, il est la cause la plus fréquente de décès par cancer avec 1 796 144 décès en 2020 dans le monde, représentant ainsi 18% des décès par cancer (21,5% pour les hommes, 13,7% pour les femmes après le cancer du sein). La forte mortalité du cancer du poumon est en partie expliquée par les diagnostics tardifs et des taux de survie faible. En effet, la moitié des patients nouvellement diagnostiqués avec un cancer du poumon le sont à des stades métastatiques. Ainsi, les taux de réussite d'intervention clinique sont réduits et par conséquent, leur taux de survie de 5 ans n'est que de 5% (Howlader et al., 2021). L'importance de dépistage et diagnostic précoce prend alors tout son sens quant aux chances de réussites de guérison du cancer du poumon, et de nouveaux outils émergent afin de développer des méthodes de routine et faciles d'accès, permettant de détecter les tumeurs asymptomatiques à un stade précoce, tels que l'utilisation des biopsies liquides pour la détection des cellules cancéreuses circulantes (Herbreteau et al., 2018; Hofman, 2021; Ilie et al., 2014; Marquette et al., 2020).

### 1.2.2. Les facteurs de risque

#### 1.2.2.1. Le tabac

Le tabagisme est la première cause de décès liée au cancer dans le monde. En effet, le tabac est le principal facteur de risque du développement de cancer de poumon et plus de 8 cancers du poumon sur 10 sont causés par le tabac (Kulhánová et al., 2020). Ainsi, les fumeurs sont 22 fois plus susceptibles de développer un cancer du poumon que les non-fumeurs. Ce risque augmente avec le nombre d'année de consommation de tabac ainsi que le nombre de cigarette fumée par jour. Alors que la molécule de nicotine en elle-même ne participe pas à la cancérogénèse, c'est la dépendance qu'elle engendre chez les fumeurs à la consommation régulière de cigarette qui la rend dangereuse : la fumée de cigarette contient une mixture de 7000 éléments dont plus de 60 cancérogènes. Les cancérogènes les plus nocifs sont les nitrosamines spécifiques du tabac, les amines aromatiques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques, dont le benzo[a]pyrène (BP) qui a été le premier cancérogène détecté dans la fumée de cigarette et est devenu le plus étudié (Hecht, 2003; Sarlak et al., 2020). Il est transformé par activation métabolique dans les poumons en BP-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE) et interagit avec les guanines de l'ADN : si ces interactions covalentes à l'ADN, appelées adduits à l'ADN, ne sont

pas corrigées par les mécanismes de réparation cellulaire, elles peuvent engendrer des mutations génétiques permanentes. Les nitrosamines spécifiques du tabac sont des molécules toxiques synthétisées lors du séchage du tabac par nitrosation des alcaloïdes et sont également métaboliquement activées dans les poumons après inhalation de la fumée de cigarette. Outre leur rôle dans la formation d'adduits à l'ADN, elles sont susceptibles d'activer des voies de survie et de prolifération des cellules épithéliales ainsi que de reprogrammer leur métabolisme (Hecht, 1999; Sarlak et al., 2020). De plus, chaque fumée de cigarette produit 10 000 milliards de radicaux libres, contribuant à l'initiation et la promotion de ROS ce qui induit des cassures des brins de l'ADN, mais participe également à la formation d'adduits à l'ADN par le BPDE (Alexandrov et al., 2006). L'inhalation de fumée de cigarette par les non-fumeurs, de la fumée de cigarette dégagée par un fumeur, appelé tabagisme passif, est tout aussi dangereux : la composition de la fumée de cigarette se consumant est similaire à celle de la fumée inhalée par le fumeur. Dans les années 1980, un risque accru de cancer de poumon de personnes non-fumeuses vivant avec des fumeurs a été démontré et une récente méta-analyse suggère que le tabagisme passif augmente le risque de 25% de développer un cancer du poumon chez un non-fumeur (Kim et al., 2018). Il a fallu attendre les débuts 2000 pour que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) reconnaisse le tabagisme passif comme facteur à risque du cancer du poumon.

#### 1.2.2.2. L'inflammation chronique

Dans les voies aériennes, l'inflammation peut être initiée par la présence de particules fines de différentes natures, conduisant à une inflammation chronique lorsque cette exposition est répétée sur plusieurs années. La production récurrente de cytokines pro-inflammatoires et de ROS par le biais des macrophages et des neutrophiles favorisent la formation d'adduits à l'ADN, l'instabilité génétique et l'émergence de mutations dans les cellules épithéliales avoisinantes. De plus, la sécrétion des chimiokines et des cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 pour ne citer qu'elles, participe à la formation d'un environnement favorable à la progression des tumeurs et modifient les réponses immunitaires vers une réponse dite « permissive » (Guilbaud et al., 2019; Mantovani et al., 2008).

Une des maladies pulmonaires engendrées par une inflammation chronique est la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Elle est caractérisée par une inflammation des voies aériennes et plus particulièrement des bronches, et conduit progressivement à la détérioration des tissus épithéliaux, affectant d'une part la fonction pulmonaire mais également l'intégrité génomique favorisant le développement de cancer (Parris et al., 2019). En effet, alors que le tabagisme est un facteur de risque à la fois de la BPCO et du cancer du poumon, le cancer du poumon est jusqu'à 5 fois plus susceptible de survenir chez les fumeurs souffrant d'obstruction des voies respiratoires que chez des personnes saines (Young and Hopkins, 2010). Par conséquent, outre son rôle cancérigène, le tabac est un facteur favorisant le

développement de BPCO et l'inflammation chronique, mais ce n'est pas le seul : l'amiante est un matériel de silicate longtemps utilisé dans la construction et l'isolation des bâtiments, cependant, les fibres d'amiantes extrêmement fines se déposent au niveau des voies aériennes lorsqu'elles sont inhalées et provoquent de nombreuses maladies respiratoires ainsi qu'augmentent le risque de développer un cancer du poumon. En effet, l'exposition au fil des années induit une irritation et une inflammation chronique. Malgré l'interdiction de l'utilisation de l'amiante par la France en 1997, des années après sa classification en agent cancérigène par l'IARC en 1973, l'amiante est encore présente dans de nombreux bâtiments. De ce fait, l'amiante est le facteur de risque le plus fréquent pour les cancers de poumon d'origine professionnelle et entre 1600 à 4500 cas de cancer du poumon ont été recensés en 2019 en France causés par l'amiante selon l'Agence nationale de santé publique. De plus, l'environnement atmosphérique est un facteur important impliqué dans le développement de cancer de poumon induit par une inflammation chronique. L'émission de particule par les véhicules est la principale source de pollution de l'air extérieur, occasionnée par le monoxyde de carbone, des particules, du dioxyde d'azote, l'ozone, des aldéhydes, du benzène, du 1,3-butadiène, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, du benzo[a]pyrène et des métaux (Trédaniel et al., 2009), responsables de nombreuses maladies aiguës et chroniques ainsi que du développement de cancer du poumon (Zhou, 2019). De ce fait, l'IARC a classé la pollution de l'air comme cancérigène pour l'homme en 2013 (Loomis et al., 2013). Dans certaines régions du monde, en plus de la pollution automobile, les industries sont une source majeure de pollution atmosphérique. La qualité de l'air est alors primordiale, cependant, il a été reporté que 91% de la population mondiale en 2016 vivait dans des milieux où les recommandations de l'OMS quant à la qualité de l'air n'étaient pas respectées (WHO, Nov 2018).

### 1.2.3. Les types histologiques du cancer du poumon

Les cancers du poumon sont traditionnellement classés en deux groupes histologiques principaux : les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC), en opposition aux cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) et représentent respectivement 15% et 85% des cancers pulmonaires diagnostiqués (Schabath and Cote, 2019). Les CBPC sont des formes agressives et sont pour la plupart traités de manière non chirurgicale tandis que les CBNPC peuvent être pris en charge par une combinaison chirurgicale et de thérapie adjuvante. Les CBNPC sont généralement subdivisés en 3 sous-types histologiques distincts : le carcinome à grandes cellules, le carcinome épidermoïde et l'adénocarcinome, ce dernier étant le sous-type de CBNPC le plus répandu. La classification histopathologique du cancer du poumon est régulièrement soumise à des révisions grâce à l'amélioration des profils moléculaires des différents types, et la dernière en date a été réalisée en 2015 par l'OMS (Tableau 1.1) (Travis et al., 2015). Cela permet de mettre en corrélation la morphologie des cellules tumorales avec les caractéristiques biologiques de la tumeur, facilitant ainsi la

prise de décision thérapeutique et la prédiction efficace du pronostic à l'ère de la médecine personnalisée.

<b>Les tumeurs neuroendocrines (NET)</b>
Tumeur carcinoïde
Carcinoïde typique
Carcinoïde atypique
Carcinoïde à petite cellule
Carcinoïde à petite cellule neuroendocrine
<b>Les carcinomes à grande cellule</b>
<b>Les carcinomes épidermoïdes</b>
Carcinome kératinisant
Carcinome non kératinisant
Carcinome basaloïde
<b>Les adénocarcinomes</b>
Adénocarcinome in situ (AIS)
Adénocarcinome peu invasif (MIA)
Adénocarcinome invasif
Adénocarcinome lépidique
Adénocarcinome acineux
Adénocarcinome papillaire
Adénocarcinome micro-papillaire
Adénocarcinome solide
Adénocarcinome mucineux
Adénocarcinome colloïde
Adénocarcinome de type foetal
Adénocarcinome entérique
<b>Carcinome adénosquameux</b>
<b>Carcinome pléomorphe</b>
<b>Carcinome à cellules fusiformes</b>
<b>Carcinome à cellules géantes</b>
<b>Carcinosarcome</b>
<b>Blastome pulmonaire</b>

**Tableau 1.1 : Classification histologiques des tumeurs pulmonaires.**  
 Classification selon l'OMS 2015, traduite et adaptée de (Travis et al., 2015).

### 1.2.3.1. Les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC)

La nouvelle classification de l'OMS en 2015 a reconnu les CBPC comme l'une des quatre tumeurs pulmonaires présentant une différenciation neuroendocrine, formant la famille des tumeurs neuroendocrine (NET) (Travis et al., 2015). Les CBPC sont constituées de petites cellules cancéreuses ce qui leur a originellement valu leur nom et sont classés en NET de haut grade dû à des taux élevés de prolifération des cellules cancéreuses ainsi que la présence de nécrose (Zheng, 2016). De ce fait, les CBPC sont des formes particulièrement agressives et mortelles de cancer du poumon et sont caractérisées par une croissance rapide et des métastases précoces. Ainsi, les patients sont majoritairement diagnostiqués au stade métastatique de la maladie et le taux de survie de 2 ans est de moins de 10% (Howlader et al., 2021).

### 1.2.3.2. Les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC)

Parmi les CBNPC, les 3 sous-types histologiques les plus communs sont les carcinomes à grandes cellules (3,5-15%), les carcinomes épidermoïdes (20-30%) et les adénocarcinomes (40%-60%) (Travis et al., 2015; Zheng, 2016). L'adénocarcinome représente alors le sous-type histologique le plus répandus parmi les cancers du poumon et de ce fait, mes recherches de thèse se sont portées uniquement sur ce sous-type. La suite du manuscrit se focalisera donc sur les adénocarcinomes pulmonaires.

#### 1.2.3.2.1. Les caractéristiques des adénocarcinomes

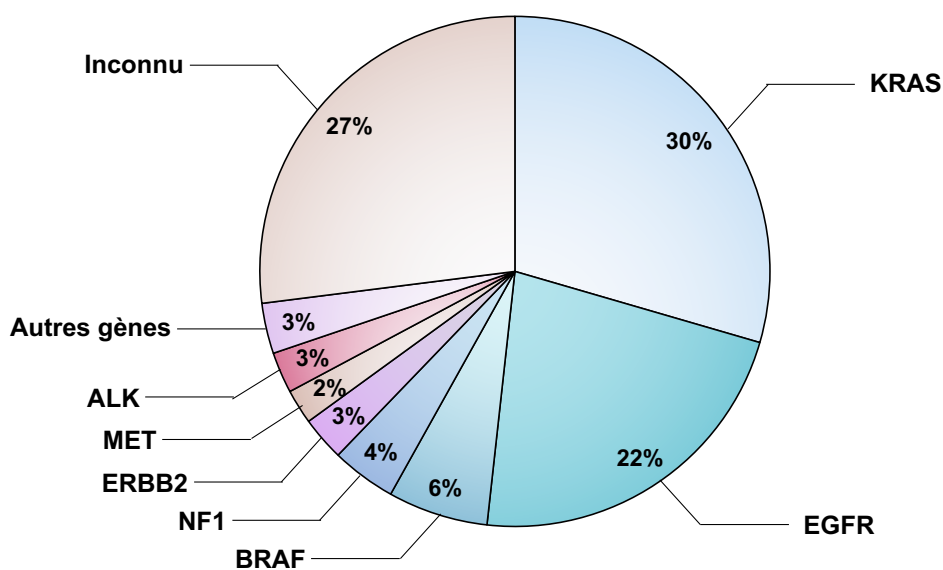
Les adénocarcinomes pulmonaires sont les sous-types de cancer les plus retrouvés chez les non-fumeurs mais pour autant, ils sont également fortement associés au tabagisme, ainsi qu'à la BPCO (Parris et al., 2019). La classification de l'OMS de 2015 divise les adénocarcinomes en adénocarcinome *in situ* (AIS, lésion préinvasive), adénocarcinome peu invasif (MIA) ou adénocarcinome invasif (manifeste) en fonction du degré d'invasivité (Travis et al., 2015). La composition de mélanges hétérogènes des adénocarcinomes invasifs complique leur sous classification puisqu'il est rare de trouver un type histologique pure. Néanmoins, la classification de l'OMS divise l'adénocarcinome invasif selon cinq schémas prédominants : l'adénocarcinome lépidique (anciennement appelé broncho-alvéolaires), l'acineux, le papillaire, le micro-papillaire et le solide et les analyses morphologiques et immunohistochimiques permettent de mieux classer et diagnostiquer les différents sous-types d'adénocarcinomes.

L'adénocarcinome pulmonaire prend son origine en périphérie des poumons, au niveau des glandes muqueuses et les cellules cancéreuses expriment généralement des marqueurs des cellules épithéliales alvéolaires. Les gènes identifiés les plus fréquemment altérés dans les adénocarcinomes pulmonaires sont impliqués dans la

voie de signalisation EGFR/RAS/RAF. En effet, les mutations touchant les gènes *Kras* et *Egfr* représentent respectivement 30 et 22% des mutations identifiées des adénocarcinomes (Skoulidis and Heymach, 2019). Les possibilités de traitement dépendent du stade d'avancement de la maladie lors du diagnostic : l'adénocarcinome est sujet à la chirurgie s'il est localisé, correspondant aux types AIS et MIA. Cependant, puisque les adénocarcinomes développent rapidement des métastases, d'autres thérapies alternatives sont proposées.

#### 1.2.3.2.2. Les principales mutations

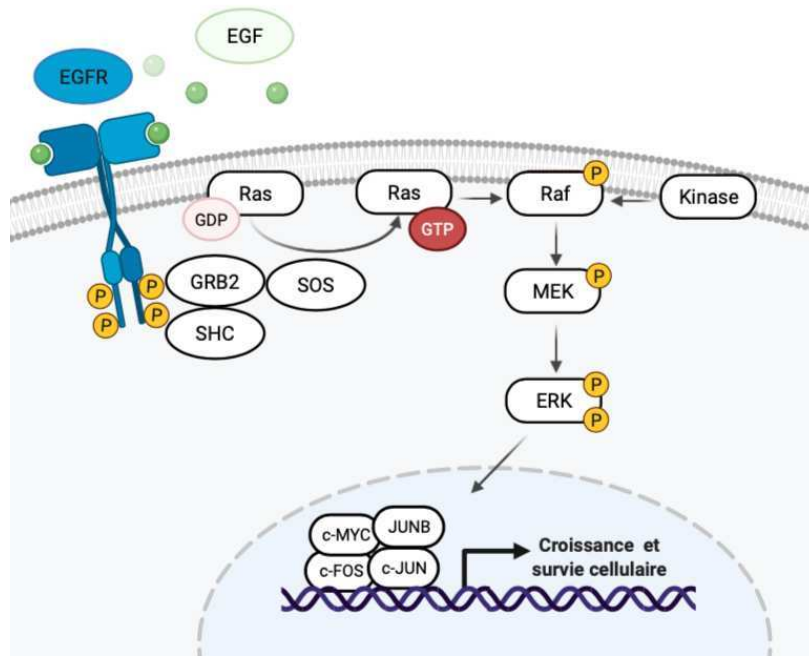
Tout gène cellulaire susceptible d'acquérir des modifications génétiques capable de transformer des cellules conduisant au développement de cancer est appelé proto-oncogène. La conversion ou l'activation d'un proto-oncogène en oncogène implique généralement une mutation gain de fonction. Parmi les nombreux oncogènes connus, la grande majorité sont issu de proto-oncogènes responsables de l'acquisition de nouvelles compétences importantes dans le développement tumoral telles que l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, l'insensibilités aux signaux antiprolifératifs, la capacité d'échapper à la mort cellulaire programmée, la capacité d'induire l'angiogenèse et l'acquisition d'un phénotype permettant la dissémination (Figure 1.4) (Hanahan and Weinberg, 2011). De plus, de nombreuses mutations en aval des oncogènes initiateurs de tumeurs sont retrouvées dans les adénocarcinomes : des altérations génomiques concomitantes, en particulier dans les gènes suppresseurs de tumeurs tels que TP53, sont apparues comme des déterminants essentiels de l'hétérogénéité moléculaire et clinique des différents types d'adénocarcinomes induits par les oncogènes (Skoulidis and Heymach, 2019).



**Figure 1.4 : Les principales mutations des adénocarcinomes pulmonaires.**

Analyse des principales mutations oncogéniques à l'origine du développement des adénocarcinomes pulmonaires. Le pourcentage des mutations identifiées dans les stades précoces et métastatiques a été moyenné. Adaptée de (Skoulidis and Heymach, 2019).

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est un récepteur tyrosine kinase transmembranaire qui, lorsqu'il est activé par l'EGF, permet l'activation des voies de signalisation intracellulaire activant tout un réseau de signalisation associé à un grand nombre de processus cellulaires, tels que la prolifération cellulaire, la croissance, la différenciation, la migration et l'inhibition de l'apoptose (Figure 1.5) (Wee and Wang, 2017). Le récepteur EGFR est composé d'un domaine N-terminal extracellulaire portant le site de fixation du ligand, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine C-terminal à activité tyrosine kinase. Il existe différentes formes membranaires de l'EGFR et en fonction de l'état homo- et/ou hétérodimérisé du récepteur ainsi que de la forme activée, les voies de signalisation et leurs protéines impliquées seront différentes : on y retrouve notamment la voie RAS-RAF-MEK-ERK MAP Kinase (*mitogen activated protein kinase*) (Zhang and Liu, 2002).



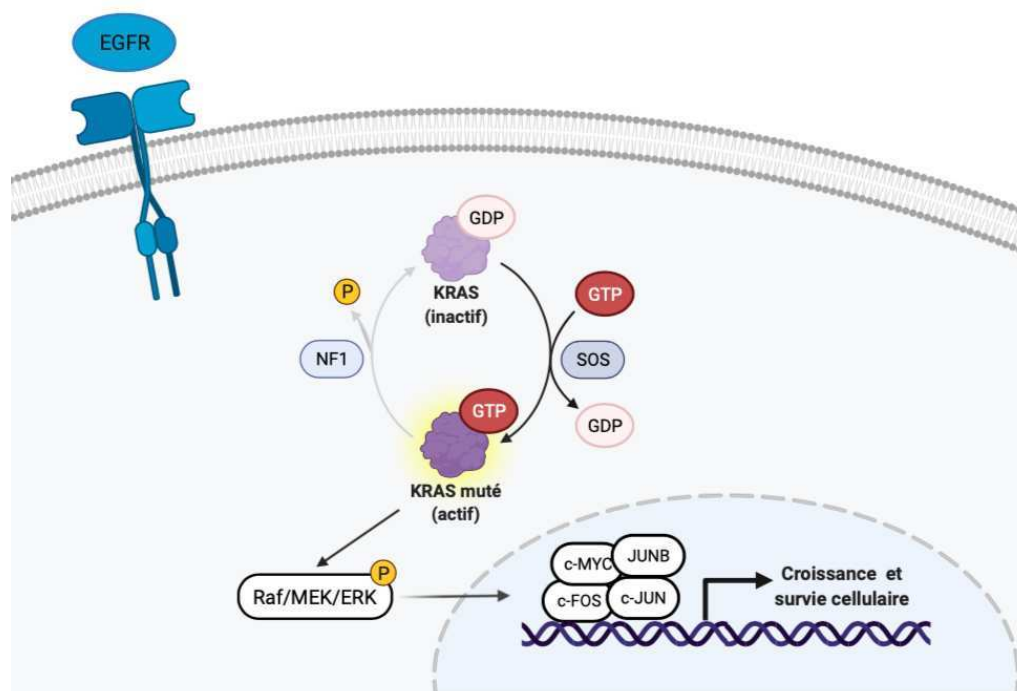
**Figure 1.5 : La voie de l'EGFR et des RAS-RAF-MEK-ERK.**

La liaison du ligand EGF sur son récepteur EGFR permet l'activation du récepteur conduisant à son autophosphorylation. Les facteurs GRB2 et SHC sont alors recrutés sur ces sites phosphorylés, permettant le recrutement de SOS, qui active alors RAS par la catalyse du GDP en GTP. Ras-GTP activé phosphoryle et active une voie de signalisation impliquant des MAP Kinases qui sont RAF-MEK-ERK. ERK transactive les facteurs de transcription permettant l'expression des gènes impliqués dans la croissance et la survie cellulaire pour ne citer qu'eux.

La fixation du ligand à l'EGFR entraîne l'autophosphorylation des tyrosines de la région C-terminale intracellulaire du récepteur, reconnue par la suite par les protéines contenant un domaine Src homology-2 (SH2). Ainsi, les adaptateurs de signalisation GRB2 et SHC permettent le recrutement à la membrane de SOS, un facteur d'échange de nucléotides de guanine GTP (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF). La relocalisation de SOS permet son interaction avec RAS. RAS représente une

superfamille de protéine, appartenant à la famille des petites protéines G possédant une activité GTPasique. Ces protéines existent sous deux formes : une forme active liée au GTP et une inactive liée au GDP. Lorsque SOS est activée, elle catalyse la conversion du RAS-GDP en RAS-GTP permettant ainsi l'activation de RAS par des changements de conformation. RAS est par ailleurs désactivée par son activité GTPase intrinsèque, qui catalyse son GTP en GDP, un processus qui peut être accéléré par des protéines activatrices de GTP (*GTP activating factor*, GAP), telles que NF1 (*neurofibromine 1*). La protéine RAS couplée au GTP va à son tour recruter à la membrane la protéine RAF, une MAP Kinase Kinase Kinase. RAF active par phosphorylation la MAP Kinase Kinase MEK, qui elle-même active par phosphorylation la MAP Kinase ERK (*extracellular signal regulated kinase*) (Wee and Wang, 2017). Une fois doublement phosphorylé, ERK est transloqué dans le noyau et transactive les facteurs de transcription tels que c-FOS, c-MYC, c-JUN ou JUNB conduisant à l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire.

Les mutations de l'EGFR sont retrouvées dans 22% des adénocarcinomes pulmonaires (Skoulidis and Heymach, 2019). Les mutations les plus fréquentes sont initiées par le remplacement de la lysine au codon 858 par une arginine (L858R) ainsi qu'une délétion de l'exon 19 (Rosell et al., 2009). Cela induit une activation de l'activité kinase de l'EGFR. Néanmoins, la pression sélective à la suite des traitements par les agents ciblant les mutations de l'EGFR favorise l'émergence de cellules cancéreuses présentant de nouvelles mutations, conférant une résistance des cellules cancéreuses aux traitements (Passaro et al., 2021). En plus des mutations identifiées sur le gène de l'EGFR, les gènes codant les protéines de signalisation intracellulaire en aval de ce récepteur sont également susceptibles d'acquérir des mutations oncogéniques, soulignant l'importance de cette voie de signalisation de survie dans le développement de cancer. La protéine V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, communément appelé KRAS appartient à la superfamille des protéines RAS. Les mutations identifiées touchant le gène *Kras* sont des mutations activatrices et confèrent une activation constitutive de KRAS en empêchant l'hydrolyse du GTP (Figure 1.6) (Yang et al., 2019). Les mutations du gène *Kras* sont retrouvés dans 30% des adénocarcinomes pulmonaires et touchent principalement les codons 12 et 13 du gène (Skoulidis and Heymach, 2019). La glycine en position 12 peut être remplacée par une cystéine, une valine, une aspartate, une alanine ou une sérine représentant ainsi les mutations G12C, G12V, G12D, G12A, et G12S dont les plus fréquentes dans les adénocarcinomes sont les mutations G12C, avec près de la moitié des cas, suivies de G12V et G12D (Salgia et al., 2021). La protéine KRAS est une protéine G de signalisation en aval de l'EGFR, ainsi, les mutations générant une forme constitutivement active de cette protéine rendent insensible KRAS à l'état d'activation de l'EGFR et les mutations de KRAS confèrent une résistance aux inhibiteurs de l'EGFR. De plus, les mutations de l'EGFR et de KRAS sont généralement mutuellement exclusives (Ding et al., 2008; Skoulidis and Heymach, 2019).



**Figure 1.6 : L'activation constitutive de KRAS.**

Les mutations générant les formes KRAS oncogéniques entraînent une liaison de forte affinité du GTP et la perte de la régulation de la GTPase, laissant ainsi KRAS dans un état constitutivement actif et dérégulant diverses voies de signalisation qui dépendent de l'activité de KRAS, indépendamment de la présence de ligand activant l'EGFR en amont et donc de son état d'activation.

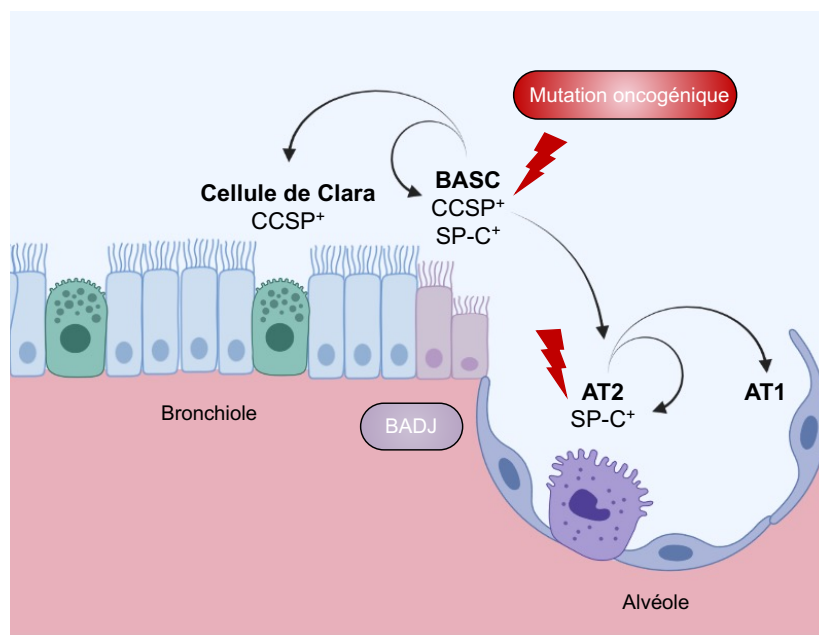
Le gène P53 (*tumor protein 53*, TP53), découvert en 1970 a d'abord été considéré comme étant un proto-oncogène, avant de finalement être classé en gène suppresseur de tumeur. Différents stress intrinsèques et extrinsèques des cellules permettent l'activation de P53, le principal stress étant engendré par des dommages à l'ADN (Lakin and Jackson, 1999). Les protéines telles que les kinases ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), ATR (*ataxia telangiectasia and rad3-related protein*) ainsi que CHK2 (*checkpoint kinase 2*), qui détectent les dommages à l'ADN communiquent à P53 la présence de lésion. Cette communication est établie par des modifications post-traductionnelles telles que par la phosphorylation dans le cas des kinases citées, mais cela peut également être des acétylations, des méthylation, des ubiquitinations ou des sumolations de P53. Les modifications post-traductionnelles induisent des changements de conformation de P53, permettant de stabiliser la protéine en augmentant sa durée de demi-vie, mais également sa capacité à se lier à des séquences spécifiques d'ADN et donc d'induire l'expression de gènes spécifiques impliqués dans la réponse aux dommages cellulaires telle que l'arrêt du cycle cellulaire et/ou l'apoptose par exemple (Vogelstein et al., 2000). Ces stress cellulaires introduisent finalement des altérations génomiques, notamment des mutations, des délétions et/ou des translocations dans le génome cellulaire et induisent ainsi une instabilité génomique et P53 permet d'empêcher cela. Ainsi, le gène suppresseur de tumeur P53 est muté dans 46% des adénocarcinomes et ces mutations vont empêcher

la liaison spécifique de P53 à l'ADN ce qui abolit son activité transcriptionnelle. De ce fait, les cellules dont l'ADN est endommagé peuvent continuer à se diviser, conduisant alors à l'accumulation de mutations. Les mutations de P53 sont plus fréquemment observées avec des stades de cancers avancés, ce qui suggère un rôle dans la progression de la tumeur plutôt que l'initiation (Herbst et al., 2018).

#### 1.2.3.2.3. Origine cellulaire des adénocarcinomes pulmonaires

La mutation oncogénique et le type cellulaire épithélial dans lequel cette mutation sera exprimée vont grandement influencer le type histologique de cancer du poumon. Les cellules à l'origine des cancers sont probablement les cellules possédant la capacité de proliférer et de se diviser, correspondant alors aux cellules souches ou aux cellules progénitrices. Ainsi, l'hypothèse des cellules souches cancéreuses stipule que dans certains cancers hétérogènes comme l'adénocarcinome pulmonaire, il existe une sous-population de cellules souches cancéreuses indifférenciées qui sont responsables de la tumorigenèse par le biais d'un dérèglement du processus d'auto-renouvellement (Wicha et al., 2006). Il existe différentes niches de population cellulaires au sein des poumons qui permettent le renouvellement de cellule et le maintien de l'intégrité de l'épithélium tout le long des voies respiratoires (Cheung and Nguyen, 2015; Li et al., 2015). Ces populations spécialisées de cellules souches et progénitrices sont capables de proliférer constituant une source permanente de renouvellement cellulaire dans des conditions physiologiques mais également après de multiples lésions. Si les cellules progénitrices acquièrent des mutations oncogéniques, elles peuvent initier le développement de cancer du poumon.

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont tenté d'élucider l'identité des cellules souches et progénitrices alvéolaires ainsi que leur devenir précis. A l'heure actuelle les preuves semblent converger vers l'existence d'une population cellulaire définie : les cellules souches broncho-alvéolaires (*bronchoalveolar stem cells*, BASCs) sont localisées dans une région précise, appelée jonction broncho-alvéolaire (*bronchoalveolar duct junction*, BADJ), entre les bronchioles terminales et l'espace alvéolaire (Liu et al., 2020; Salwig et al., 2019) (Figure 1.7). Les BASCs sont des cellules souches capable de régénérer les cellules de Clara des bronches lors de dommages pulmonaires, mais également les cellules AT2 présentes aux niveaux des alvéoles. Tout d'abord, les BASCs sont les premières cellules à proliférer en réponse à l'activation de l'oncogène KRAS *in vivo*, suggérant leur rôle dans la tumorigenèse (Kim et al., 2005). De plus, l'expression de la forme mutée *Kras* dans les cellules AT2 grâce à l'utilisation d'un promoteur spécifique *in vivo*, conduit également à la formation d'adénocarcinome pulmonaire (Desai et al., 2014). Le potentiel oncogénique des BASCs ainsi que des cellules AT2 pourrait être une conséquence directe de leurs propriétés de cellules progénitrices.



**Figure 1.7 : L'origine cellulaire des adénocarcinomes pulmonaires.**

Situées à la jonction bronchio-alvéolaires (BADJ), les BASCs (*bronchoalveolar stem cells*) sont CCSP<sup>+</sup> (*clara cell secretory protein*) et SP-C<sup>+</sup> (*surfactant protein C*) sont essentielles à la reconstitution des cellules ciliées de Clara (CCSP<sup>+</sup>) dans l'épithélium des voies respiratoires ainsi que des cellules AT2 (SP-C<sup>+</sup>) dans l'alvéole, en plus de s'autorenouveler. Les AT2 sont également des cellules progénitrices, qui s'auto-renouvelle et qui sont les précurseurs des AT1. Les mutations oncogéniques sont susceptibles de se produire dans les BASCs ainsi que les AT2, induisant alors le développement d'adénocarcinomes pulmonaires. Adapté de (Basil and Morrissey, 2019).

#### 1.2.4. Le diagnostic et les traitements du cancer du poumon

##### 1.2.4.1. La classification des stades de cancer du poumon

La classification dite TNM est une classification internationale, inventée par le chirurgien Denoix dans les années 1950 afin de fournir une nomenclature universelle de pronostic du patient. Ce système décrit les caractéristiques de la taille de la tumeur primaire (T), la propagation dans les ganglions lymphatiques drainant (N, pour node en anglais) ainsi que l'état métastatique de la maladie (M) : une série de chiffre est attribuée à chaque lettre permettant d'en décrire l'état. Plus précisément, les éléments tels que la taille, la présence et l'étendue de l'invasion tumorale locale, ainsi que la présence et la localisation de nodules tumoraux distincts seront indiqués par la lettre T (Tableau 1.2). Le numéro attribué à la lettre N permet de déterminer la présence ou l'absence d'atteinte des ganglions lymphatiques intrathoraciques alors que celui de la lettre M indiquera la présence de métastase ainsi que leur localisation (Carter et al., 2018). La classification TNM récemment réévaluée des cancers du poumon est solidement construite sur l'analyse de 94 708 cas de cancer de poumons, collecté entre les années 1999 et 2010 dans plus de 16 pays différents, s'ajoutant ainsi aux descriptions préalablement réalisées avant cette 8<sup>ième</sup> édition (Goldstraw et al., 2016).

<b>Descripteur T</b>	
<b>TX</b>	Tumeur primaire non connue ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les sécrétions broncho-pulmonaires mais non visible aux examens radiologiques et endoscopiques.
<b>T0</b>	Absence de tumeur identifiable.
<b>Tis</b>	Carcinome in situ.
<b>T1</b>	Tumeur de 3 cm ou moins dans ses plus grandes dimensions, sans évidence d'invasion plus proximale que les bronches lobaires à la bronchoscopie.
<b>T1a(mi)</b>	Adénocarcinome minimalement-invasif.
<b>T1a</b>	≤ 1cm
<b>T1b</b>	> 1 cm et ≤ 2 cm
<b>T1c</b>	> 2 cm et ≤ 3 cm
<b>T2</b>	Tumeur de plus de 3 cm, mais de moins de 5 cm OU avec un quelconque des éléments suivants - envahissement d'une bronche souche quelle que soit sa distance par rapport à la carène mais sans envahissement de la carène, - envahissement de la plèvre viscérale, - existence d'une atélectasie ou pneumonie obstructive
<b>T2a</b>	> 3 cm mais ≤ 4 cm
<b>T2b</b>	> 4 cm mais ≤ 5 cm
<b>T3</b>	Tumeur de plus de 5 cm et de moins de 7 cm, OU associée à un(des) nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) dans le même lobe, OU envahissant directement : - la paroi thoracique (incluant les tumeurs du sommet), - le nerf phrénique, - la plèvre pariétale ou le péricarde pariétal.
<b>T4</b>	Tumeur de plus de 7 cm OU associée à des nodules tumoraux séparés dans deux lobes différents du même poumon, OU envahissant directement : - le médiastin, - le cœur ou les gros vaisseaux, - la trachée, ou la carène - le diaphragme, - le nerf récurrent, - l'œsophage, - un(des) corps vertébral(ux).
<b>Descripteur N</b>	
<b>Nx</b>	Envahissement locorégional inconnu.
<b>No</b>	Absence de métastase dans les ganglions lymphatiques régionaux.
<b>N1</b>	Métastases ganglionnaires péri-bronchiques homolatérales et/ou hilaires homolatérales incluant une extension directe.
<b>N2</b>	Métastases dans les ganglions médiastinaux homolatéraux ou dans les ganglions sous-carénaux.
<b>N3</b>	Métastases ganglionnaires médiastinales controlatérales ou hilaires controlatérales ou scaléniques, sus-claviculaires homo- ou controlatérales.
<b>Descripteur M</b>	
<b>M0</b>	Pas de métastase à distance.
<b>M1</b>	Existence de métastases :
<b>M1a</b>	Nodule(s) tumoral(ux) séparés dans un lobe controlatéral, ou nodules pleuraux ou pleurésie maligne ou péricardite maligne
<b>M1b</b>	Une seule métastase extra-thoracique dans un seul organe.
<b>M1c</b>	Plusieurs métastases extrathoraciques dans un seul ou plusieurs organes.

**Tableau 1.2 : 8ième classification TNM du cancer du poumon.**

Adapté de (Brierley et al., 2016) (Couraud, 2021)

A partir des descriptions de la classification TNM, il sera possible d'attribuer un stade clinique ou pathologique, signalé par le préfixe c ou p respectivement, d'avancement du cancer du poumon. Le stade clinique est basé sur les résultats d'examen physiques, de biopsies et d'imagerie, alors que le stade pathologique nécessite la chirurgie et l'évaluation approfondie des tissus (Detterbeck et al., 2017). De manière succincte, les cancers du poumon localisés seront décrits en stade I et II, stade III lorsque la maladie est localement avancée et stade IV lorsqu'elle est métastatique. Il est important de définir et d'attribuer un stade clinique de développement de cancer afin de pouvoir déterminer la meilleure option thérapeutique.

#### 1.2.4.2. Les traitements du cancer du poumon

La prise en charge thérapeutique du patient atteint de cancer du poumon dépendra de différents paramètres, les principaux étant la localisation de la tumeur primaire et l'état métastatique du patient, cela précisé par la classification TNM décrite dans le paragraphe précédent. Les patients seront alors éligibles aux différentes thérapies, séparément ou en association, allant des thérapies classiques telles que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, à des thérapies personnalisées nécessitant des analyses génétiques et moléculaires. En effet, durant ces 20 dernières années, les progrès dans la compréhension de la biologie du cancer du poumon avec l'identification de biomarqueurs telles que l'étude des altérations génomiques des cellules cancéreuses ont permis l'émergence de thérapies ciblées ainsi que de l'immunothérapie améliorant subséquemment l'efficacité des traitements (Pennell et al., 2019).

##### 1.2.4.2.1. La chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie

La chirurgie a pour objectif de retirer la tumeur dans sa totalité et est envisagée uniquement pour les patients de stades précoces (stades I et II), lorsque la tumeur est encore localisée et que l'état général du patient permet de supporter l'ablation d'une partie ou du lobe du poumon atteint (Howington et al., 2013). Une thérapie néoadjuvante peut être administrée au patient avant ablation afin de réduire la taille de la tumeur, ainsi qu'une thérapie adjuvante, après ablation, pour limiter le risque de rechute du cancer (Zappa and Mousa, 2016). La radiothérapie cible la région tumorale et utilise des faisceaux à haute énergie pour endommager l'ADN des cellules cancéreuses et ainsi les détruire. Cette thérapie est accordée aux patients dont la tumeur est localisée mais non éligible à la chirurgie. En plus des effets cytotoxiques, qui correspondent à la mort des cellules sous l'action des rayonnements ionisants, les dommages causés à l'ADN par le rayonnement sont aussi à l'origine de nombreux effets pro-inflammatoires (Lhuillier et al., 2019). En effet, des données précliniques ont permis de démontrer que les cellules cancéreuses irradiées exposent de nouveaux antigènes, augmentant ainsi la reconnaissance des LTs ce qui a pour conséquence

leur activation et le déclenchement d'une immunité anti-tumorale. De manière intéressante, cet effet anti-tumoral peut également avoir un lieu en dehors du champ du site de l'irradiation, appelé effet abscopal, ce qui participe à l'éradication des métastases (Rodríguez-Ruiz et al., 2018, 2020). Ainsi, cette réponse peut être améliorée par la combinaison des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire en plus de la radiothérapie (Ngwa et al., 2018). La chimiothérapie cytotoxique est le traitement de première ligne des patients atteints de stade IV. En effet, la prise médicamenteuse pourra cibler les cellules tumorales disséminées dans d'autres tissus du site primaire (Zappa and Mousa, 2016). La chimiothérapie consiste à administrer aux patients des molécules toxiques détruisant les cellules cancéreuses : elles vont empêcher la synthèse d'ADN indispensable à la duplication des cellules et détruisent le cytosquelette. Ces molécules cytotoxiques ciblent par conséquent principalement les cellules en prolifération ce qui entraînent alors différents effets secondaires puisque de nombreuses cellules saines du corps prolifèrent également (Huang et al., 2017). Un traitement systémique est nécessaire aux patients de stade avancés et bien que la plupart des patients bénéficient d'un traitement à base de platine, c'est à dire un agent alkylant, lorsque la caractérisation moléculaire est réalisée et permet d'identifier les mutations de gènes, d'autres thérapies alors sont possibles.

#### 1.2.4.2.2. La thérapie ciblée

Au moment du diagnostic des stades avancés de cancer du poumon, des tests moléculaires sont effectués à partir des tissus afin de déterminer la présence de mutation ou de réarrangements génétiques conductrice du développement du cancer (Arbour and Riely, 2019). L'identification de mutations récurrentes a permis de développer des agents plus spécifiques que ceux utilisés en chimiothérapie cytotoxique classique, permettant d'augmenter en efficacité et de diminuer les cibles non spécifiques ainsi que les effets secondaires indésirables. Les principaux agents ciblant les mutations du gène de l'EGFR et des mutations de KRAS seront décrits.

Les patients présentant des mutations sur le gène de l'EGFR sont traités avec des inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI), des petites molécules qui entrent en compétition avec l'ATP pour l'activation de la kinase (Passaro et al., 2021). Cependant, de nouvelles mutations telle que la mutation T790M sont apparues après le traitement des patients avec des EGFR-TKI de première et deuxième génération, provoquant alors la résistance des cellules cancéreuses à ces molécules (Kobayashi et al., 2005). Le développement des EGFR-TKI de troisième génération a permis de surmonter, jusqu'à présent, la résistance conférée par cette mutation et de répondre au traitement (Mok et al., 2017). Ces dernières années, il a été démontré que l'EGFR possède des fonctions de survie indépendantes à l'activité des kinases dans les cellules cancéreuses. Au vu des thérapies ne ciblant que l'activité kinase de cette protéine, il est important d'approfondir la compréhension sur le rôle de ce récepteur dans le cancer du poumon (Thomas and Weihua, 2019; Weihua et al., 2008).

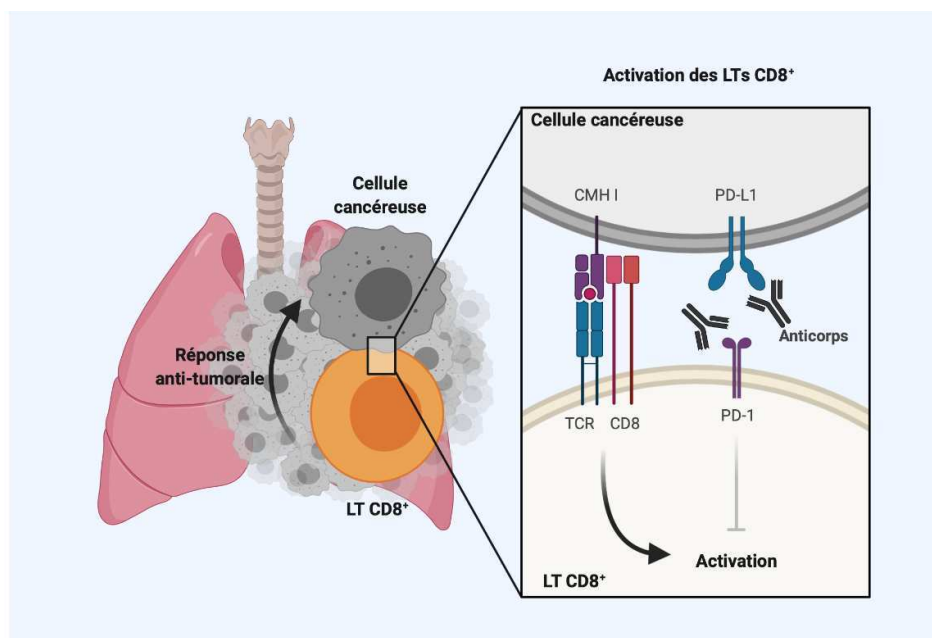
Alors que la mutation oncogénique KRAS est la mutation la plus fréquemment identifiée dans les cancers du poumon, peu d'option de thérapies ciblées n'ont été cliniquement approuvées, en partie expliqué par la haute affinité de KRAS pour le GTP. Le manque d'intérêt de la communauté scientifique n'est pas en cause comme le démontre les nombreuses études menées et les tentatives de développement d'inhibiteurs, tous ciblant la mutation KRAS<sup>G12C</sup> (Janes et al., 2018; Ostrem et al., 2013; Patricelli et al., 2016). Les protéines de la voie de signalisation en aval de KRAS sont donc préférentiellement ciblées, à défaut de pouvoir cibler KRAS : par exemple, les inhibiteurs de MEK semblent être efficaces (Yang et al., 2019). En Mai 2021, l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*food and drug administration*, FDA) a approuvé le premier traitement spécifique des mutations KRAS chez les patients atteints de CBNPC (Skoulidis et al., 2021). En effet, le Lumakras™ (Sotorasib) a été évalué chez 124 patients atteints de CBNPC localement avancés ou métastatiques présentant la mutation du gène *Kras*<sup>G12C</sup> dont la maladie a progressé après avoir reçu un inhibiteur de points de contrôle immunitaire et/ou une chimiothérapie à base de platine. Les résultats de cette étude suggèrent un effet bénéfique clinique durable à la suite du traitement par le Lumakras™.

La médecine personnalisée par le ciblage de cibles moléculaires appropriées dans les tumeurs a permis d'améliorer la survie des patients atteints de cancer de poumon, mais soulèvent l'importance de la recherche continue lorsque des résistances acquises par mutations se développent (Hofman et al., 2020; Oren et al., 2021). De plus, l'importance de l'identification des altérations moléculaires chez les patients pour lesquels la biopsie de tissus ne peut se faire a conduit à l'élaboration de la détection et de l'analyse de l'ADN tumoral circulant ainsi que des cellules cancéreuses circulantes permettant d'identifier les mutations présentes au niveau de la tumeur primaire (Herbreteau et al., 2018; Hofman, 2021).

#### 1.2.4.2.3. Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire

Une des avancées majeures en oncologie a été l'émergence de l'immunothérapie. À la différence des autres thérapies consistant à la destruction des cellules cancéreuses directe chez les patients, l'immunothérapie stimule les défenses immunitaires afin que le système immunitaire reconnaisse les cellules cancéreuses et les détruise (Schreiber et al., 2011; Waldman et al., 2020). Parmi ce type de traitement anti-cancéreux figure les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (*immune checkpoint inhibitors*, ICBs). Le Docteur James Allison et le Professeur Tasuku Honjo ont reçu le prix Nobel de Physiologie ou de Médecine en 2018 pour leur découverte du traitement du cancer par inhibition de la régulation immunitaire négative. Bien que les protéines impliquées et leurs fonctions inhibitrices étaient connues des années auparavant, ce sont le développement d'anticorps antagonistes dirigés contre ces protéines et leur efficacité dans la lutte contre les cancers qui leur ont valu le prix Nobel.

Les ICBs consistent en la réactivation du système immunitaire : la stratégie utilisée dans l'immunothérapie va permettre d'inhiber les points de contrôle immunitaire et ainsi de réactiver les fonctions effectrices et donc l'activité anti-tumorale des LTs à l'encontre des cellules cancéreuses (Pardoll, 2012). Les points de contrôles ciblés sont les axes CTLA-4 et ses ligand CD80 et CD86 ainsi que PD-1 et son ligand PD-L1 (Figure 1.8). En plus de ces deux voies, de nouvelles recherches portent également sur les régulateurs négatifs de l'activation des LTs, tels que LAG3 (*lymphocyte activation gene 3 protein*), TIM3 (*T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3*) parmi d'autres (Waldman et al., 2020). Seulement les ICBs ciblant la voie de PD-1 et PD-L1 seront décrits. L'utilisation de ces agents thérapeutiques dans le cancer du poumon doit néanmoins être étudié préalablement car l'efficacité du traitement repose subséquemment sur la présence de LTs fonctionnels dans la tumeur, tumeur dite chaude, et de l'expression de PD-L1 des cellules cancéreuses (Arbour and Riely, 2019).



**Figure 1.8 : L'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par les ICBs.**

Des anticorps dirigés contre la protéine PD-1 (*programmed cell death-1*), présent à la surface des lymphocytes T (LTs) CD8<sup>+</sup> ou contre son ligand PD-L1, au niveau des cellules cancéreuses, empêchent l'association de ces deux protéines. La voie inhibitrice engendrée par la reconnaissance de PD-L1 par PD-1 est entravée, de ce fait, l'activation des LTs CD8<sup>+</sup> est alors favorisée. La réponse cytotoxique des LTs CD8<sup>+</sup> permet ainsi de détruire, du moins en partie, les cellules cancéreuses.

De ce fait, une analyse immunohistochimique de PD-L1 est réalisée sur les tissus tumoraux afin d'attribuer un score de PD-L1, ce qui permet d'identifier les patients les plus susceptibles de répondre aux ICBs, bien que cette analyse prédictive puisse être dans certains cas, insuffisante (Yu et al., 2016). Les essais du pembrolizumab, un anticorps dirigé contre PD-L1, sont les meilleurs arguments en faveur d'une thérapie à agent unique comme traitement initial (Reck et al., 2016). En effet, les études cliniques comparatives de l'efficacité du traitement du pembrolizumab et du traitement

cytotoxique à base de platine chez les patients atteints de CBNPC de stade avancé ont permis de démontrer d'une part que l'ICB améliore la survie sans aggravation ainsi que la survie globale, mais d'autre part, les bénéfices sont supérieurs lorsque le score de PD-L1 est supérieur à 50% (Mok et al., 2019; Reck et al., 2016). De plus une récente étude permis de démontrer que les patients atteints de CBNPC de stade avancé traités avec l'anticorps dirigé contre PD-L1, l'atezolizumab, augmentait significativement l'espérance de vie comparé aux traitement cytotoxique à base de platine, lorsque les patients présentaient une expression élevée de PD-L1 (Herbst et al., 2020). Cependant, les essais concernant d'autres ICBs tels que le nivolumab ainsi que le durvalumab, anticorps dirigés contre PD-1 et PD-L1 respectivement, n'ont pas démontré d'efficacité supérieur à la chimiothérapie à base de platine (Carbone et al., 2017; Rizvi et al., 2018).

Les différentes thérapies en partie décrites dans les paragraphes précédents et disponibles pour les patients atteints de cancer de poumon permettent d'améliorer la condition de vie des patients, mais également d'augmenter leur espérance de vie. Cependant, tous les patients ne sont pas éligibles à ces thérapies et lorsqu'ils le sont, les taux de réponses d'un grand nombre d'entre eux sont largement insuffisants. Une meilleure compréhension cellulaire et moléculaire des cellules cancéreuses ainsi que l'exploration de leurs vulnérabilités est essentielle pour augmenter les cibles potentielles thérapeutiques et ainsi accroître les chances de survie des patients atteints de cancer de poumon. De nombreuses études de recherches se portent désormais sur les caractéristiques des reprogrammations métaboliques des cellules cancéreuses et leurs interactions avec l'environnement tumoral.

### 1.3. Les reprogrammations métaboliques de l'environnement tumoral

Le chirurgien Paget développa la théorie de graine et sol (seed and soil) en 1889, proposant que la croissance de la graine, représentant la cellule cancéreuse, est gouvernée par des interactions et coopérations avec le sol, c'est à dire l'environnement (Paget, 1989). C'est ainsi que pour la première fois, le concept de microenvironnement tumoral (*tumor microenvironment*, TME) a été introduit. Le TME est constitué de différentes populations cellulaires, dont les cellules cancéreuses, les cellules immunitaires et les cellules du stroma, et grâce aux nombreuses études en cancérologie, il est désormais admis que le TME joue un rôle central dans l'initiation et la progression tumorale (Altorki et al., 2019). Parmi toutes les interactions moléculaires et cellulaires qui peuvent se produire et participer au développement tumoral dépendantes, du moins en partie, du TME, je me suis intéressée durant ma thèse à la reprogrammation du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses ainsi qu'à leur échappement au système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011). La reprogrammation métabolique est considérée comme une caractéristique des cellules cancéreuses et le métabolisme est modifié dans la plupart, si ce n'est tous les types de cancers, afin de répondre aux besoins énergétiques et biosynthétiques d'une

prolifération cellulaire incontrôlée, ainsi que pour s'adapter aux conditions environnementales imposées par le TME. La reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses est également susceptible d'affecter le TME et, plus important encore, avoir un impact sur la fonction des cellules immunitaires et par conséquent la croissance tumorale.

### 1.3.1. Le métabolisme de la cellule cancéreuse : l'effet Warburg

Le métabolisme des cellules est défini par l'ensemble des réactions biochimiques permettant de synthétiser des molécules, plus ou moins complexes, ainsi que de produire de l'énergie. De nombreuses voies métaboliques sont présentes dans la cellule et sont interconnectées en un vaste réseau. L'activité des voies métaboliques des cellules cancéreuses se distingue de celle des cellules quiescentes par des taux élevés de glycolyse, de production de lactate et de biosynthèse de macromolécules, favorisant alors la croissance et la progression tumorale (Heiden and DeBerardinis, 2017). L'exemple classique d'une des voies métaboliques reprogrammées dans les cellules cancéreuses est la voie de la glycolyse aérobie, appelée l'effet Warburg. Avant de discuter de l'effet Warburg, le métabolisme du glucose sera présenté.

#### 1.3.1.1. Le métabolisme du glucose

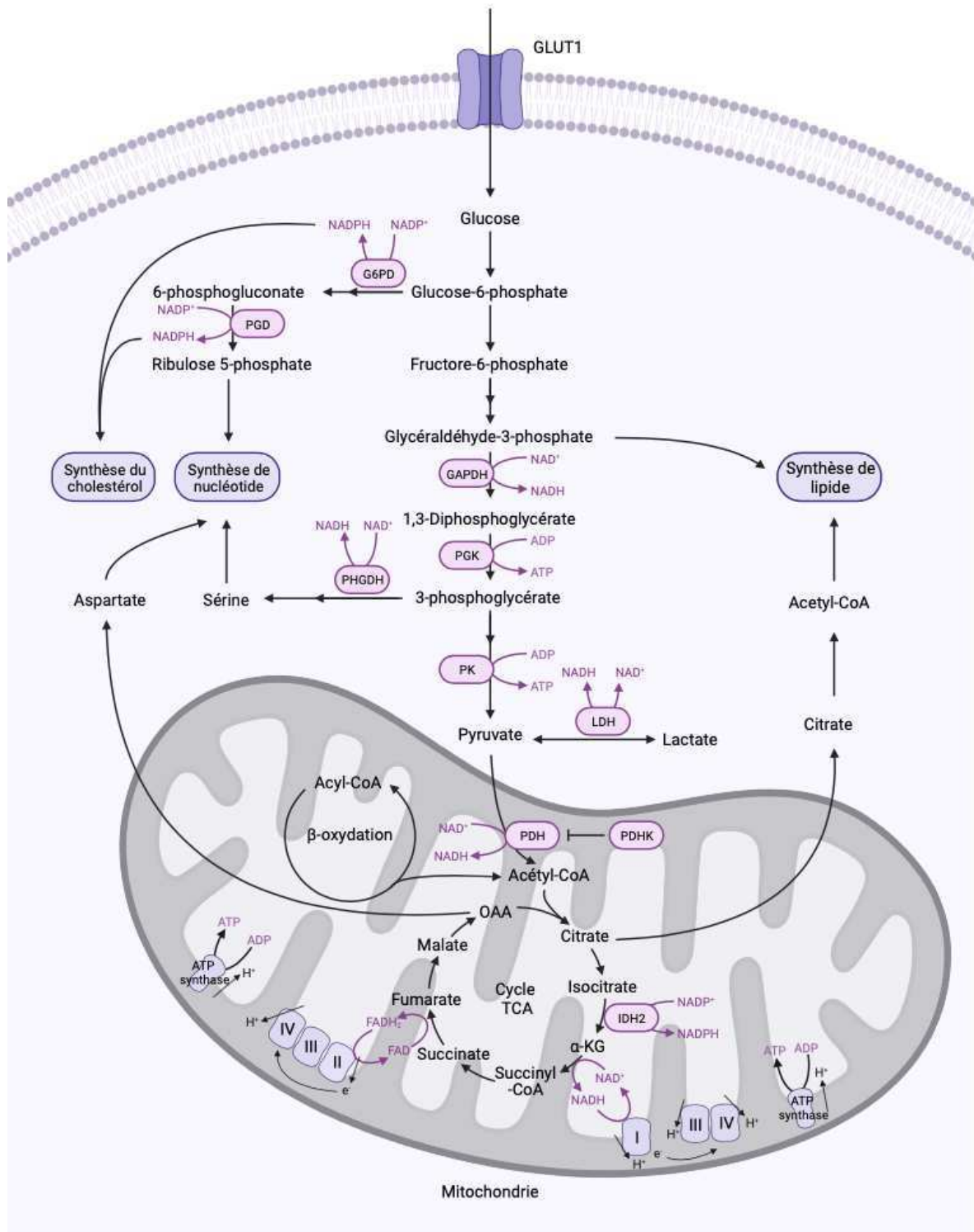
La glycolyse est la principale voie du métabolisme des glucides dans la cellule au cours de laquelle le glucose est converti par une série de 10 réactions enzymatiques cytosoliques en pyruvate (Figure 1.9) (Hay, 2016). Ces différentes réactions permettent de générer d'une part, du NADH (*nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen*), une coenzyme possédant un rôle de transporteur d'électrons à haute énergie, ainsi que de l'énergie sous forme d'ATP. D'autre part, des intermédiaires de synthèse de la glycolyse tels que le glucose-6-phosphate (G6P), sont requis pour d'autres voies métaboliques dont la voie des pentoses phosphates (*pentose phosphate pathway*, PPP). Ainsi, le G6P est pris en charge par la G6PD (*glucose 6-phosphate dehydrogenase*), permettant la génération du NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen*), un cofacteur essentiel pour de nombreuses enzymes intervenant dans le maintien de l'équilibre oxydation-réduction (redox), nécessaire à l'activité de la glutathion réductase pour ne citer qu'elle (Stincon et al., 2015). Le NADPH est également un facteur essentiel dans la synthèse des acides gras et du cholestérol. D'autres part, les intermédiaires du PPP sont des éléments intervenant dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques, important dans la synthèse de l'ARN et de l'ADN. De ce fait, la glycolyse exerce à la fois un rôle bioénergétique et biosynthétique cellulaire. Ainsi, une fraction de l'énergie disponible du glucose est donc convertie en ATP et NADH, le reste est alors détenue par le pyruvate. La capacité de la cellule à convertir cette énergie dépend de la présence d'oxygène, de la situation énergétique de la cellule et du statut NAD/NADH (Hay,

2016). Il peut soit être oxydé en CO<sub>2</sub> par le processus de la respiration cellulaire ou alors être réduit en lactate, correspondant à la fermentation lactique.

En présence d'oxygène, le pyruvate entre dans la mitochondrie grâce au transport actif par le MPC (*mitochondrial pyruvate carrier*) (Herzig et al., 2012) où il est majoritairement oxydé par une succession de réactions enzymatiques en CO<sub>2</sub> et soutenant la génération d'ATP par la phosphorylation oxydative (Figure 1.9). Tout d'abord, le pyruvate est pris en charge par la pyruvate déshydrogénase (PDH) et est converti irréversiblement en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) et en CO<sub>2</sub>, étape nécessitant la conversion du NAD<sup>+</sup> en NADH (Gudi et al., 1995). L'acétyl-CoA est par la suite oxydé en CO<sub>2</sub> en 8 étapes dans du cycle de Krebs (Martínez-Reyes and Chandel, 2020).

Le cycle de Krebs commence par la réaction qui combine l'acétyl-CoA pour générer le citrate. Dans la deuxième étape, le citrate est converti en son isomère, l'isocitrate. Le cycle se poursuit par deux décarboxylations oxydatives au cours desquelles l'isocitrate est converti en  $\alpha$ -cétoglutarate ( *$\alpha$ -ketoglutarate*,  $\alpha$ -KG) puis en succinyl-CoA, avec libération de deux molécules de CO<sub>2</sub> et génération de deux molécules de NADH. Ensuite, le succinyl-CoA se transforme en succinate, le couplant à la génération de GTP, qui peut être converti en ATP. Le succinate est oxydé en fumarate par une enzyme d'un des complexes de la chaîne de transport des électrons (*electron transport chain*, ETC). Dans cette réaction, deux électrons et deux hydrogènes sont transférés au FAD (*flavin adenine dinucleotide*), produisant du FADH<sub>2</sub>. Ensuite, le fumarate est converti en malate, puis en oxaloacétate qui se combine avec une autre molécule d'acétyl-CoA pour poursuivre le cycle de Krebs. Ces nombreux intermédiaires de synthèse générés durant le cycle sont tout aussi important pour la cellule que la formation d'ATP des stades ultérieurs (Martínez-Reyes and Chandel, 2020). De plus, la formation de NADH et de FADH<sub>2</sub>, deux transporteurs d'électrons à haute énergie, est indispensable pour la génération d'ATP par la phosphorylation oxydative, qui sera détaillé dans le paragraphe 3.1.2.1 Fonction énergétique. La phosphorylation oxydative génère alors 28 ATP mais permet aussi de régénérer du NAD<sup>+</sup>.

Il est important de noter que les acides gras libérés durant le catabolisme des triglycérides sont également oxydés en acétyl-CoA par le processus de la  $\beta$ -oxydation dans la mitochondrie ainsi que les peroxysomes (Aon et al., 2014). Les acétyl-CoA générés peuvent donc également alimenter le cycle Krebs, faisant des acides gras une source alternative pour la production d'ATP par la phosphorylation oxydative (Attané and Muller, 2020).



**Figure 1.9 : Le rôle central du métabolisme du glucose dans la cellule.**

Le métabolisme du glucose génère des intermédiaires glycolytiques qui peuvent alimenter des voies subsidiaires, notamment du pentose phosphate, qui soutiennent la croissance cellulaire. Les intermédiaires du cycle TCA (cycle de Krebs) tels que le citrate et l'oxaloacétate (OAA) sont utilisés pour générer de l'acétyl-CoA et de l'aspartate cytosoliques pour la synthèse des lipides et des nucléotides, respectivement. Le NADPH est utilisé pour conduire les réactions anaboliques comme la synthèse du cholestérol. Toutes les voies ne sont pas représentées. Adapté de (DeBerardinis and Chandel, 2016).

L'activité de la PDH est contrôlée de différentes façons, l'une étant l'inhibition par phosphorylation de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDHK). La PDHK est finement régulée par plusieurs éléments : l'acétyl-CoA, le NADH ainsi que l'ATP (Zhang et al., 2014). En effet, un fort niveau d'ATP signifie qu'il n'est pas nécessaire d'en former à nouveaux. De plus, si l'acétyl-CoA ou le NADH s'accumulent dans la mitochondrie cela signifie que la phosphorylation oxydative fonctionne au ralenti, par manque d'oxygène par exemple et de ce fait, l'activation de PDHK permet l'inhibition de la PDH. Dans ces conditions, le pyruvate ne peut plus être converti par la PDH et sera métabolisé en acide lactique (lactate) par la lactate déshydrogénase (LDH), ce qui oxyde en même temps du NADH en  $\text{NAD}^+$  (Figure 1.9). La régénération des  $\text{NAD}^+$  permet de maintenir l'activité des enzymes dépendantes de ce cofacteur, telles que la GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) lors de la glycolyse. Ainsi, la fermentation lactique du pyruvate par la LDH facilite la formation d'ATP par la glycolyse. Il est intéressant de noter que la LDH peut également réaliser la réaction inverse et ainsi convertir le lactate en pyruvate et sert alors de combustible pour compléter le métabolisme du glucose (Faubert et al., 2017).

### 1.3.1.2. L'effet Warburg et les dérivés intermédiaires du cycle de Krebs

Otto Warburg a observé dans les années 1920 que les cellules cancéreuses en prolifération consomment du glucose à un taux anormalement élevé par rapport aux cellules saines et produisent des dérivés du glucose tel que le lactate, suggérant l'utilisation de la fermentation lactique plutôt que l'oxydation complète du glucose par la respiration cellulaire (Warburg et al., 1927). Ces observations étaient surprenantes pour plusieurs raisons : la réduction du pyruvate en lactate par la fermentation lactique est une perte d'énergie comparée à son oxydation en CO<sub>2</sub> par le cycle de Krebs alors que la cellule cancéreuse voit ses besoins énergétiques augmentés afin d'assurer sa prolifération. En effet, outre les 2 ATP générés par la glycolyse, la fermentation lactique ne génère pas d'ATP supplémentaire alors que 28 molécules d'ATP sont produites lors de la phosphorylation oxydative à la suite du cycle de Krebs. La première explication proposée suggérait des perturbations du métabolisme oxydatif (Warburg, 1956), ainsi qu'une diminution du contenu cellulaire en mitochondries (Pedersen, 1978) compensée par une augmentation des flux glycolytiques, mais cette théorie s'est révélée compromise par l'étude du métabolisme énergétique des cellules tumorales (Moreno-Sánchez et al., 2007). De plus, bien que les cellules cancéreuses puissent se localiser dans des régions hypoxiques, la concentration en oxygène ne semble pas être limitante pour la phosphorylation oxydative et malgré cela la voie glycolytique est privilégiée. Finalement, cet effet pourrait être attribué par les mécanismes plus complexe de régulation des enzymes en amont et du cycle de Krebs, telles que les premières étapes permettant l'importation du pyruvate dans la mitochondrie ainsi que de la régulation de la PDH discutée dans le paragraphe précédent. Par conséquent, le flux glycolytique semblerait dépasser la vitesse maximale d'oxydation du pyruvate, alors, le pyruvate est pris en charge par la LDH (Curi et al., 1988).

De plus, la reprogrammation métabolique est un phénomène dépendant des propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses, dont les mutations oncogéniques participent grandement (Heiden and DeBerardinis, 2017). En effet, de nombreuses protéines et enzymes métaboliques sont sous le contrôle des oncogènes activés, et par exemple, l'oncogène KRAS régule l'acquisition des nutriments par la surexpression des transporteurs GLUT1 (*glucose transporter 1*) permettant l'entrée du glucose au sein de la cellule (Yun et al., 2009) ainsi que des enzymes de la synthèse de la glycolyse (Hay, 2016). De ce fait, certaines cellules cancéreuses sont capables de produire leur énergie par la glycolyse aérobie, répondant alors à leurs besoins bioénergétiques élevés. De plus, étant donné que le PPP et la glycolyse sont métaboliquement liées par le partage d'un intermédiaire commun, le G6P, et que la première enzyme intervenant dans le PPP, la G6PD, est surexprimée dans les cellules cancéreuses, l'augmentation de la glycolyse contribue à l'augmentation concomitante du flux de PPP, ce qui permet également de soutenir les besoins biosynthétiques élevés des cellules cancéreuses (Jin and Zhou, 2019).

Il est important de souligner qu'une augmentation du flux glycolytique et de la production de lactate observées dans certaines cellules cancéreuses ne signifie pas l'arrêt total du cycle de Krebs ; le glucose et subséquemment le pyruvate alimente le cycle de Krebs et permet la génération des intermédiaires du cycle qui sont pour certains d'entre eux, des précurseurs d'éléments biosynthétiques. Ainsi, ils participent à la synthèse des lipides, des protéines et des acides nucléiques, des éléments tout aussi importants que la production d'ATP pour les cellules cancéreuses en prolifération (Martínez-Reyes and Chandel, 2020). Par exemple, le citrate est transporté hors de la mitochondrie où il est un précurseur de l'acétyl-CoA afin de favoriser la synthèse des lipides. Lorsque le citrate est exporté hors du cycle, la progression du cycle de Krebs est entravée mais le cycle est susceptible d'être réapprovisionné par de nouvelles sources, telles que la glutamine. L'alimentation du cycle de Krebs par d'autres voies que l'acétyl-CoA sont appelée voies anaplérotiques. La glutamine est convertie en glutamate, lui-même converti en  $\alpha$ -cétoglutarate permettant de redémarrer le cycle. Cependant, si l'utilisation de la glutamine pour alimenter le cycle peut se produire *in vitro*, la démonstration *in vivo* n'est pas évidente (Davidson et al., 2016). Au contraire, la diminution de l'acétyl-CoA engendrée par une inhibition de la PDH, diminue la croissance tumorale *in vivo*, démontrant l'importance du cycle de Krebs dans la prolifération cellulaire, en coexistence avec la glycolyse aérobie. En effet, alors que la cellule cancéreuse en prolifération produit son énergie sous forme d'ATP par la glycolyse aérobie de l'effet Warburg et non par la phosphorylation oxydative, la croissance des cellules cancéreuses est affectée par l'inhibition de l'ETC (Birsoy et al., 2015). L'inhibition de l'ETC semble compromettre le recyclage des  $\text{NAD}^+$ , et l'accumulation du NADH altère le flux du cycle de Krebs, au même titre que l'inhibition de PDH altère le flux. L'oxaloacétate mitochondrial transféré dans le cytosol est transaminé en aspartate, qui est un précurseur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques ainsi que de la synthèse des protéines (Figure 1.9) (Lane and Fan, 2015). L'inhibition de la PDH ou de l'ETC entrave la progression du cycle de Krebs, alors, l'oxaloacétate n'est plus converti en aspartate, ce qui diminue par conséquent la croissance tumorale (Krall et al., 2021).

Le métabolisme du glucose est donc reprogrammé dans les cellules cancéreuses afin de soutenir leur prolifération élevée. Les nombreuses études *in vitro* de l'altération métabolique des cellules cancéreuses ne reflètent cependant pas les altérations observées au cours du développement tumoral *in vivo* (Davidson et al., 2016). Ainsi, les différences entre les études *in vitro* et le développement tumoral *in vivo* soutiennent que les dépendances métaboliques des cellules cancéreuses sont largement influencées par d'autres facteurs plus complexes.

### 1.3.2. L'hétérogénéité métabolique des tumeurs de cancer de poumon

La complexité de la compréhension du métabolisme des cellules cancéreuses est également expliquée par les hétérogénéités observées entre les différentes tumeurs des patients, mais également au sein des cellules cancéreuses d'une même tumeur. Une étude chez l'Homme administrant du glucose isotopique marqué  $^{13}\text{C}$  chez des patients atteints de CBNPC quelques heures avant la lobectomie a permis de mettre en évidence la variabilité métabolique des tumeurs (Hensley et al., 2016). En effet, la source de carbone pour alimenter le cycle de Krebs peut différer du glucose et d'autres substrats sont alors oxydés, comme les acides gras par la  $\beta$ -oxydation ou le lactate par la LDH produit lors la glycolyse aérobie. En plus de la forte hétérogénéité métabolique observée entre les patients, une variabilité des sources de carbones au sein d'une même tumeur est observée : les tumeurs sont donc composées d'un mélange de cellules cancéreuses métaboliquement hétérogènes, en plus des autres types cellulaires constituant le TME. L'abondance des nutriments dans le TME, autres que le glucose, pourrait être une explication de cette hétérogénéité observée, soulignant la plasticité métabolique des cellules cancéreuses dans leur environnement (Attané and Muller, 2020).

La compréhension des altérations métaboliques des cellules cancéreuses est nécessaire afin d'identifier des possibles vulnérabilités pouvant être ciblées dans le but de réduire le développement tumoral. Néanmoins, au vu de l'hétérogénéité métaboliques des tumeurs, il est important également de développer des méthodes de stratifications des patients basés sur les altérations métaboliques afin d'adapter dans un second temps, les cibles visées. Dans une récente étude des tumeurs de patients atteints de CBNPC, les analyses de l'utilisation de la respiration mitochondriale des cellules cancéreuses ont permis de différencier les tumeurs dépendantes de la phosphorylation oxydative de celles dépendantes de la glycolyse aérobie (Dias Amoedo et al., 2021). Les études supplémentaires par l'utilisation d'un traceur du glucose *in vivo* suggèrent que les tumeurs dépendantes de la phosphorylation oxydative sont moins avides pour le glucose mais surexpriment les gènes nécessaires à la  $\beta$ -oxydation, notamment ceux impliqués dans les dernières étapes nécessitant le complexe enzymatique de la protéine trifonctionnelle mitochondriale, dont la protéine HADHA (*hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit alpha*). De ce fait, les acides gras sont la source de carbone alimentant le cycle de Krebs de ces tumeurs, et non le glucose. Il est alors possible de stratifier les patients par l'utilisation du  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET scan ainsi que par l'analyse immunohistochimique de la protéine HADHA : la stratification se révèle importante puisque l'inhibition de HADHA dans des modèles murins permet de réduire *in vivo* la croissance tumorale des cellules cancéreuses A549. Cette étude permet d'améliorer la compréhension des différences métaboliques des tumeurs de CBNPC en plus d'ouvrir des portes quant à une nouvelle stratégie thérapeutique personnalisée. De plus, la capacité respiratoire de la zone tumorale des patients s'oppose systématiquement à la région adjacente de tissu saine, et cela pour les deux

sous-ensembles de tumeurs définies, soulevant le concept de déséquilibre bioénergétique. Ces différences métaboliques peuvent être en partie expliquées par la diversité de l'environnement tumoral.

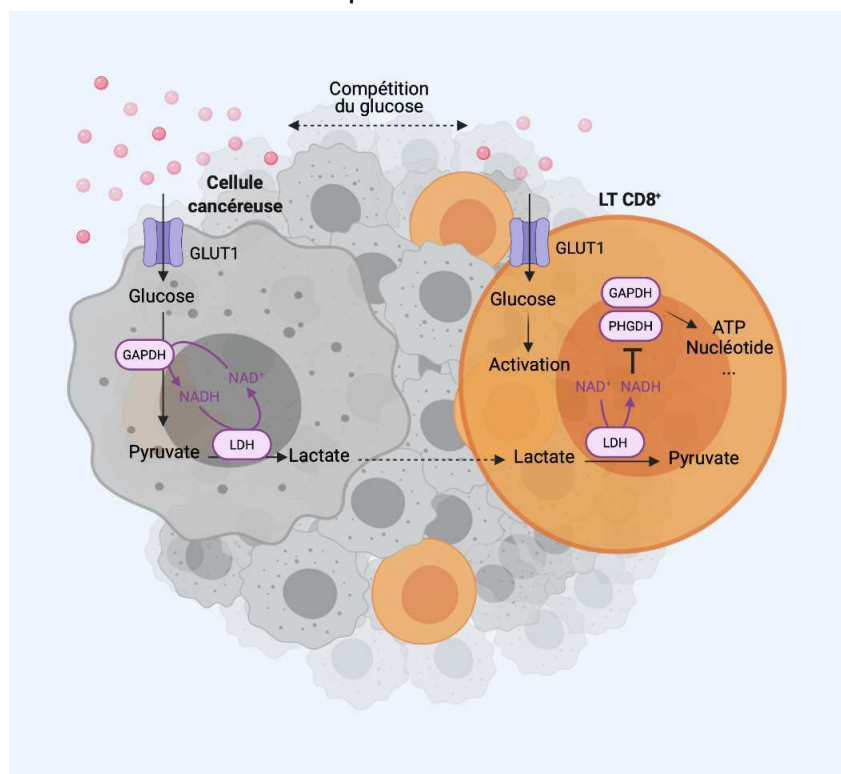
### 1.3.3. Les perturbations métaboliques de l'environnement tumoral

Les cellules cancéreuses coexistent avec des cellules immunitaires infiltrées et d'autres cellules du stroma, qui forment alors le TME et influencent le développement et la progression du cancer (Altorki et al., 2019). Déviées de leurs rôles physiologiques normaux, les cellules immunitaires d'une tumeur sont souvent dysfonctionnelles et exploitées par les cellules cancéreuses pour favoriser la progression tumorale. De plus, les propriétés biochimiques et biophysiques du TME sont différentes de celles des tissus normaux et le TME est caractérisé notamment par l'hypoxie, l'acidose lactique, la pression élevée du liquide interstitiel et la rigidité accrue de la matrice extracellulaire, parmi d'autres. Les altérations métaboliques des cellules cancéreuses participent donc à la génération d'un TME favorable à la croissance tumorale et favorise un système immunitaire permissif, notamment par des reprogrammations métaboliques des cellules immunitaires imposées par le TME.

#### 1.3.3.1. Les altérations métaboliques inhibant les lymphocytes T

La croissance tumorale surpasse l'efficacité anti-tumorale de la réponse immunitaire comme le démontre l'incidence élevée des cancers. Parmi les mécanismes cellulaires et moléculaires des cellules cancéreuses influençant le TME et la réponse immunitaire, les altérations métaboliques des cellules cancéreuses impactent l'activation des LTs (Figure 1.10). En effet, l'activation des LTs par reconnaissance des antigènes afin d'éliminer les cellules cancéreuses nécessite une reprogrammation métabolique ainsi que des besoins énergétiques accrue. L'accès aux nutriments dans le TME est alors indispensable pour assurer la fonction des LTs. Cependant, il a été suggéré que la compétition des nutriments au sein du TME, en faveur des cellules cancéreuses, réduit l'efficacité des LTs. En effet, la diminution du glucose disponible pour ces cellules immunitaires atténue leur réponse alors même que ces cellules sont capables de reconnaître les antigènes tumoraux (Chang et al., 2015). En plus de diminuer la fonctionnalité des LTs, la consommation accrue de glucose des cellules cancéreuses impacte la prolifération des LTs. En effet, l'augmentation du flux de la glycolyse aérobie des cellules cancéreuses libère dans le TME du lactate, ce qui influence le phénotype des LTs vers un phénotype immunosuppresseur : il a été reporté que le lactate diminue la prolifération des LTs (Quinn et al., 2020). Le lactate est métabolisé par la LDH, qui le convertit en pyruvate et en intermédiaires du cycle de Krebs. Cette réaction nécessite la réduction du  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$ , utilisant alors les niveaux de  $\text{NAD}^+$  disponible dans la cellule. L'activité des autres enzymes dépendantes du  $\text{NAD}^+$  sont ainsi entravée, telles que celle de GAPDH. La prolifération des LTs est par conséquent

diminuée car les intermédiaires glycolytiques se situant en aval de GAPDH sont requis pour la synthèse de la sérine et ainsi pour la formation des bases nucléiques.



**Figure 1.10 : L'inhibition des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> par le TME.**

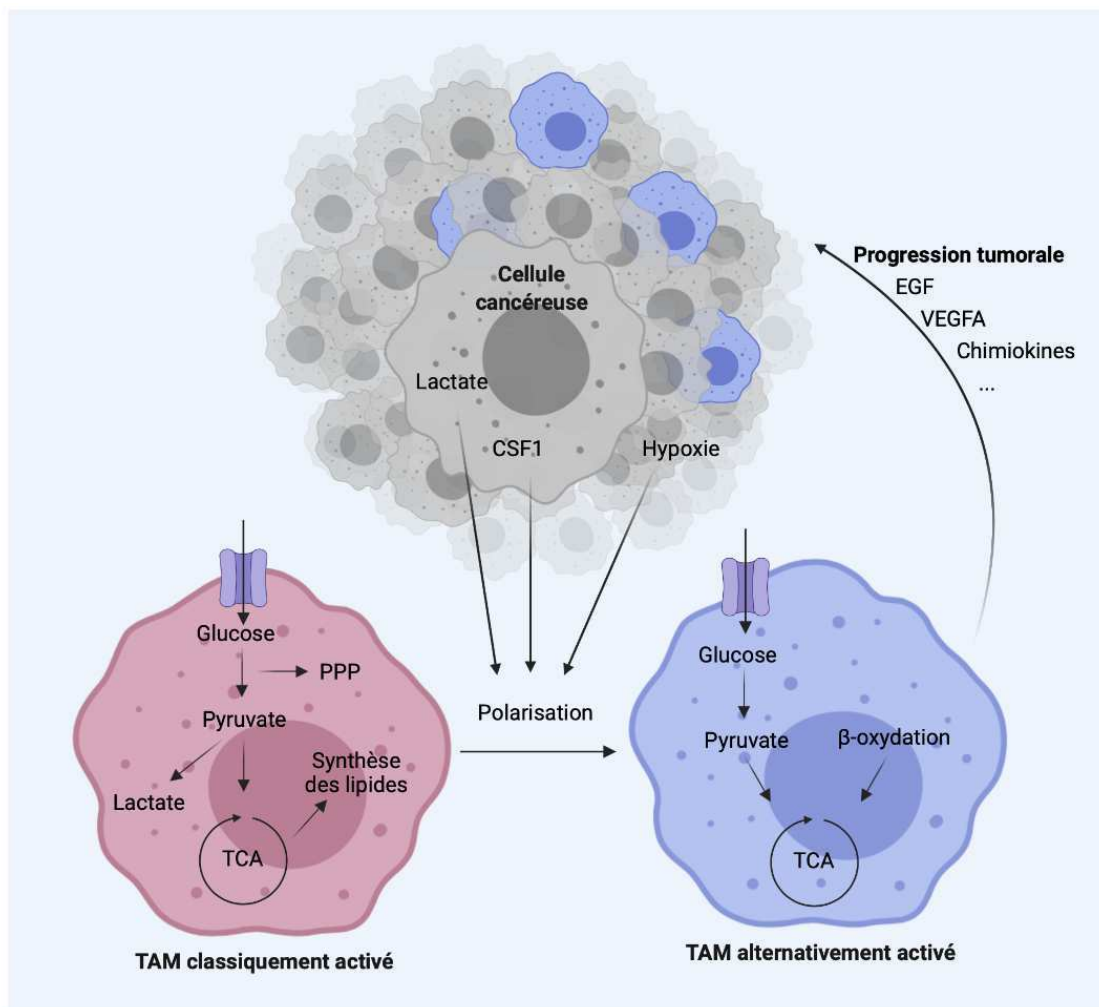
Les cellules cancéreuses modifient l'environnement tumoral (TME) en partie par leur forte avidité pour le glucose, qui diminue la disponibilité du glucose pour les lymphocytes T (LTs) CD8<sup>+</sup> nécessaire à leur activation, mais le lactate relargué dans le TME, en conséquence de la forte consommation de glucose des cellules cancéreuses, diminue également la prolifération des LTs CD8<sup>+</sup>.

### 1.3.3.2. La reprogrammation métabolique des macrophages

En plus d'échapper à la surveillance immunitaire, les cellules cancéreuses détournent les cellules immunitaires, notamment les macrophages, qui vont alors contribuer à la formation d'un environnement favorable pour la croissance tumorale. Les macrophages représentent la population immunitaire la plus abondante dans le CBNPC, ainsi que dans beaucoup d'autres types de cancer. De manière générale, les macrophages associés aux tumeurs sont appelés TAMs (*tumor-associated macrophages*). Cependant, cette population est très hétérogène, expliquée d'une part par les différentes origines des TAMs, provenant soit des macrophages résidents des poumons, majoritairement les AMs, soit de la différenciation des monocytes circulants et qui s'accumulent par la suite dans les tumeurs (Casanova-Acebes et al., 2021). D'autre part, ces populations de TAMs présentent une distribution temporelle et spatiale différente dans le TME des CBNPC. Enfin, les TAMs ont la capacité d'acquérir un large spectre de profils phénotypiques, métaboliques et fonctionnels différents en réponse aux signaux et à la composition du TME, ce qui participe à l'hétérogénéité des TAMs observée dans les tumeurs (Guilbaud et al., 2019; Rabold et al., 2017).

Le profil métabolique des TAMs ainsi que les mécanismes par lesquels le métabolisme cellulaire façonne l'état d'activation et la fonction des TAMs sont très étudiés. Dans un microenvironnement spécifique, comme une tumeur, le métabolisme des TAMs est reprogrammé pour répondre aux processus cellulaires tels que la survie, la croissance, la prolifération, la phagocytose et la production de cytokines (Vitale et al., 2019). De manière simplifiée, les TAMs peuvent arborer un phénotype pro-inflammatoire classique, « M1-like », défini par un métabolisme hautement glycolytique couplé à une importante sécrétion de lactate, un flux élevé du PPP permettant la biosynthèse de NADPH, de lipides et de nucléotides ainsi qu'une forte capacité à générer des ROS, qui engendre une fonction cytotoxique et donc ces TAMs M1-like seraient potentiellement anti-tumoraux (Figure 1.11). À l'inverse, les TAMs polarisés vers un phénotype alternatif anti-inflammatoire et réparateur, appelé « M2-like », sont généralement considérés comme utilisant un métabolisme oxydatif avec une augmentation de l'oxydation des acides gras par la  $\beta$ -oxydation et une diminution de la glycolyse et du PPP, ce qui a été associé à leur capacité à favoriser la réparation des tissus, et seraient pro-tumoraux (Cologio et al., 2014; Huang et al., 2014).

Bien que cette vision très simpliste ne reflète pas correctement l'hétérogénéité métabolique des macrophages et leur plasticité fonctionnelle réelle, le profil métabolique des TAMs est très dynamique et varie en réponse aux besoins nutritionnels des cellules cancéreuses et aux perturbations du TME, ce qui influence non seulement la survie des cellules cancéreuses mais aussi la progression du cancer. Les changements métaboliques du TME induit par une forte prolifération des cellules cancéreuses de manière incontrôlée dictent le profil adopté de TAMs : les cellules cancéreuses consomment des quantités élevées de glucose à des fins bioénergétiques, biosynthétiques et anti-oxydantes (grâce à la voie du PPP), ce qui est associé à une libération intense de lactate dans le TME (Vitale et al., 2019). De plus, l'hypoxie du TME stabilise le facteur HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia inducible factor-1*) des cellules cancéreuses, ce qui induit l'expression de CSF1 (*colony stimulating factor 1*). Le CSF1 et le lactate, en plus de l'hypoxie, favorisent la repolarisation des TAMs de type M1-like vers un état immunosuppresseur de type M2-like (Cologio et al., 2014), qui est caractérisé par l'expression de molécules immunosuppressives favorisant la progression du cancer. En effet, les TAMs M2-like sont impliqués dans le remodelage tissulaire et l'angiogenèse, grâce à la production et sécrétion des MMP9 (*matrix metalloproteinase 9*) et du VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*), respectivement. Parallèlement, la polarisation des TAMs vers un profil de type M2-like engendre la diminution de la consommation de glucose en faveur d'un métabolisme oxydatif par la  $\beta$ -oxydation, ce qui augmente la disponibilité du glucose pour les cellules cancéreuses, accentuant alors l'effet Warburg des cellules cancéreuses avec la production de lactate et l'hypoxie du TME, ce qui favorisent davantage la polarisation des TAMs vers un phénotype M2-like.



**Figure 1.11 : La reprogrammation métabolique des TAMs.**

La consommation élevée de glucose des cellules cancéreuses est associée à une libération intense de lactate dans le microenvironnement tumoral (TME), en plus de sécréter des niveaux élevés de facteur de stimulation des colonies 1 (CSF1). Le CSF1 et le lactate favorisent, avec l'hypoxie du TME, la reprogrammation métabolique des macrophages associés aux tumeurs (TAMs), induisant leur polarisation d'un état classiquement activé pro-inflammatoire vers un état immunosuppresseif, alternativement activé, qui se caractérise par la libération de facteurs trophiques, de modulateurs métaboliques et de molécules immunosuppresseives qui favorisent la progression du cancer, y compris le facteur de croissance épithélial (EGF), le facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGFA), ainsi que des chimiokines favorisant le recrutement de monocytes.



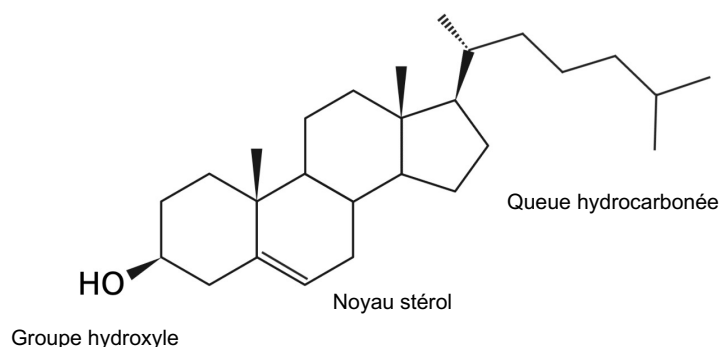
## 2. Le cholestérol dans le développement tumoral

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols et représente un constituant majeur des cellules des mammifères en plus d'être essentiel à l'organisme. Outre son rôle dans la composition et le maintien des membranes cellulaires, il est également impliqué dans un certain nombre de processus biologiques tels que la signalisation membranaire et est le précurseur d'hormones ou des oxystérols. De plus, le cholestérol est le principal composant des radeaux lipidiques, une structure membranaire permettant de réguler l'assemblage et le fonctionnement de nombreuses voies de signalisation cellulaire. En raison de son importance, les cellules ont développé des mécanismes complexes pour réguler étroitement l'abondance et la distribution du cholestérol au sein des cellules. Le cholestérol est synthétisé au cours d'une série complexe d'étape enzymatiques. Outre la synthèse *de novo*, le cholestérol peut également provenir de l'alimentation où il est capté par l'intestin puis amené jusqu'aux foie afin d'être transportés aux tissus périphériques par les lipoprotéines. Le cholestérol intracellulaire peut être utilisé par la cellule pour répondre aux divers besoins biologiques, ou être stocké sous forme de gouttelette lipidique. Il peut également être exporté à l'extérieur de la cellule par les mécanismes d'efflux du cholestérol cellulaire, ce qui participe grandement à l'homéostasie cellulaire du cholestérol. Les altérations de cet équilibre homéostatique sont connues pour être associées aux maladies cardiovasculaires et à l'athérosclérose, mais des preuves croissantes relient également ces altérations à des risques accrus de cancer (Huang et al., 2020).

### 2.1. Le cholestérol

#### 2.1.1. La structure du cholestérol

Le cholestérol est un lipide appartenant à la classe des stérols. Il est constitué de 27 atomes de carbone et possède une structure unique avec un noyau stéroïde composé de quatre cycles carbonés appelés A, B, C et D, une chaîne hydrocarbonée positionnée sur le carbone 17 et un groupe hydroxyle -OH sur le carbone 3 (Craven, 1976) (Figure 2.1). Le groupe hydroxyle constitue la tête polaire et donc l'unique partie hydrophile de la molécule conférant, avec le noyau stéroïde et à la chaîne hydrocarbonée hydrophobes, un caractère amphiphile au cholestérol. Cependant, lorsque la fonction -OH du cholestérol est estérifiée par un acide gras, appelé ester de cholestérol, la molécule est totalement hydrophobe.

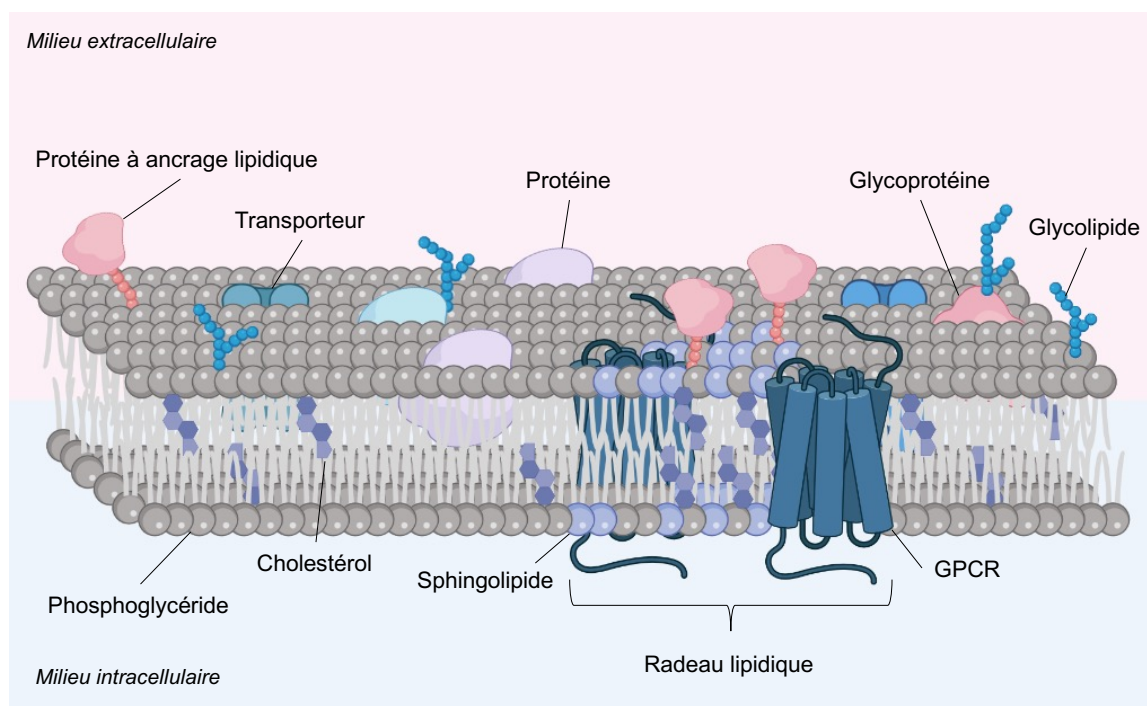


**Figure 2.1 : La structure du cholestérol.**

Le cholestérol est un lipide constitué de 27 atomes de carbone, possède une fonction -OH constituant la tête polaire hydrophile de la molécule tandis que le noyau stérol et la queue hydrocarbonée confère le caractère hydrophobe au cholestérol.

### 2.1.2. Le rôle du cholestérol dans les membranes

Les membranes des cellules sont constituées de lipides, classés en trois grands types : les phosphoglycérides, les sphingolipides et les stérols, largement représentés par le cholestérol chez les mammifères (Figure 2.2). La composition des membranes diffère en fonction de la nature des membranes mais également du type cellulaire. Ainsi, la membrane plasmique contient 45 à 90% du cholestérol cellulaire total (Liscum and Munn, 1999), tandis que celle du réticulum endoplasmique n'en contient qu'une infime partie, soit 0,5% du cholestérol total (Lange et al., 1999). Le cholestérol joue un rôle unique parmi ces différents lipides, en partie dû à ses propriétés biophysiques amphiphiles, qui lui permettent d'être inséré dans les membranes ou d'en être extrait relativement facilement. De ce fait, le cholestérol représente 25% des membranes plasmique et régule la rigidité, la fluidité et la perméabilité des membranes. Le cholestérol dans la membrane plasmique peut également se lier à de nombreuses protéines transmembranaires telles que les récepteurs couplés aux protéines G, contribuant à maintenir ou à modifier leurs conformations en influençant les propriétés de la membrane par exemple (Gimpl, 2016). Le cholestérol est souvent en interaction avec des sphingolipides et des protéines à ancrage lipidique dans le plan de la membrane, conduisant à la formation de régions membranaires relativement ordonnées et fonctionnellement importantes qui recrutent d'autres lipides et protéines, région appelées radeaux lipidiques (Sezgin et al., 2017; Singer and Nicolson, 1972). La principale fonction des radeaux lipidiques est de séparer des éléments spécifiques afin de réguler leurs interactions avec d'autres composants membranaires et donc leur activité. Ainsi, ils servent de plateformes dans la modulation du trafic membranaire et de la transduction des signaux, tels que la régulation immunitaire, la réorganisation du cytosquelette, le contrôle du cycle cellulaire, ainsi que le trafic membranaire et les événements de fusion, entre autres.



**Figure 2.2 : La membrane plasmique des mammifères.**

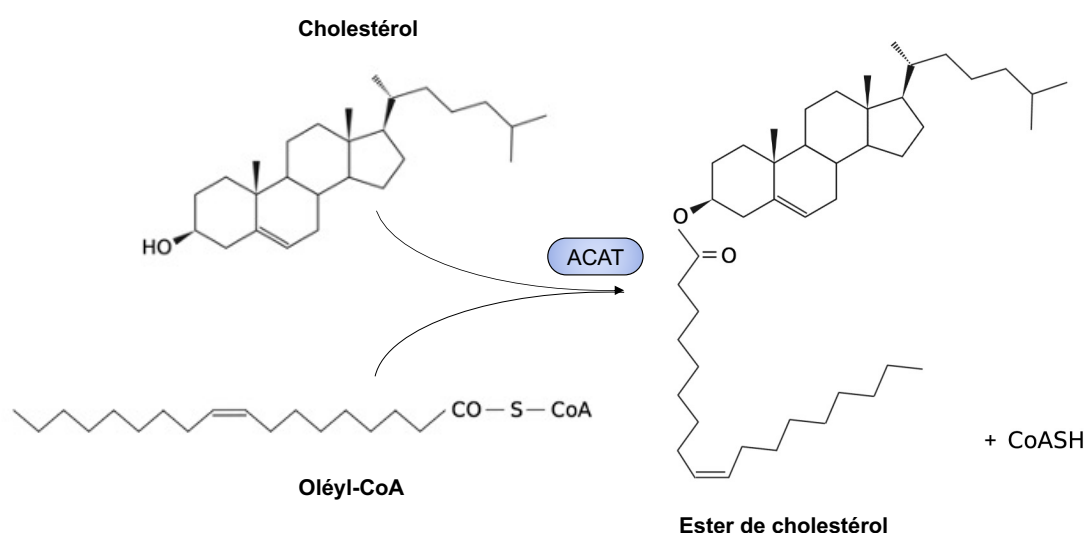
Les radeaux lipidiques sont définis comme des petites entités hautement dynamiques et transitoires de la membrane plasmique qui sont enrichies en sphingolipides, en cholestérol et en protéines à ancrage lipidique. L'enrichissement de ces composants hydrophobes confère à ces domaines lipidiques des propriétés physiques distinctes, notamment une plus grande compacité et un meilleur ordre des lipides et une fluidité plus faible. GPCR : récepteurs couplés aux protéines G. Adapté de (Sezgin et al., 2017).

### 2.1.3. Les transformations du cholestérol

Outre le rôle du cholestérol dans la structure et la signalisation membranaire, le cholestérol est le précurseur des hormones stéroïdiennes et des dérivés du cholestérol, tels que les oxystérols. Il existe 5 grandes classes d'hormones stéroïdiennes : les glucocorticoïdes (cortisol et corticostérone), les minéralocorticoïdes (aldostérone), les androgènes (testostérone), les œstrogènes (œstradiol) et les progestatifs (progestérone), qui sont de puissantes molécules de signalisation régulant un grand nombre de fonctions de l'organisme (Miller, 1988). En plus de ces hormones connues depuis longtemps, le cholestérol peut également être oxydé en oxystérol. Les oxystérols sont structurellement identiques au cholestérol et sont constitués également de 27 carbones, mais possèdent un ou plusieurs groupes fonctionnels supplémentaires contenant de l'oxygène, tels que des groupes alcools, carbonyles ou époxydes. L'ajout de fonction oxygénée au cholestérol se produit soit sur la chaîne latérale, soit sur le noyau du stérol. L'oxydation de la chaîne latérale génère du 24-hydroxycholestérol (24-OHC), du 25-HC, du 27-HC ou d'autres produits, tandis que l'oxydation du noyau stéroïdien donne naissance à des oxystérols cycliques, principalement des oxystérols cycliques B comme le 6-OHC, 7 $\alpha$ / $\beta$ -OHC, 7-cétocholestérol (7-KC) (Kloudova et al., 2017). Certains de ces oxystérols sont synthétisés au niveau cellulaire par diverses enzymes de la famille des hydrolases ou

des cytochromes P450 (CYP450), principalement au niveau de la mitochondrie, comme le 27-OHC et du réticulum endoplasmique pour le 25-OHC (Dias et al., 2019). Les oxystérols sont également produits pendant la transformation des aliments par des processus oxydatifs non-enzymatiques, par des radicaux libres ou par des cations divalents, souvent appelés auto-oxydation du cholestérol tel que le 7-KC. L'ajout de fonctions oxygénées diminue l'hydrophobicité des oxystérols comparé au cholestérol dit « libre ». Cependant, comme le cholestérol, les oxystérols peuvent s'insérer dans les membranes où ils participent également à la modulation de la fluidité membranaires. De plus, ils agissent en tant que régulateurs de l'expression des gènes dans le métabolisme du cholestérol ainsi qu'en molécules de signalisation jouant un rôle clef dans les processus de développement, de différenciation et d'inflammation (Kloudova et al., 2017).

Le cholestérol peut également subir des modifications d'estérification sous l'action de l'ACAT (*acyl-CoA cholesterol acyl transferase*) (Figure 2.3) (Zhang et al., 2003). L'ACAT est une protéine membranaire localisée dans le réticulum endoplasmique qui catalyse une réaction dans laquelle l'acide gras d'une molécule d'acyl-CoA, typiquement de l'oléyl-CoA, est transféré à la fonction -OH du cholestérol, générant des esters de cholestérol (*cholesteryl ester*, CE) (Chang et al., 1997). Ainsi, l'estérification contrôle l'excès de cholestérol et représente un mécanisme cellulaire permettant de limiter les niveaux de cholestérol libre (non estérifié) dans les membranes cellulaires, afin de maintenir une structure membranaire ordonnée. Le cholestérol estérifié généré par l'ACAT est stocké dans les gouttelettes lipidiques cytoplasmiques et représente une réserve métaboliquement inerte de cholestérol excédentaire (Chang et al., 1997; Gonen and Miller, 2020).



**Figure 2.3 : L'estérification du cholestérol cellulaire.**

Le cholestérol est estérifié sous l'action de l'ACAT (*acyl-CoA cholesterol acyl transferase*), transférant l'acyle gras sur la fonction -OH du cholestérol, pour convertir le cholestérol en ester de cholestérol. L'oléyl-coenzyme A (Oléyl-CoA) est préférentiellement utilisé.

#### 2.1.4. Les sources du cholestérol

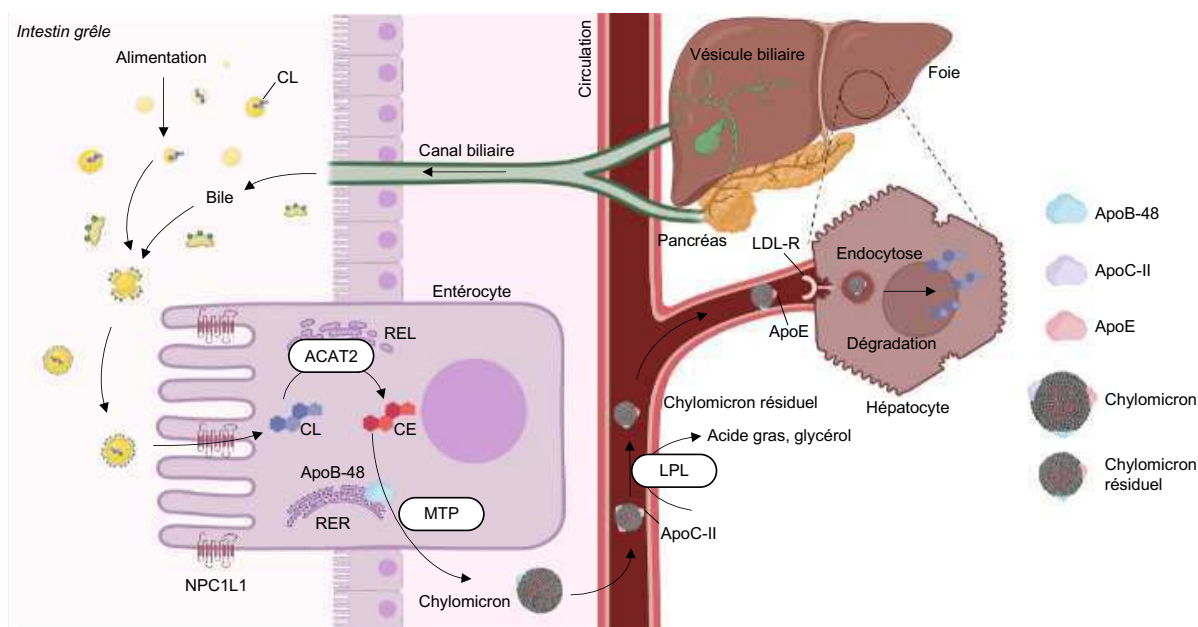
Deux sources distinctes sont à l'origine du cholestérol de l'organisme : une source apportée par l'alimentation, dite voie exogène, et la synthèse *de novo* du cholestérol, dite voie endogène. Le rôle du foie est central, et dans une certaine mesure l'intestin, puisqu'il permet à la fois de libérer dans la circulation sanguine le cholestérol acquis de manière exogène par l'alimentation, mais également celui synthétisé *de novo*, étant le principal site de synthèse du cholestérol.

##### 2.1.4.1. Voie exogène

La vésicule biliaire, le pancréas et le foie débouche dans l'intestin grêle au niveau du duodénum, permettant le déversement de la bile ainsi que des enzymes pancréatiques dans l'intestin (Figure 2.4). Le cholestérol ainsi que d'autres lipides circulant dans la lumière de l'intestin grêle sont émulsifiés grâce aux différents composés de la bile afin de former des fines gouttelettes lipidiques, appelées micelles (Iqbal and Hussain, 2009). Ainsi, les lipases pancréatiques, les colipases et les acides biliaires fonctionnent en coopération et hydrolysent le contenu des micelles pour assurer l'efficacité de la digestion et de l'absorption des lipides par les entérocytes au niveau de la partie proximale du jéjunum (Iqbal and Hussain, 2009). De multiples récepteurs sont présents à la surface de la bordure en brosse des entérocytes intestinaux afin d'assurer l'absorption des lipides. Le cholestérol d'origine alimentaire est pris en charge par le récepteur NPC1L1 (*Niemman-Pick C1 like 1*) (Altmann et al., 2004). Dans les entérocytes, le cholestérol libre absorbé est estérifié par l'ACAT2 au niveau du réticulum endoplasmique lisse (Figure 2.4). L'expression d'ACAT2 est limitée à l'intestin grêle et au foie tandis que l'expression ACAT1 est ubiquitaire (Parini et al., 2004). En parallèle, le réticulum endoplasmique rugueux produit une grosse protéine hydrophobe, appelée apolipoprotéine B-48 (ApoB-48). Le cholestérol absorbé par l'alimentation interagit avec de nombreuses protéines de transport des stérols qui facilitent le trafic du cholestérol et régulent sa distribution subcellulaire. De ce fait, le cholestérol (lipide) est associé à des apolipoprotéines (protéines) afin d'être transporté dans la circulation sanguine sous forme de lipoprotéine. L'association du cholestérol estérifié ou libre, ainsi que des autres lipides ayant également subi des modifications d'estérifications (triglycérides) à l'ApoB-48 dans les entérocytes permet la formation de chylomicrons, gouvernées par la MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) (Hussain et al., 2003). Ils sont par la suite libérés dans la lymphe mésentérique puis dans la circulation sanguine.

Les chylomicrons acquièrent l'ApoE et l'ApoC-II par interactions avec d'autres lipoprotéines dans la circulation sanguine (Tall, 1990). Ainsi, l'ApoC-II engage la reconnaissance et l'activation de la lipoprotéine lipase (LPL) au niveau de l'endothélium des vaisseaux de la circulation sanguine, permettant alors l'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons en acides gras et glycérol (Afonso et al., 2018;

Ramasamy, 2014) (Figure 2.4). À la suite de l'hydrolyse des triglycérides, les chylomicrons résiduels, dit remnants, sont de plus petites tailles ce qui leur permet de traverser la barrière endothéliale et de se retrouver en contact des hépatocytes afin d'y être éliminés. La captation hépatique des chylomicrons résiduels nécessite la reconnaissance de l'ApoE par les récepteurs LDL (*low density lipoprotein receptor*, LDL-R) ou d'autres récepteurs similaires LRP (*low density lipoprotein receptor-related proteins*) (Martins et al., 2000). La dégradation est ensuite assurée par la voie lysosomale, permettant de régénérer des acides aminés, mais ce qui libère également les triglycérides restants ainsi que les esters de cholestérol et le libre. Le cholestérol dans le foie va contribuer à la production des acides biliaires, mais peut également être distribuer aux autres organes par la naissance de nouvelles lipoprotéines, comme décrit par la suite.



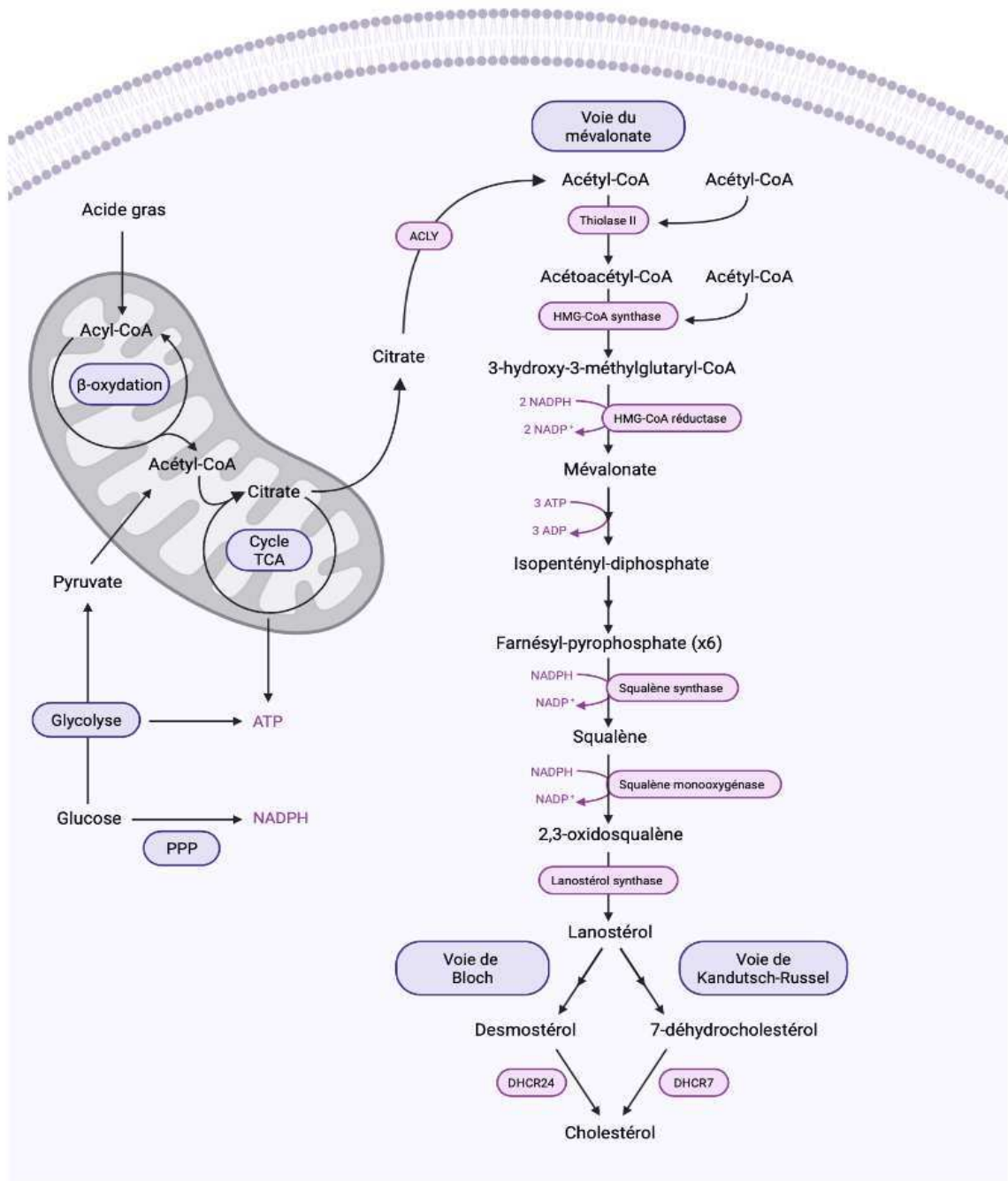
**Figure 2.4 : La voie exogène du cholestérol.**

Dans la lumière de l'intestin grêle, le cholestérol libre non estérifié (CL) provenant de l'alimentation et de la sécrétion biliaire est solubilisé dans des micelles mixtes contenant des acides biliaires et d'autres lipides. Le CL est absorbé dans les entérocytes par la protéine NPC1L1 (*Niemman-Pick C1 Like 1*) localisée au niveau apical. La majorité du cholestérol absorbé est transporté vers le réticulum endoplasmique lisse (REL), où il est converti en ester de cholestérol (CE) par l'ACAT2 (*acyl CoA cholesterol acyl transferase*). L'apolipoprotéine B-48 (ApoB-48) est synthétisée quant à lui dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER). Elle est ensuite assemblée, avec les CE et d'autres lipides, en chylomicron de façon dépendante de la protéine MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*) pour être sécrété dans la circulation via le système lymphatique (non représenté sur le schéma), puis dans la circulation sanguine. L'ApoC-II engage l'activation de la lipoprotéine lipase (LPL) permettant alors l'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons en acides gras et en glycérols. Les chylomicrons résiduels sont par la suite pris en charge par les LDL-R (*low density lipoprotein receptor*) des hépatocytes où ils sont internalisés et dégradés.

#### 2.1.4.2. Voie endogène

La synthèse de cholestérol est sensible au niveau intracellulaire de cholestérol et se déroule dans toutes les cellules de l'organisme, mais c'est au niveau des cellules hépatiques qu'est majoritairement synthétisé le cholestérol. Une longue série d'environ 30 réactions enzymatiques est nécessaire, dont les étapes se déroulent dans différents compartiments subcellulaires. La synthèse du cholestérol peut se diviser en différentes étapes : la première étape implique la voie du mévalonate qui se divise en deux branches afin de générer du cholestérol soit à partir du desmostérol par la voie de Bloch ou par le 7-déhydrocholestérol impliquant la voie de Kandutsch-Russel (Sharpe and Brown, 2013).

La plupart de l'acétyl-CoA utilisé pour la synthèse des stérols est généré par la décarboxylation oxydative du pyruvate ou à partir de la  $\beta$ -oxydation. L'acétyl-CoA est converti en citrate par le cycle de Krebs, qui diffuse dans le cytosol et est hydrolysé à nouveau en acétyl-CoA et en oxaloacétate par l'ATP citrate lyase (ACLY). Par la suite, les enzymes de la voie du mévalonate condensent trois molécules d'acétyl-CoA dans une réaction en deux étapes pour produire du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) (Goldstein and Brown, 1990) (Figure 2.5). Les deux réactions sont réversibles et en équilibre, la concentration intracellulaire d'acétyl-CoA étant le principal moteur. L'HMG-CoA est ensuite réduite par l'HMG-CoA réductase (HMGCR) liée à la membrane du réticulum endoplasmique pour produire de l'acide mévanolique via une réaction irréversible. Cette enzyme requiert du NADPH, produit entre autres, par la voie des pentoses phosphates (PPP). L'HMGCR est finement régulée, impliquant différents mécanismes cellulaires complexes. Sa régulation transcriptionnelle sera détaillée dans le paragraphe 2.3.1. Régulation de la synthèse du cholestérol de ce manuscrit. L'acide mévanolique est ensuite converti en isopentényl-diphosphate (IPP) nécessitant de l'ATP, puis en farnésyl-pyrophosphate (FPP) par une série d'étapes enzymatiques. Les premières réactions jusqu'à la synthèse du mévalonate peuvent se produire dans le cytosol et le réticulum endoplasmique ou potentiellement dans les péroxysomes, puis les réactions entre le mévalonate et la FPP sont supposées se dérouler presque exclusivement dans les peroxysomes (Faust and Kovacs, 2014). Par la suite, 6 molécules de FPP sont nécessaires pour former du squalène, qui est ensuite oxydé et cyclisé en lanostérol. La synthèse du cholestérol à partir du lanostérol peut être réalisée par deux voies différentes : la voie de Bloch ou la voie de Kandutsch-Russel (Sharpe and Brown, 2013). Ce cholestérol *de novo* synthétisé peut être estérifié à nouveau par ACAT2. La biosynthèse du cholestérol est un processus coûteux en énergie qui nécessite des apports importants d'acétyl-CoA, d'ATP et des facteurs réducteurs NADPH.



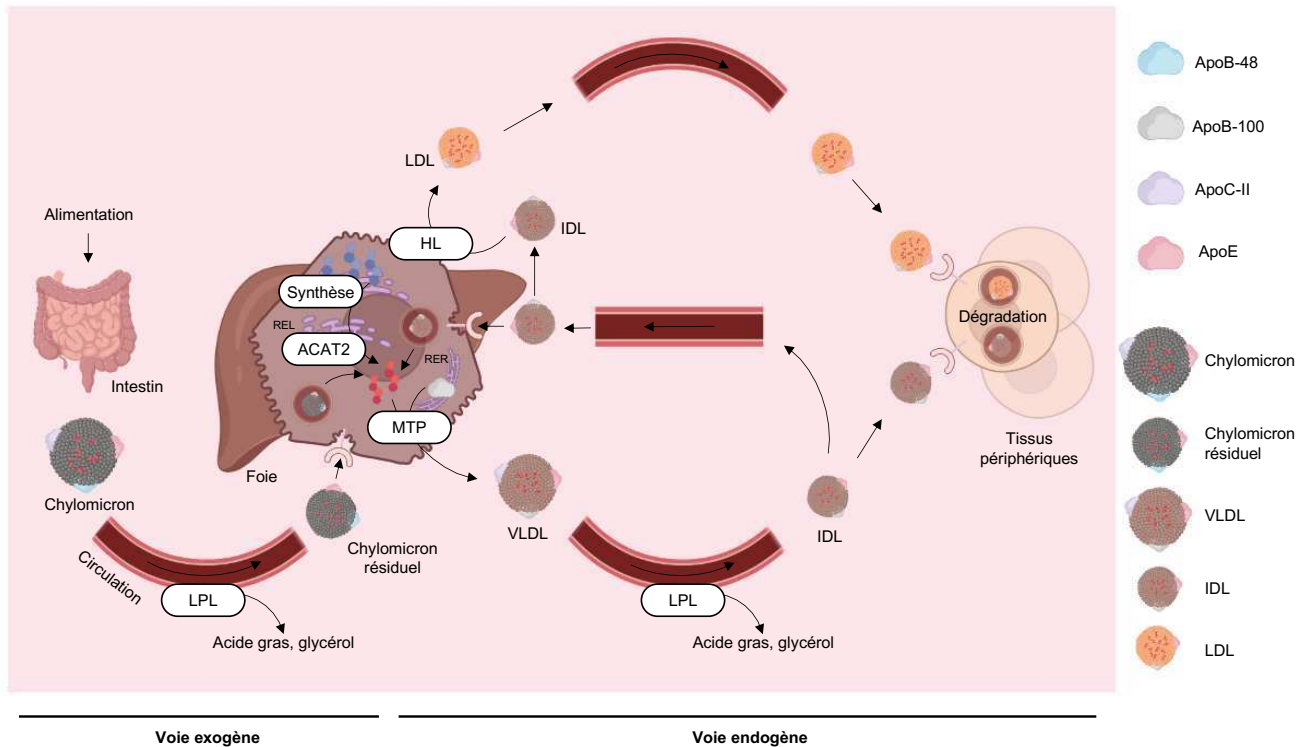
**Figure 2.5 : La synthèse du cholestérol.**

La synthèse du cholestérol implique la voie du mévalonate, qui se divise ensuite en deux branches afin de générer du cholestérol soit par le desmostérol par la voie de Bloch ou par le 7-déhydrocholestérol impliquant la voie de Kandutsch-Russel. La synthèse du cholestérol débute par la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA qui sont disponibles dans le cytosol grâce à la sortie du citrate du cycle de Krebs (cycle TCA) se produisant dans la mitochondrie. De plus, les réactions nécessitent de l'ATP et du NADPH, générés par la glycolyse ainsi que le cycle de Krebs et par la voie des pentoses phosphates (PPP).

### 2.1.5. L'apport du cholestérol aux tissus périphériques

La captation hépatique des chylomicrons résiduels provenant de l'intestin approvisionne le foie en triglycérides et en cholestérol. Mais le foie synthétise également des triglycérides ainsi que du cholestérol comme précisé dans le paragraphe précédent. Les triglycérides et le cholestérol endogènes, en plus de ceux obtenu par les chylomicrons résiduels, sont sécrétés dans la circulation en étant assemblés en lipoprotéines de très basse densité (*very low density lipoproteins*, VLDLs). La synthèse et la sécrétion des VLDLs au niveau cellulaire se déroulent selon un processus similaire à celui des chylomicrons décrits dans les entérocytes, à la différence de l'apolipoprotéine produite au niveau du réticulum endoplasmique rugueux, qui dans les hépatocytes est l'ApoB-100 (Tiwari and Siddiqi, 2018) (Figure 2.6). Les VLDLs acquièrent l'ApoE et l'ApoC-II par interactions avec d'autres lipoprotéines dans la circulation sanguine de la même façon que les chylomicrons ont acquis ces apolipoprotéines (Nguyen et al., 2009; Tall, 1990). L'hydrolyse des triglycérides sous l'action de la LPL au niveau de l'endothélium des vaisseaux de la circulation sanguine réduit la taille des VLDLs et les VLDLs résiduels résultent en des lipoprotéines de densité intermédiaire (*intermediate density lipoproteins*, IDLs). Grâce à la présence de l'ApoE, les IDLs peuvent être reconnues par différents types cellulaires possédant des LDL-R ou LRP (Martins et al., 2000) tels que les hépatocytes afin d'être dégradés par captation hépatique.

Cependant, une partie des IDLs ne sont pas captés par le foie, mais subissent des remodelages sous l'action de la lipase hépatique (HL). La HL est localisée à la surface des cellules hépatiques et assure l'hydrolyse des triglycérides et des phospholipides des IDLs. Les particules IDLs perdent alors leurs lipides restants hors cholestérol et sont donc enrichies en esters de cholestérol : ces particules résiduelles de petite densité sont appelées LDLs (*low density lipoprotein*). Les LDLs sont reconnues par les organes périphériques par les LDL-R. Ainsi, ils permettent de distribuer le cholestérol estérifié à l'organisme entier (Goldstein and Brown, 2009). Le LDL-R est synthétisé dans le réticulum endoplasmique puis exposé à la surface cellulaire où il peut se lier avec une grande affinité aux particules de LDLs. La reconnaissance d'une particule LDL par le LDL-R active l'internalisation du complexe par endocytose via les vésicules de clathrine. Après l'internalisation, le récepteur est par la suite recyclé à la membrane plasmique et les endosomes contenant les particules de LDLs fusionnent avec les lysosomes, dégradant alors le contenu. Les esters de cholestérol sont hydrolysés, puis le cholestérol libre peut être ré-estérifié par l'ACAT1 et stocké dans les gouttelettes lipidiques du cytoplasme ou utilisé comme source pour la synthèse des membranes et des hormones stéroïdiennes ou des acides biliaires en fonction du type cellulaires (Afonso et al., 2018; Ramasamy, 2014).



**Figure 2.6 : Les voies de transport du cholestérol aux tissus périphériques.**

La voie exogène et la voie endogène du cholestérol, par la formation de lipoprotéine, permettent de distribuer le cholestérol aux tissus périphériques. Le foie possède une place centrale parmi ces deux voies. LPL : lipoprotéine lipase. MTP : microsomal triglyceride transfer protein. ACAT2 : acyl CoA cholesterol acyl transferase. HL : lipase hépatique.

## 2.2. L'efflux du cholestérol

Les cellules des tissus périphériques sont capables à la fois de synthétiser *de novo* du cholestérol, ainsi que de capter le cholestérol des lipoprotéines grâce à leurs différents récepteurs membranaires. En revanche, à l'exception des hépatocytes, des cellules surrénales et des cellules gonadiques, les cellules n'ont pas les mêmes capacités à cataboliser le cholestérol en excès. De ce fait, des mécanismes sont mis en place afin d'éliminer l'excédent de cholestérol de la cellule, mécanisme appelé l'efflux du cholestérol cellulaire. L'efflux du cholestérol est une des étapes clés du transport retour du cholestérol et repose sur différents partenaires tels que les lipoprotéines de haute densité (*high density lipoproteins*, HDLs) capables d'accepter le cholestérol cellulaire fourni par des transporteurs spécifiques, puis d'éliminer le cholestérol au niveau du foie par les voies biliaires (Litvinov et al., 2018).

### 2.2.1. Les lipoprotéines de haute densité

Les lipoprotéines HDLs sont appelées ainsi car sont les plus petites et les plus denses des lipoprotéines plasmatiques, constituées d'environ 50% de protéines. La particule HDL isolée par ultracentrifugation est définie comme la lipoprotéine dont la

densité est comprise entre 1,063 à 1,21g/mL et sa taille varie de 7,5 à 15nm, allant de la taille de l'albumine à celle des LDLs (Zannis et al., 2014). Les HDLs constituent un groupe hétérogène de particules aux propriétés physiques et aux composants chimiques différents. Cependant, les HDLs sont constitués d'un élément commun, l'apolipoprotéine ApoA-I, pouvant représenter jusqu'à 70% du contenu protéique des HDLs. Des études protéiques ont identifié plus de 60 protéines différentes, ainsi, en plus de l'ApoA-I, les apolipoprotéines A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III et E sont associées à ces particules (Heinecke, 2009; Vaisar et al., 2007). Les particules HDLs contiennent un noyau hydrophobe d'esters de cholestérol et de quelques triglycérides entourés d'une enveloppe composée de phospholipides, de cholestérol libre, en plus des protéines. Mais la composition lipidique des HDLs varie et cette hétérogénéité est expliquée par le processus de maturation des HDLs et de remodelage impliquant divers événements métaboliques intravasculaires et cellulaires complexes au cours du processus du transport retour du cholestérol. Ainsi, les HDLs discoïdales, également appelés pré $\beta$ -HDL, sont de forme aplatie et leurs maturations génèrent par la suite des particules HDLs sphériques, appelées  $\alpha$ -HDLs. De plus, sous l'action de l'activité des enzymes plasmatiques, ces HDLs sphériques sont divisées en deux groupes : les particules HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub> qui forment les deux principales sous-populations des HDLs circulantes dans le plasma humain. Les HDL<sub>2</sub> sont grandes, légères, riches en esters de cholestérol et les HDL<sub>3</sub> sont petites, denses, pauvres en esters de cholestérol et riches en protéines (Rosenson et al., 2012).

### 2.2.2. Le transport retour du cholestérol (RCT)

La voie du transport retour du cholestérol (*reverse cholesterol transport*, RCT) est la principale voie d'élimination du cholestérol, et constitue donc un mécanisme essentiel au maintien de l'homéostasie du cholestérol cellulaire. La RCT est le processus par lequel les HDLs agissent en tant qu'accepteur de cholestérol, permettant de transporter les réserves excédentaires de cholestérol des tissus périphériques dans le plasma, puis d'acheminer le cholestérol vers le foie, afin d'être directement excrété dans la bile ou d'être métabolisé en acides biliaires (Rosenson et al., 2012). Le RCT comprend donc les étapes suivantes : l'efflux de cholestérol des tissus périphériques vers les HDLs, les remodelages plasmatiques des particules HDLs et l'acheminement du cholestérol des HDLs vers le foie.

#### 2.2.2.1. Efflux du cholestérol des tissus périphériques

L'efflux du cholestérol des tissus périphériques est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs protéines membranaires et plasmatiques. L'efflux peut se produire par une voie unidirectionnelle dépendante de l'ATP médiée par ABCA1 et/ou ABCG1, ainsi que par SR-BI, dans une voie bidirectionnelle. Le premier accepteur de l'efflux du cholestérol est l'apolipoprotéine ApoA-I dépourvue de lipide, néosynthétisée ou recyclée par remodelage des lipoprotéines, qui, par une succession d'événements

dont l'efflux du cholestérol médié par ABCA1, forme les HDLs. Par conséquent, la formation des HDLs est la résultante de l'efflux du cholestérol via l'ApoA-I, mais dans un second temps, les HDLs matures sont également capable d'agir en accepteur du cholestérol médié par ABCG1 ou par diffusion passive facilitée par le SR-B1 (Litvinov et al., 2018; Rohatgi et al., 2021; Rosenson et al., 2012).

#### 2.2.2.1.1. L'apolipoprotéine A-I pauvre en lipide

L'ApoA-I est synthétisée principalement par le foie et l'intestin, sous forme de protéine immature de 267 acides aminés, puis subit un clivage intracellulaire (Zannis et al., 1985). La forme clivée de 249 acides aminés est alors sécrétée dans la circulation sanguine, mais une étape supplémentaire est nécessaire à sa maturation. Dans la circulation, le domaine N-terminal de la pro-ApoA-1 est clivé par BMP-1 (*bone morphogenic protein-1*) et par PCPE-2 (*procollagen C-proteinase enhancer-2*), conduisant alors à la forme mature d'ApoA-I (Zhu et al., 2009). L'apolipoprotéine présente une structure de double hélice  $\alpha$  amphiphile dont les propriétés permettent une forte affinité pour les transporteurs de l'efflux du cholestérol, ainsi que pour les lipides et le cholestérol (Duong et al., 2006; Pourmoussa et al., 2018). De plus, la flexibilité de l'ApoA-I est une caractéristique essentielle de sa fonction, lui permettant de stabiliser des assemblages lipidiques sous différentes formes, ce qui participe aux changements de conformation durant la maturation des HDLs au cours de l'efflux du cholestérol. La forme mature d'ApoA-I circulante et dépourvue de lipide, qu'elle soit nouvellement synthétisée par le foie ou libérée dans la circulation à partir de remodelage des lipoprotéines (décrit dans le paragraphe 2.2.3. Remodelage plasmatique), acquiert rapidement des lipides et du cholestérol par les mécanismes d'efflux, faisant d'elle le premier accepteur du cholestérol.

#### 2.2.2.1.2. ABCA1 efflue le cholestérol vers l'ApoA-I

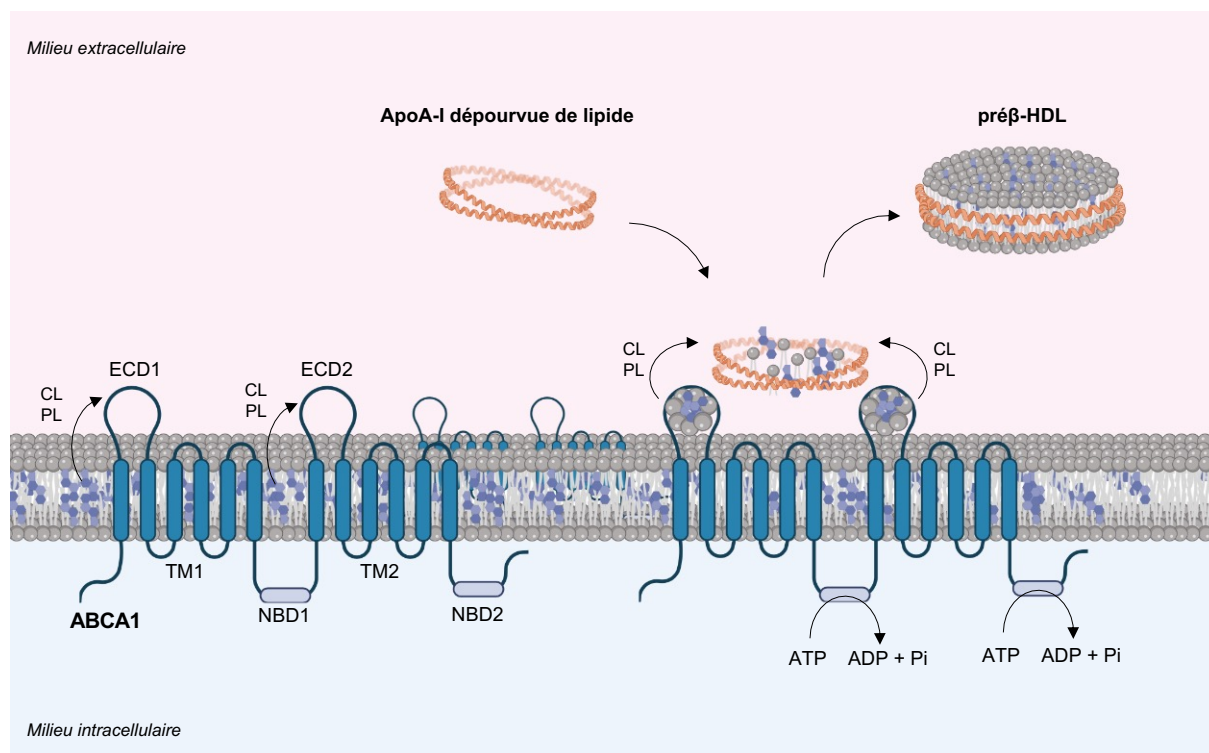
La superfamille des transporteurs ABC (*ATP binding cassette*) humains est composée de 49 membres qui sont divisés en sept sous-familles, de A à G. La compréhension de la base moléculaire de la maladie de Tangier, une maladie autosomique récessive caractérisée par des taux d'HDLs très bas, a conduit à la découverte du gène *Abca1* (*ATP binding cassette A1*) (Bodzioch et al., 1999; Oram, 2000). Le transporteur ABCA1 est constitué de 2261 acides aminés et possède deux domaines transmembranaires (TDMs), chacun composés de 6 segments transmembranaires et chaque TDM est suivi d'une région cytosolique comprenant un domaine de liaison aux nucléotides (NBD 1 et 2) ainsi que d'un domaine de régulation (R) (Figure 2.7). Le transporteur ABCA1 possède en plus deux grands domaines extracellulaires (ECDs) qui sont glycosylés et contiennent quelques liaisons disulfure, ECD1 et ECD2 se situant entre les deux premiers segments transmembranaires du TDM1 et TDM2 respectivement (Kaminski et al., 2006). La liaison de deux molécules d'ATP aux sites NBDs dans la partie cytosolique entraîne la dimérisation de ces

domaines, qui sont alors étroitement liés avec les molécules d'ATP. Cet événement entraîne un changement de conformation de sorte que les TMDs forment une cavité tournée vers l'extérieur. L'hydrolyse de l'ATP en ADP entraîne la séparation des NBDs et la conversion en une cavité tournée vers l'intérieur. Ainsi, le mécanisme généralement accepté par lequel les transporteurs ABC fonctionnent pour transloquer le substrat est le modèle dit « d'accès alterné ». La sélectivité du substrat transporté est déterminée par l'organisation des TMDs et la cavité qu'ils forment (Phillips, 2018). Cependant, des récentes études de l'analyse structurale d'ABCA1 suggèrent que les TMDs sont exposés de tous les côtés aux lipides, et ne forment pas une cavité évidente tournée vers l'intérieur, comme on pourrait s'y attendre pour un transporteur ABC en l'absence d'ATP lié. Au contraire, le récepteur forme un pli protéique et les lipides de la membrane peuvent se lier au transporteur par un mécanisme d'accès latéral (Qian et al., 2017).

Au niveau cellulaire, ABCA1 est localisé à la fois sur la membrane plasmique et dans des compartiments intracellulaires. Il effectue des cycles entre ces localisations et favorise un flux de cholestérol intracellulaire depuis les endosomes tardifs et lysosomes, en passant par le complexe de trans-Golgi, jusqu'à la membrane plasmique (Boadu and Francis, 2006; Phillips, 2018). Ce mouvement produit une réduction des pools intracellulaires de cholestérol de manière dépendante d'ABCA1 qui affecte à la fois le pool de cholestérol basal ainsi que le pool de cholestérol dérivé des LDLs. Au niveau de la membrane plasmique, le transporteur ABCA1 monomérique diffuse librement et transloque les phospholipides du feuillet cytoplasmique vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Les lipides sont stockés dans les ECDs d'ABCA1, qui servent donc de réservoir en attendant l'accepteur de l'efflux. Dans ce cas, ABCA1 est sous forme de dimère et est immobilisé par le cytosquelette d'actine.

ABCA1 est unique parmi les transporteurs ABC car il nécessite une liaison protéine-protéine directe via ses ECDs à l'accepteur pour exporter les lipides. Les structures à double hélice  $\alpha$  d'ApoA-I se lient aux ECDs d'ABCA1 selon un mécanisme dépendant de l'hydrolyse efficace de l'ATP au niveau des NBDs d'ABCA1. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs chimiques ou des mutants d'ABCA1 indiquent que la liaison de l'ApoA-I à ABCA1 est nécessaire pour l'efflux lipidique médié par ABCA1 (Fitzgerald et al., 2004). La liaison de l'ApoA-I sous sa forme mature et pauvre en lipide induit la translocation des phospholipides et du cholestérol libre des ECDs d'ABCA1 vers l'ApoA-I. L'ApoA-I stabilise ABCA1 et empêche sa dégradation. Ainsi, l'ApoA-I augmente la quantité d'ABCA1 à la membrane plasmique, et mobilise les flux intracellulaires d'ABCA1 ce qui accroît l'efflux du cholestérol. Par la suite, ApoA-1 solubilise la bicouche de la membrane plasmique grâce à l'insertion de ses hélices amphipathiques entre les molécules de phospholipides de la membrane, ce qui déstabilise et fragmente la bicouche (Phillips, 2018). La libération de phospholipides et de cholestérol libre vers l'ApoA-I forme alors les HDLs discoïdales, également appelés pré $\beta$ -HDLs. Ils sont ainsi constitués de deux, trois ou quatre molécules d'ApoA-I. Le mouvement du cholestérol cellulaire médié par ABCA1 est

unidirectionnel, entraînant un efflux net, et constitue l'étape limitante de la vitesse de l'efflux du cholestérol.



**Figure 2.7 : L'efflux du cholestérol vers l'ApoA-I.**

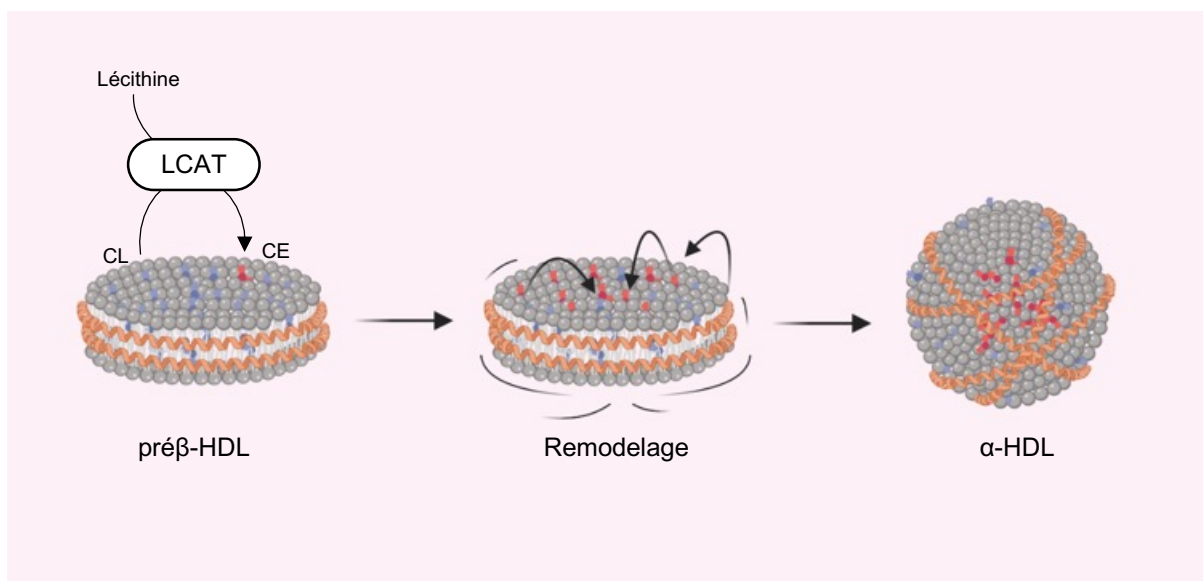
TDM : domaine transmembranaire, NDM : domaine de liaison aux nucléotides, ECD : domaine extracellulaire, CL : cholestérol libre, PL : phospholipide.

### 2.2.2.1.3. ABCG1 efflue le cholestérol vers les HDLs matures

ABCA1 est un régulateur clef du transport du cholestérol et des phospholipides vers les apolipoprotéines ApoA-I pauvre en lipide formant les HDLs discoïdales, mais ABCA1 ne semble pas être impliqué dans le transport du cholestérol vers les HDLs matures. Ce transfert nécessite l'existence d'un second transporteur de la famille des ABCs, ABCG1. Cependant, ABCG1 n'est pas capable d'effluer le cholestérol vers les HDLs discoïdales directement : une étape de maturation des HDLs est nécessaire.

Dans le plasma, les HDLs discoïdales sont rapidement converties en HDLs sphériques matures, appelées  $\alpha$ -HDLs, sous l'action de la LCAT (*lecithin cholesterol acyltransferase*) (Figure 2.8). La LCAT est très réactive avec les particules HDLs discoïdales car l'ApoA-I est un puissant co-activateur de la LCAT. La LCAT joue un rôle important dans le processus de transestérification du cholestérol plasmatique où elle catalyse le transfert des acides gras de la lécithine au résidu hydroxyle du cholestérol libre, ce qui entraîne la formation d'ester de cholestérol. L'importance de la LCAT dans la formation des HDL sphériques matures a été mise en évidence par des études chez des personnes déficientes pour la LCAT, chez lesquelles les HDLs sont

majoritairement discoïdales (Asztalos et al., 2007). En effet, le cholestérol estérifié est moins soluble par perte de la fonction -OH, ainsi, les esters de cholestérol migrent donc de la surface de la particule d'HDL vers son noyau. Cette migration entraîne le passage de la forme discoïdale à la forme sphérique de la particule d'HDL (Trajkovska and Topuzovska, 2017). Les particules d'HDL matures sont hétérogènes en termes de taille et de contenu lipidique. Ainsi, les particules HDLs discoïdales sont les progéniteurs des particules sphériques HDL<sub>3</sub> qui sont petits et denses contrairement aux HDL<sub>2</sub> (Rosenson et al., 2012).



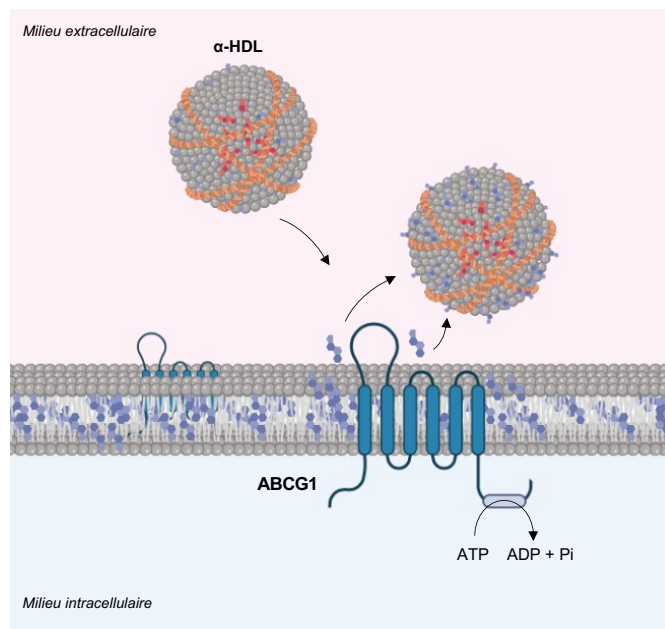
**Figure 2.8 : L'estérification du cholestérol plasmatique.**

La LCAT (*lecithin cholesterol acyltransferase*) estérifie le cholestérol libre des particules discoïdales (préβ-HDLs), ce qui va induire des changements de conformation où les esters de cholestérol migrent de la surface de la particule d'HDL vers son noyau. Cela forme alors des HDLs sphériques (α-HDLs).

Structurellement, ABCG1 ne contient qu'un seul domaine transmembranaire hydrophobe composé de 6 segments transmembranaires et donc d'une seule région cytosolique de domaine de liaison aux nucléotides (Litvinov et al., 2018). Il ressemble alors à la moitié du transporteur ABCA1 ce qui lui doit le surnom de demi-transporteur. Cependant, de nombreuses similitudes entre ABCG1 et ABCA1 sont reportées, telles que la localisation cellulaire, la translocation entre les compartiments intracellulaires favorisant dans ce cas des mouvements du cholestérol du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique, l'activité de translocation des lipides à travers la membrane plasmique et les mécanismes de régulation de son expression qui sera détaillée par la suite (Phillips, 2014; Tarling and Edwards, 2011). La présence de mutation du motif Walker A de liaison à l'ATP abolit l'efflux du cholestérol médié par ABCG1, ce qui indique que le domaine de liaison à l'ATP de l'ABCG1 est essentiel à l'activité de transport des lipides d'ABCG1 ainsi qu'aux trafics intracellulaires de la protéine (Tall et al., 2008; Vaughan and Oram, 2005). Les études des sérums de patients hétérozygotes pour LCAT ont permis de comprendre l'accepteur final du cholestérol médié par ABCG1 : ces sérums présentent une capacité d'efflux du

cholestérol médiée par ABCA1 augmentée alors que celle médiée par ABCG1 est diminuée. Ces propriétés ont été attribuées à l'augmentation des sous-populations de pré- $\beta$ -HDLs accompagnée d'une réduction des  $\alpha$ -HDLs dans les sérums des patients hétérozygotes pour LCAT (Calabresi et al., 2009). De ce fait, ABCG1 favorise la mobilisation du cholestérol intracellulaire vers les particules HDLs matures, de manière plus efficace lorsqu'il s'agit des particules HDL<sub>3</sub> (Llera-Moya et al., 2010; Terasaka et al., 2007) (Figure 2.9).

Ainsi, une relation synergique existe entre ABCA1 et ABCG1 dans le mécanisme d'exportation du cholestérol cellulaire, où ABCA1 transfère les lipides vers l'ApoA-I pauvre en lipide pour générer des HDLs discoïdaux qui servent à leur tour de substrats de l'efflux du cholestérol médié par ABCG1. La LCAT va à nouveau estérifier le cholestérol libre nouvellement acquis des  $\alpha$ -HDL.



**Figure 2.9 : L'efflux du cholestérol vers les HDLs matures.**

Les particules  $\alpha$ -HDLs formées par l'efflux du cholestérol médiée par ABCA1 puis par l'action de la LCAT sont alors capables d'accepter le cholestérol libre efflué par le transporteur ABCG1 présenté dans cette figure.

#### 2.2.2.1.4. SR-BI dans l'efflux du cholestérol

Le récepteur scavenger de classe B type 1 (SR-BI) est un membre de la superfamille CD36 des récepteurs scavengers. Le récepteur SR-BI est une protéine de 509 acides aminés qui possède deux domaines hydrophobes et un domaine extracellulaire glycosylé, ainsi qu'un domaine C-terminal cytoplasmique présentant un domaine de régulation. Ce récepteur est majoritairement exprimé dans le foie, où il joue un rôle dans la voie de transport inverse du cholestérol, et dans les tissus stéroïdiens, où il assure la capture et libération intracellulaire du cholestérol. Il est

également exprimé dans différents types cellulaires des tissus périphériques (Shen et al., 2017). SR-BI est un récepteur établissant un flux bidirectionnel entre les cellules et les HDLs, dont l'effet net est dicté par le statut du cholestérol cellulaire, ainsi qu'à la composition et à la concentration de l'accepteur dans l'environnement extracellulaire. Ainsi, il est capable d'entraîner des mouvements globaux de cholestérol en faveur de l'efflux. Le second rôle de SR-BI, d'autant plus important dans le RCT sera détaillé dans un autre paragraphe.

Ainsi, en plus des transporteurs ABCA1 et ABCG1, SR-BI est également un médiateur de l'efflux de cholestérol cellulaire vers les particules HDLs vraisemblablement par le tunnel hydrophobe du domaine extracellulaire de SR-BI, extrayant le cholestérol libre des cellules. Les mécanismes mis en jeu diffèrent en fonction des concentrations extracellulaires de HDLs faibles et élevées. Dans tous les cas, SR-BI efflue le cholestérol vers les HDLs matures. La liaison de l'HDL à SR-BI semblerait importante pour le transfert du cholestérol libre à travers le tunnel hydrophobe à de faibles concentrations d'HDLs, cela induit par des différences de concentrations de phospholipides, de cholestérols libres ainsi que estérifiés entre la particule HDL et la membrane plasmique (Yancey et al., 2000). Lorsque la concentration d'HDL plasmatique est élevée, les sites de liaison entre l'HDL et SR-BI sont alors saturés mais SR-BI induit une réorganisation du cholestérol libre dans la membrane plasmique et crée des domaines de cholestérol libre dit « activés », qui vont alors effluer (Thuahnai et al., 2004). Compte tenu de son rôle bidirectionnel, le réel rôle de SR-BI dans l'efflux du cholestérol *in vivo* est difficilement expliqué, puisqu'après l'efflux du cholestérol libre vers les HDLs, SR-BI est également capable de capter les particules HDLs riches en cholestérol estérifiés après l'action de la LCAT. De ce fait, SR-BI ne semble pas participer à l'efflux net de cholestérol des cellules (Yvan-Charvet et al., 2008a).

### 2.2.3. Le remodelage plasmatique des HDLs

Après avoir éliminé le cholestérol des tissus périphériques grâce aux mécanismes d'efflux médiés par les récepteurs, les HDLs transportent le cholestérol libre ou estérifié ainsi que les triglycérides et phospholipides en direction du foie. Cependant, différents remodelages des HDLs se produisent, ce qui permet la transformation des HDLs ainsi que d'assurer des échanges de lipides et d'apolipoprotéines entre les différentes lipoprotéines (Figure 2.10).

Les particules HDLs sont tout d'abord remodelées par la LCAT, comme décrit dans le paragraphe 2.2.2.3 : ABCG1 efflue le cholestérol vers les HDLs matures. En effet, les transporteurs ABCG1 sont capables d'effluer le cholestérol libre uniquement vers les particules d'HDLs matures, ce qui requiert la transformation de la forme discoïdale vers la forme HDL sphérique, grâce à l'estérification du cholestérol libre par la LCAT. Après efflux du cholestérol par ABCG1, les HDLs matures possèdent de

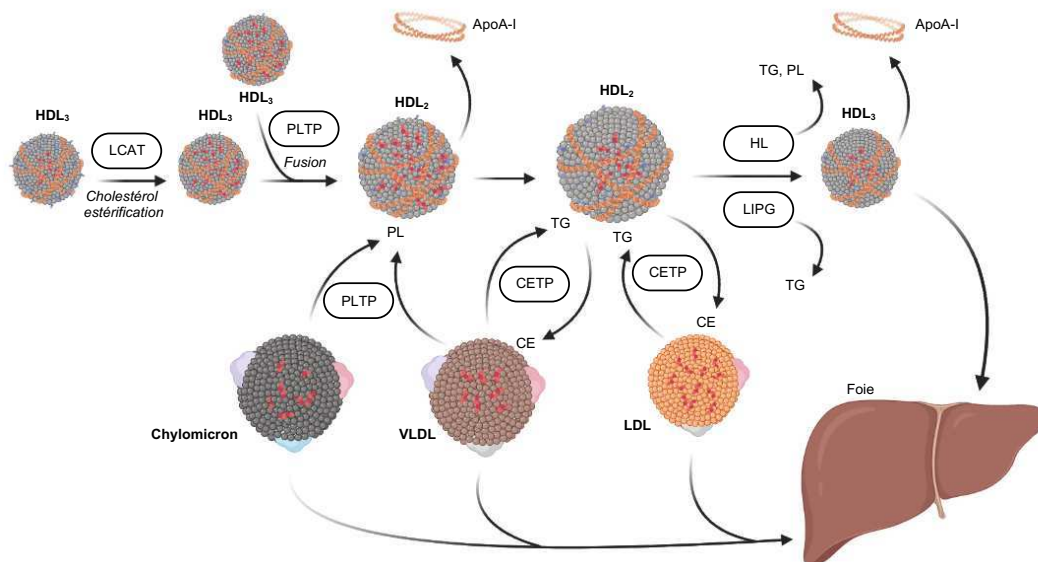
nouvelles molécules de cholestérol libre qui sont alors à nouveau estérifiées par la LCAT.

La PLTP (*phospholipid transfer protein*) est sécrétée par le foie et appartient à la famille des protéines de transfert de lipides. La PLTP est capable de catalyser la fusion de deux particules HDL<sub>3</sub>, formant une HDL<sub>2</sub> plus grande, tout en libérant l'ApoA-I pauvre en lipide enclin à l'efflux de cholestérol, le précurseur des préβ-HDL (Jauhainen et al., 1993; Rye and Barter, 2014). De plus, la PLTP facilite le transfert des phospholipides des lipoprotéines riches en triglycérides telles que les chylomicrons et les VLDLs vers les HDLs. Les HDLs sont alors de taille plus importantes et enrichies en phospholipides. En parallèle, les HDLs sont enrichies en triglycérides et appauvries en cholestérols estérifiés par la CETP.

La CETP (*cholesteryl ester transfer protein*) appartient également à la famille des protéines de transfert de lipides. Elle est majoritairement synthétisée par le foie, puis sécrétée dans la circulation sanguine et liée aux HDLs dans la circulation. La CETP est un puissant modulateur de la taille et de la composition des HDLs. La CETP catalyse l'échange des esters de cholestérol des HDLs contre des triglycérides des VLDLs et des LDLs selon un gradient de concentration (Martinelli et al., 2018; Rye and Barter, 2014). Ainsi, ces lipoprotéines riches en ApoB (ApoB-48 et ApoB-100 respectivement) sont enrichies en cholestérols estérifiés ce qui leur permet de le distribuer aux différents organes, mais la majorité des lipoprotéines est éliminée au niveau du foie comme cela a été décrit dans les paragraphes précédents, par la reconnaissance de l'ApoE des lipoprotéines par les récepteurs LDL-R ou LPR des hépatocytes. De ce fait, la CETP joue un rôle central dans le métabolisme du cholestérol. Il est important de noter que la CETP n'est pas exprimée chez la souris, et de ce fait, leurs profils lipidiques plasmatiques sont différents de ceux de l'Homme. De plus, les HDLs pauvres en cholestérol et enrichies en triglycérides sont par la suite reconnues par d'autres enzymes impliquées dans le remodelage : les lipases hépatiques et endothéliales.

La famille des gènes codant pour les triglycérides lipases comporte les lipoprotéines lipases (LPL) dont le rôle a été décrit dans l'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons et des VLDLs (Paragraphe 2.1.4 : Les sources du cholestérol), mais comporte également les lipases hépatiques (HL) et les lipases endothéliales (LIPG), toutes deux plasmatiques. La HL est responsable de l'hydrolyse des triglycérides et des phospholipides des IDLs, conduisant à la formation LDLs (Paragraphe 2.1.5 : L'apport du cholestérol aux tissus périphériques). La HL participe également au remodelage des HDLs, en parallèle de la LIPG. La LIPG et la HL hydrolysent les phospholipides des HDL<sub>2</sub> enrichies sous l'action de la PLTP, et la HL hydrolysent les triglycérides fournis par la CETP (Santamarina-Fojo et al., 2004; Yu et al., 2017). Les acides gras libérés sont pris en charges par les cellules avoisinantes. Ainsi, ces enzymes participent à la conversion des grandes particules HDL<sub>2</sub> en des particules plus petites HDL<sub>3</sub>, et lorsque les particules HDLs sont plus petites, elles n'ont pas besoin

de beaucoup d'ApoA-I ce qui libère des apolipoprotéines ApoA-I dépourvues de lipides dans la circulation. Ainsi, les HDLs de plus petites tailles vont être captées par le foie.

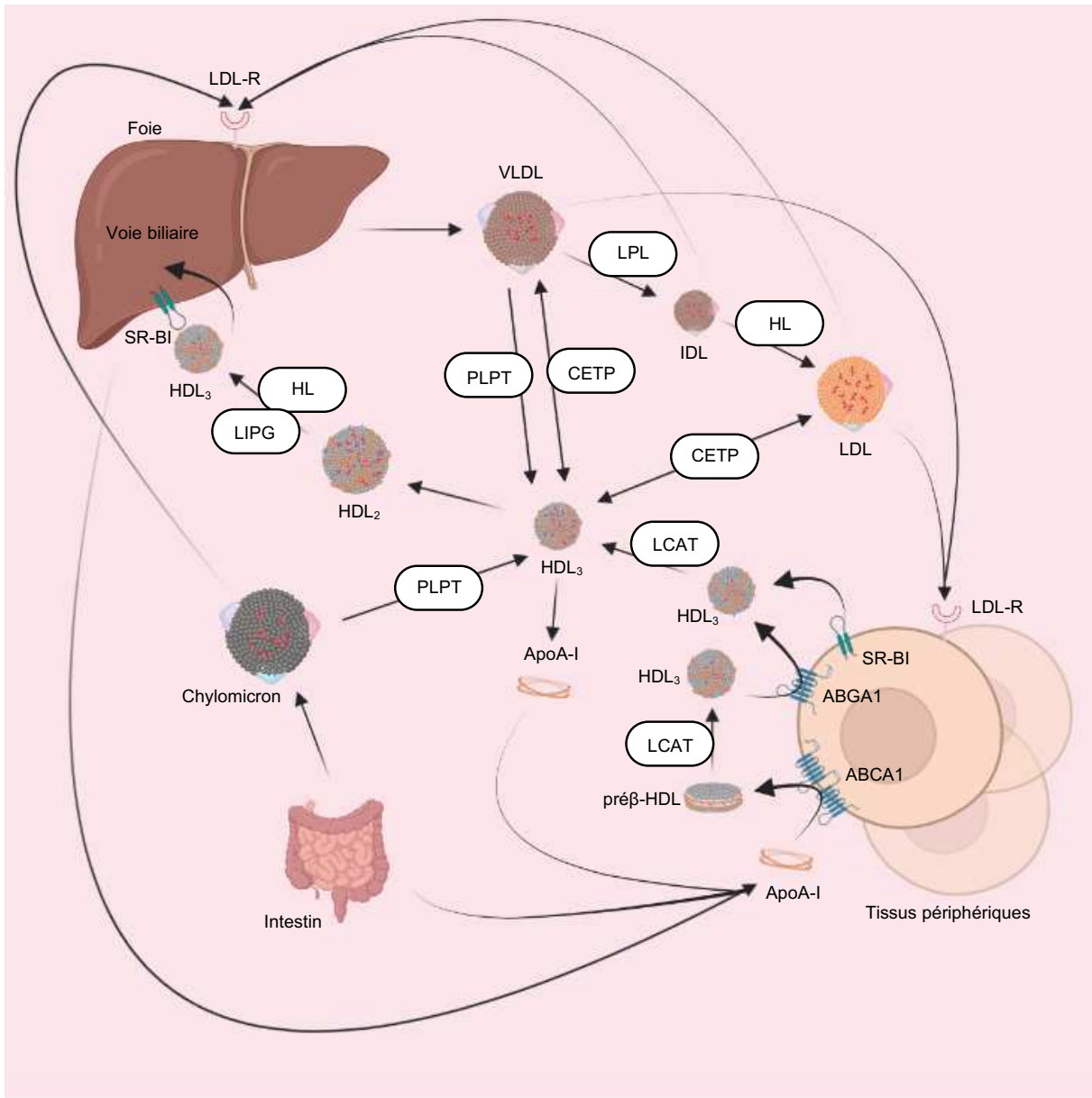


**Figure 2.10 : Les remodelages plasmatiques des HDLs.**

LCAT : lecithin cholesterol acyltransferase, PLTP : phospholipid transfer protein, PL : phospholipides, TG : triglycérides, CE : ester de cholestérol, CETP : cholesteryl ester transfer protein, HL : lipase hépatique, LIPG : lipases endothéliales.

#### 2.2.4. La captation hépatique des HDLs

Les HDLs de plus petites tailles vont être captés par le foie et leurs cholestérols éliminés par les voies biliaires, ce qui représente la dernière étape du RCT (Figure 2.11). Ainsi, les HDLs se lient aux récepteurs SR-BI, puis les ester de cholestérols sont délivrés au niveau de la membrane plasmique sans nécessiter l'internalisation de la particule HDL (Acton et al., 1996). De cette manière, les HDLs matures sont rapidement recyclées en ApoA-I libre dépourvue de lipide qui peut alors recommencer un nouveau cycle de transport retour de cholestérol. Le cholestérol estérifié est quant à lui pris en charge par l'hépatocyte qui, contrairement aux autres cellules des tissus périphériques, a la capacité de le cataboliser. Ainsi, il est converti en acides biliaires par la voie de synthèse spécifique appelée la voie catabolique du cholestérol, ou alternativement, le cholestérol est directement sécrété dans la bile, en parallèle des acides biliaires (Shen et al., 2017). Les acides biliaires sont excrétés dans la lumière de l'intestin grêle grâce à un transporteur de la famille des ABCs, ABCB11 également appelé BSEP (*bile salt export pump*) tandis que le cholestérol libre est excrété par ABCG5 et ABCG8 qui fonctionnent en hétérodimère (Afonso et al., 2018).



**Figure 2.11 : Le métabolisme des lipoprotéines et le transport retour du cholestérol.**

LCAT : lecithin cholesterol acyltransferase, PLTP : *phospholipid transfer protein*, CETP : *cholesteryl ester transfer protein*, HL : lipase hépatique, LIPG : lipases endothéliales, PL : phospholipides, TG : triglycérides, CE : ester de cholestérol.

### 2.3. Les régulations de l'homéostasie cellulaire du cholestérol

L'homéostasie du cholestérol est vitale pour le bon fonctionnement des cellules et de l'organisme. Le taux de cholestérol cellulaire reflète l'équilibre entre la biosynthèse, l'absorption, l'exportation et l'estérification à des fins de stockage. De ce fait, différents points de régulation sont mis en place afin de réguler l'homéostasie cellulaire du cholestérol. Seulement deux de ces points de régulation seront détaillés dans les paragraphes suivants, tous deux sous le contrôle des taux cellulaires du cholestérol permettant une l'adaptation et le contrôle de l'homéostasie cellulaire.

### 2.3.1. Régulation de la synthèse du cholestérol : SREBP2

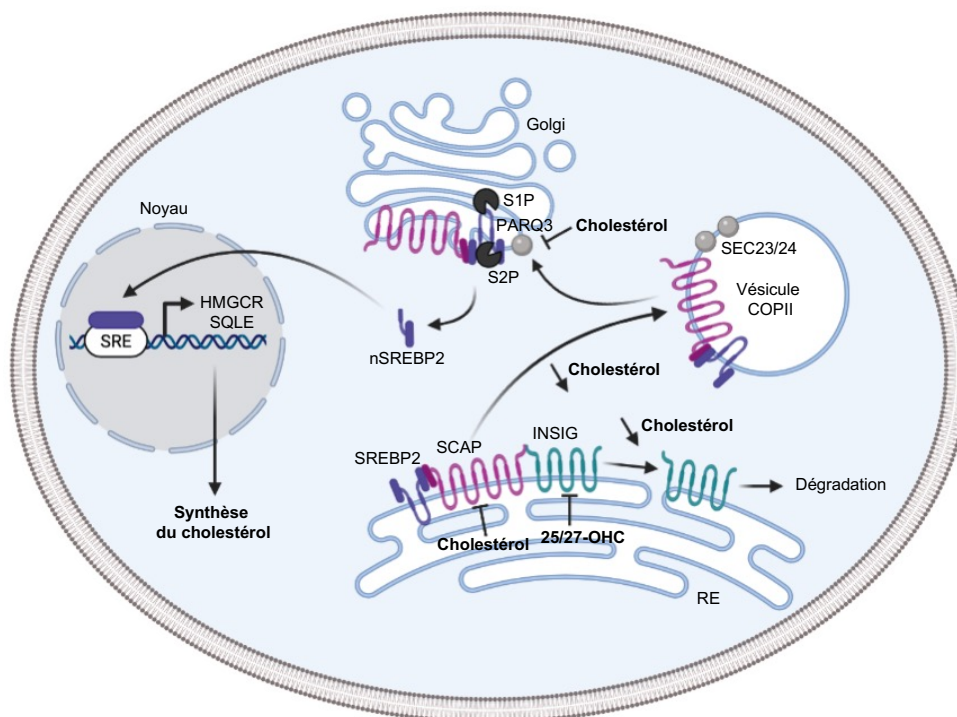
Les protéines de liaison des éléments de régulation des stérols (*sterol regulatory element-binding proteins*, SREBPs) sont des facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des lipides. Le facteur SREBP2 est le régulateur transcriptionnel principal de la biosynthèse du cholestérol, tandis SREBP1a et SREBP1c sont impliqués dans la régulation de la synthèse des lipides et de la synthèse des acides gras, respectivement (Shimano and Sato, 2017). SREBP2 est un facteur de transcription qui se lie aux régions promotrices des gènes possédant des éléments régulateurs des stérols (SRE) permettant le contrôle transcriptionnel des enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol.

Pour devenir actif, SREBP2 doit transloquer du réticulum endoplasmique (RE) vers l'appareil de Golgi afin de subir des modifications protéolytiques et devenir un facteur de transcription fonctionnellement actif (Figure 2.12). SREBP2 est synthétisé sous la forme d'un précurseur ancré à la membrane du RE, composé d'un domaine de transactivation N-terminal reconnaissant les régions SRE de l'ADN, de deux domaines transmembranaires séparés par une courte boucle orientée vers la lumière du RE et d'un domaine de régulation C-terminal qui interagit avec le domaine de répétition WD de la protéine SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) (Gong et al., 2015). SCAP est une autre protéine membranaire du RE. SCAP est essentielle pour le transport de SREBP2 du RE vers le Golgi et possède des boucles qui peuvent interagir avec les protéines SEC23 et SEC24 des vésicules COPII : cette liaison permet au complexe SREBP2-SCAP d'être embarqué par les vésicules COPII vers le Golgi. Cependant, lorsque les niveaux de cholestérol dans le RE augmentent, une des boucles de SCAP se lie préférentiellement au cholestérol, ce qui perturbe la liaison directe avec les vésicules COPII et empêche le complexe SREBP-SCAP de quitter le RE.

En parallèle, deux autres protéines participent à la régulation de SREBP2 dans le RE : les protéines INSIG1 et 2 (*insulin-induced gene 1 and 2*) interagissent avec SCAP ce qui entraîne la rétention du complexe SREBP2-SCAP à la membrane du RE (Radhakrishnan et al., 2007). Les protéines INSIGs sont régulées par les oxystérols, des dérivés du cholestérol, dont le 25- et le 27-hydroxycholestérol (25/27-OHC). Lorsque les taux de cholestérol et d'oxystérol sont faibles, INSIG est alors dégradé, et le complexe SREBP2-SCAP peut quitter le RE. La protéine d'ancrage du complexe SREBP2-SCAP au niveau du Golgi, PAQR3 (*progesterin and adipog receptor family member 3*), est également dépendante du cholestérol, ce qui fournit une régulation supplémentaire de l'activité de SREBP2 par les taux de cholestérol intracellulaire (Xu et al., 2015). Pour que SREBP2 acquière sa fonction de facteur de transcription, il doit être converti en sa forme nucléaire, appelée nSREBP2, par deux étapes de clivage protéolytique. La première étape est le clivage de la boucle du RE des SREBP par la S1P, aussi connue sous le nom de MBTPS1 (*membrane-bound transcription factor site-1 protease*), générant une protéine SREBP2 qui a la moitié de sa taille initiale (Shimano and Sato, 2017). Ensuite, la région N-terminale est clivée par S2P, ce qui

libère alors nSREBP2 et permet son transport vers le noyau. nSREBP2 active la transcription des gènes cibles en se liant aux domaines SRE sur les promoteurs des gènes de l'HMG-CoA réductase (HMGCR) ainsi que de la squalène monooxygénase (SQLE) ce qui permet alors d'augmenter la biosynthèse du cholestérol (Howe et al., 2017). En effet, ces deux enzymes sont les plus importantes de la synthèse du cholestérol et représentent les enzymes limitantes de la réaction. Le cholestérol et les oxystérols permettent donc de réguler la transcription de l'HMGCR et la SQLE par des mécanismes de rétrocontrôle afin de réguler l'homéostasie cellulaire du cholestérol et d'augmenter la synthèse lorsque les taux de cholestérol intracellulaire sont faibles.

D'autres gènes importants dans l'homéostasie du cholestérol sont sous la régulation de SREBP2, tels que les LDL-R afin d'augmenter l'absorption du cholestérol provenant des lipoprotéines riches cholestérol (principalement les VLDLs et les LDLs) (Brown and Goldstein, 1985; Rice et al., 2014). De manière surprenante, SREBP2 régule en parallèle la dégradation des LDL-R par activation de l'expression de la protéase PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin 9a*). En effet, PCSK9 augmente la dégradation du LDL-R ce qui diminue donc à la captation du cholestérol par les cellules (Luo et al., 2020). Outre son rôle d'activateur de la synthèse des gènes impliqués dans la synthèse et l'absorption du cholestérol, SREBP2 peut également inhiber la transcription des gènes impliqués dans l'efflux du cholestérol, tels qu'ABCA1 et donc limiter l'export du cholestérol lorsque les taux de cholestérol intracellulaire sont faibles : cela représente un autre moyen de contrôler les taux cellulaires de cholestérol sous l'activation de SREBP2.



**Figure 2.12 : La régulation de la synthèse du cholestérol par SREBP2.**

Le principal régulateur de la synthèse du cholestérol, SREBP2, est ancré à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) par interactions avec SCAP et INSIGN. Lorsque les niveaux de cholestérol intracellulaire sont réduits, INSIGN est dégradé et le complexe SREBP2-SCAP est trié dans des

vésicules à enveloppe COPII, dans un processus médié par les protéines SEC23/24. Les vésicules COPII escortent le complexe SREBP2-SCAP du RE au Golgi, pris en charge par PARQ3 qui est également dépendante du cholestérol. SREBP2 est clivée par deux protéases S1P et S2P, générant la forme nSREBP2. Dans le noyau, nSREBP2 se lie aux domaines de liaison à l'ADN spécifiques appelés SRE (sterol regulatory element), induisant la transcription de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol tels que les enzymes HMGCR et SQLE parmi d'autres, afin de restaurer les concentrations intracellulaires de cholestérol. Adaptée de (Afonso et al., 2018)

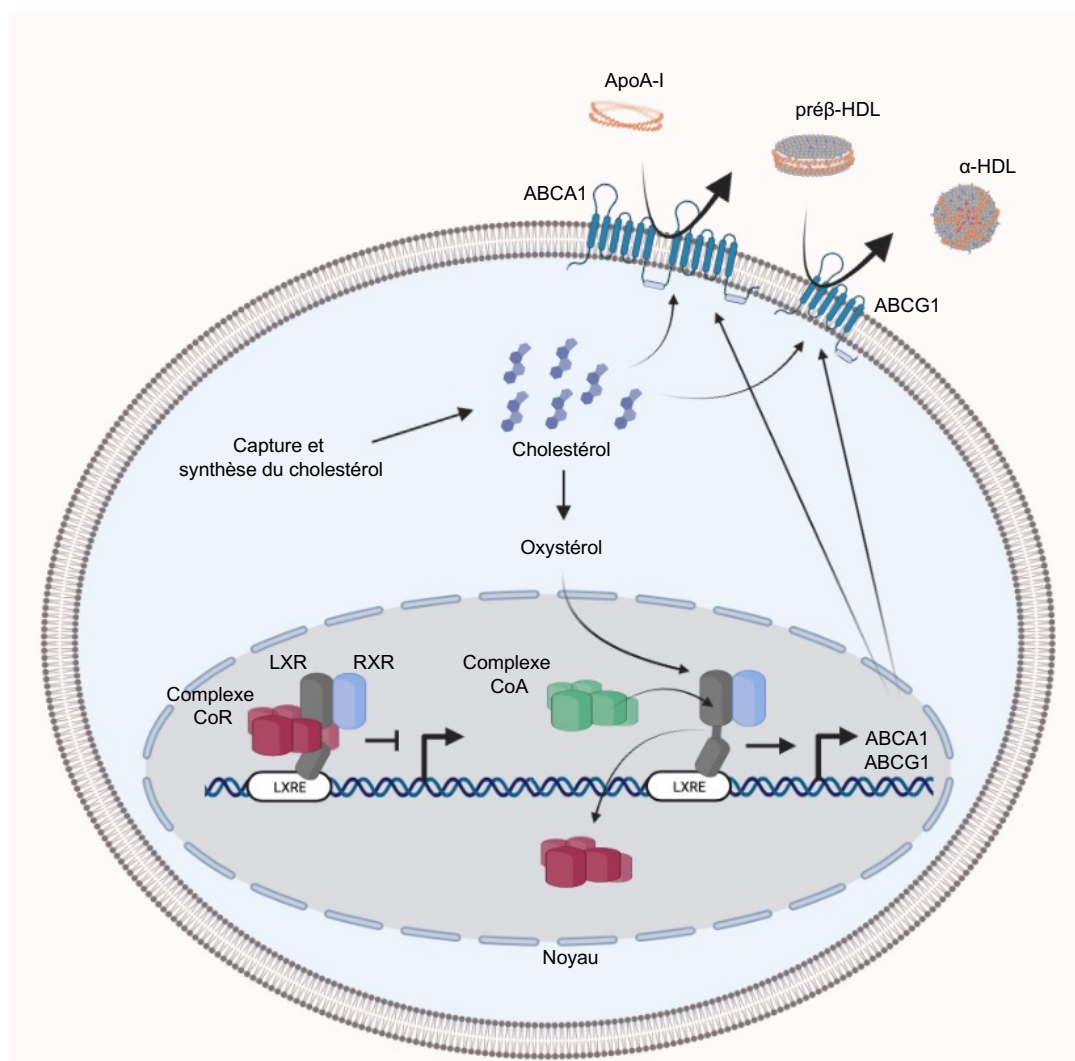
### 2.3.2. Régulation de l'efflux cellulaire du cholestérol : LXR

Alors que SREBP2 favorise la biosynthèse et l'absorption du cholestérol en réponse à de faible niveau de cholestérol, LXR (*liver-X-receptor*) facilite l'élimination de l'excès de cholestérol lorsque ce dernier est en abondance dans la cellule. En effet, LXR régule l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1, les deux transporteurs principaux de l'efflux cellulaire du cholestérol (Wang and Tontonoz, 2018). Mais ce n'est pas la seule étape du RCT qui est sous le contrôle de LXR ; LXR régule également la synthèse des acides biliaires et la sécrétion biliaire du cholestérol (Olkkonen et al., 2012). Il a également été montré que les LXRs sont des suppresseurs de l'expression des gènes inflammatoires dans les macrophages et ils participent à la régulation immunitaire (Castrillo et al., 2003).

Les LXRs appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires dont le rôle dans la régulation de l'efflux du cholestérol est bien établi et sont activés par les oxystérols, les dérivés du cholestérol, permettant ainsi un rétrocontrôle positif afin de maintenir l'homéostasie cellulaire du cholestérol (Figure 2.13) (Zhang et al., 2012). Deux isoformes de LXR existent : LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  codé par *Nr1h3* et *Nr1h2* (*nuclear receptor subfamily 1 group h member 3 and 2*), respectivement. LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  partagent une grande homologie de séquence mais possèdent des distributions tissulaires distinctes. LXR $\alpha$  est fortement exprimé dans les types cellulaires métaboliquement actifs, notamment le foie, l'intestin, le tissu adipeux et les macrophages, tandis que LXR $\beta$  est exprimé de manière ubiquitaire. Ils possèdent un domaine de fixation de ligand et un domaine de liaison à l'ADN reconnaissant des régions spécifiques au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles, appelées LXRE (*LXR response element*). Cependant, la formation d'hétérodimères obligatoires avec les RXRs (*retinoïd X receptor*) est requise pour se fixer aux régions LXRE. En absence de ligand, les hétérodimères LXR-RXR sont localisés sur les domaines de liaison à l'ADN LXRE et sont liés à des complexes corépresseurs (CoR) ce qui réprime l'expression des gènes cibles (Bovenga et al., 2015) (Figure 2.13). Bien que les LXRs étaient initialement désignés comme des récepteurs orphelins, une étude a rapidement permis d'identifier les oxystérols comme agonistes des LXRs (Janowski et al., 1996). Ainsi, lorsque les oxystérols se lient au domaine de liaison de ligand des LXRs, des changements de conformations s'opèrent permettant alors la libération des complexes CoR du complexe LXR-RXR et le recrutement des complexes co-activateurs (CoA). Ces complexes CoA ouvrent la région promotrice permettant d'activer la transcription

des gènes cibles. Ainsi, en réponse à des taux élevés d'oxystérols dans la cellule, reflétant des taux de cholestérol augmentés, LXR permet l'activation de la transcription des transporteurs ABCA1 et ABCG1, ce qui facilite l'efflux cellulaire du cholestérol (Costet et al., 2000; Venkateswaran et al., 2000).

D'autres cibles de LXR sont également impliquées dans la voie du RCT : les LXRs induisent l'expression de certaines apolipoprotéines constituant les lipoprotéines, ainsi que des gènes qui codent pour des enzymes impliquées dans le remodelage des lipoprotéines telles que la LPL, la PLTP et la CETP. LXR permet également d'activer l'expression d'ABCG5 et d'ABCG8 au niveau des hépatocytes afin d'excréter le cholestérol transporté lors du RCT dans l'intestin (Wang and Tontonoz, 2018).



**Figure 2.13 : La régulation de l'efflux du cholestérol par LXR.**

Les hétérodimères LXR-RXR sont localisés sur les sites de liaison à l'ADN LXRE (*LXR response element*) des gènes cibles et sont liés aux complexes corépresseurs (CoR). Lorsque les taux cellulaires d'oxystérols augmentent, les oxystérols se lient au site de liaison du ligand des LXRs : les complexes CoR sont alors libérés du complexe LXR-RXR et les complexes co-activateurs (CoA) sont recrutés. Cela permet d'ouvrir la région promotrice ce qui active la transcription des gènes cibles, tels que *Abca1* et *Abcg1*.

## 2.4. Les liens établis entre cholestérol et cancer

De nombreuses études ont pu mettre en évidence des liens existants entre l'obésité et la dyslipidémie, toutes deux induites par l'alimentation, et le développement tumoral (Deng et al., 2016; Duong et al., 2015; Khandekar et al., 2011). En effet, l'interaction entre l'obésité, l'inflammation et le microenvironnement tumoral favorise l'expansion tumorale, en plus de contrôler la résistance à la chimiothérapie dans certains types de cancer (Lehuédé et al., 2019). Étant donné que l'obésité est étroitement liée au métabolisme du cholestérol par les dyslipidémies observées chez les patients obèses, différentes études se sont intéressées au rôle du cholestérol, indépendamment de l'obésité, dans l'initiation et la progression tumorale. Les altérations du métabolisme du cholestérol représentent une caractéristique commune à de nombreux cancers. Le cholestérol et ses dérivés contribuent au développement et à la croissance tumorale, notamment à la prolifération, à la migration et à l'invasion des cellules cancéreuses (Huang et al., 2020). L'accumulation cellulaire de cholestérol peut être engendrée par une augmentation de la capture du cholestérol provenant des LDLs, une augmentation de la synthèse cellulaire ainsi qu'une diminution de l'efflux du cholestérol médié par les HDLs. Au sein des tumeurs, le cholestérol peut avoir plusieurs rôles en fonction du type cellulaire l'accumulant : le cholestérol au sein des cellules immunitaires et plus particulièrement des macrophages contribue aux réponses pro-inflammatoires. Dans un contexte cancéreux, cela peut se révéler être un atout majeur afin de lutter contre le développement tumoral en assurant une réponse anti-tumorale. De plus, étant une des sources principales de la composition des membranes mais également des radeaux lipidiques jouant un rôle important dans la transduction des signaux intracellulaires, le cholestérol est apparu un élément essentiel dans le processus de prolifération des cellules cancéreuses. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées aux rôles du cholestérol dans le développement des cancers (Kuzu et al., 2016).

### 2.4.1. Les études épidémiologiques

L'hypercholestérolémie, définie par l'augmentation des taux de cholestérol plasmatique, est positivement corrélée à un risque plus élevé de développer certains types de cancers tels que le cancer du côlon, du rectum, de la prostate et des testicules (Murai, 2015; Radišauskas et al., 2016). Une méta-analyse a suggéré que la consommation de cholestérol alimentaire augmente le risque de cancer du sein (Li et al., 2016a) et l'augmentation du cholestérol associée à la dyslipidémie semble jouer un rôle important dans la croissance et les métastases de ce type de cancer (Nelson et al., 2013). De plus, une méta-analyse suggère un lien entre l'utilisation des statines, les inhibiteurs de la synthèse du cholestérol, et une légère réduction de la mortalité liée au cancer pour différents types de cancer différents (Nielsen et al., 2012). Cependant, ces résultats diffèrent d'une seconde méta-analyse concluant de l'inefficacité des statines à prévenir l'incidence de cancer ainsi qu'à réduire la mortalité

des patients, tous types de cancer confondus (Emberson et al., 2012). Il semblerait au contraire que les statines augmentent l'agressivité de certains cancers (Hoffmann et al., 2006). Ainsi, les études épidémiologiques contradictoires nécessitent des études précliniques approfondies.

Outre le rôle de l'élévation des taux plasmatiques de cholestérol dans le développement de cancer, l'association entre les taux des particules HDLs impliquées dans l'efflux cellulaire du cholestérol et le développement de cancer a également été analysée. Plusieurs méta-analyses ont mis en évidence des corrélations inverses entre les taux des HDL-Cholestérol (HDL-C) et le risque de développer un cancer du sein (Furberg et al., 2004; Kucharska-Newton et al., 2008) ainsi que de nombreux autres types de cancer (Pirro et al., 2018; Yang et al., 2015). De plus, une vaste méta-analyse étudiant les taux des HDL-C lors d'essais cliniques modifiant le profil lipidique des patients permis d'observer une corrélation inverse entre les taux d'HDL-C de départ et l'incidence de cancer par la suite (Jafri et al., 2010). Ainsi, une réduction de 1 mg/dL du taux de HDL-C est associée à une augmentation de 14% du risque de développer un cancer (Yang et al., 2015) et pour chaque augmentation de 10 mg/dL du taux de HDL-C, le taux d'incidence de cancer diminue de 36% (Jafri et al., 2010). Des études additionnelles ont par ailleurs identifié ces mêmes corrélations dans le cancer du poumon (Lin et al., 2017). De plus, des altérations du métabolisme du cholestérol chez les patients atteints de cancer du poumon ont été décrites il y a une vingtaine d'années, identifiant une accumulation du cholestérol dans les tumeurs pulmonaires par rapport aux tissus adjacents sains, accompagnée d'une réduction des taux d'HDL-C (Dessi et al., 1992). Malgré ces découvertes, le rôle de l'accumulation du cholestérol dans les cancers de poumon ainsi que l'impact de l'efflux cellulaire médié par les HDLs ne sont pas encore élucidés et restent à explorer, bien que certaines récentes études mettent en évidence l'existence d'un lien entre l'efflux du cholestérol et la progression tumorale des cancers du poumon (Maslyanko et al., 2021).

Il est difficile de comprendre l'impact réel de la diminution des HDL-C dans le processus de tumorigenèse uniquement sur l'interprétation des études épidémiologiques. De nombreux facteurs de risque sont communs à la diminution des taux des HDL-C ainsi qu'aux développement de cancer. En effet, l'exposition au tabac, l'obésité et le syndrome métabolique, ainsi que d'autres facteurs environnementaux sont responsables de la diminution des HDL-C mais représentent également des facteurs de risque de cancer (Kosmas et al., 2021). Cependant, la diminution des HDL-C dans le développement de cancer a été prédit pour être un facteur indépendant après ajustement pour les différents facteurs de risque mentionnés plus haut.

Le rôle d'un faible taux de HDL-C en tant que facteur causal du cancer pourrait être expliqué, du moins en partie, par l'inflammation chronique : les réponses inflammatoires sont responsables de la production de cytokines pro-inflammatoires, qui d'une part a été associé à un risque accru de transformation maligne dans de

multiples tissus (Mantovani et al., 2008), mais d'autre part, modifient le profil protéique et lipidique des lipoprotéines et contribuent à la réduction des taux des HDL-C (Khovidhunkit et al., 2004). La réduction des taux d'HDL-C diminue leur fonctionnalité dans l'efflux cellulaire du cholestérol en plus de diminuer leur rôle anti-inflammatoire (Tall and Yvan-Charvet, 2015). Ainsi, la réduction des HDL-C pourrait participer aux développements de cancers engendrés par une inflammation chronique. De plus, des faibles taux d'HDL-C pourrait être une conséquence de la présence de cancer dans l'organisme, et dans ce cas, le taux des HDL-C ne représenterait qu'un biomarqueur. Au moins deux mécanismes principaux ont été proposés pour expliquer la réduction des taux plasmatiques des HDL-C au cours du développement de cancer : d'une part, les réponses inflammatoires engendrées par l'activation soutenue du système immunitaire afin de lutter contre les cellules cancéreuses modifient les profils des lipoprotéines et ainsi contribue à la réduction des taux des HDL-C (Kosmas et al., 2021). D'autre part, l'altération du métabolisme du cholestérol, dont l'accumulation de cholestérol intracellulaire, est associée à la prolifération des cellules cancéreuses (Huang et al., 2020) puisque le cholestérol est nécessaire à la formation de nouvelles membranes des cellules cancéreuses, et ainsi, des mécanismes de diminution de l'efflux cellulaire du cholestérol sont mis en place dans les cellules cancéreuses afin d'augmenter les taux intracellulaires.

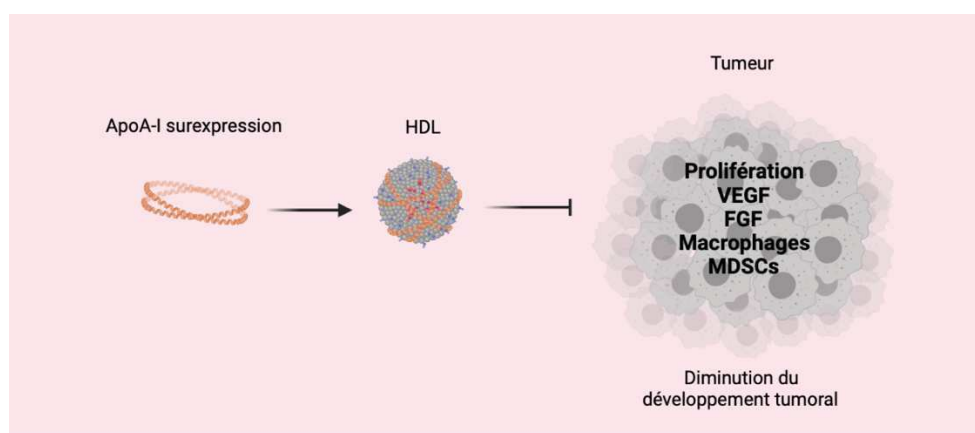
De ce fait, il est important d'élucider le rôle de la diminution des voies d'efflux médiées par les HDL-C dans le cancer, et plus particulièrement dans le cancer du poumon ainsi que les conséquences de l'accumulation de cholestérol dans les différentes cellules de l'environnement tumoral, en particulier les cellules cancéreuses, les cellules immunitaires et du stroma, qui, par nature, ont des fonctions différentes. Quelques études dans différents types de tumeurs se sont intéressées à l'efflux de cholestérol mais, à ce jour, l'importance de cette voie dans le cancer du poumon n'a pas été étudié et cela représente un de mes sujets d'étude de thèse.

#### 2.4.2. Les études précliniques

##### 2.4.2.1. ApoA-1, HDL et développement tumoral

La diminution des HDL-C est associée aux risques de développer des cancers selon les études épidémiologiques. De plus, les HDLs jouent des rôles cruciaux antioxydants, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et vasoprotecteurs dans divers tissus (Tall and Yvan-Charvet, 2015). De ce fait, différentes études ont tenté de comprendre le rôle des HDLs dans la progression tumorale grâce à des modèles murins transgéniques qui surexpriment l'ApoA-I, la principale composante des HDLs, mais également par l'utilisation de peptides mimétiques de l'ApoA-I afin d'élever les taux des HDLs. En effet, les peptides mimétiques de l'ApoA-I permettent de reconstituer des HDLs, appelés alors HDLs mimétiques, et ont été conçus pour imiter les fonctionnalités anti-inflammatoires et antioxydantes de l'ApoA-I.

La surexpression de l'ApoA-I humaine chez des souris transgéniques inhibe la croissance tumorale et améliore la survie des souris après inoculation de cellules cancéreuses ovariennes ID8 (Figure 2.14) (Su et al., 2010). De plus, l'administration de peptides mimétiques de l'ApoA-I est également capable de prévenir la progression tumorale et ces effets anti-tumoraux sont attribués à une réduction de la prolifération des cellules ID8 *in vitro*, sans pour autant induire la mort cellulaire par apoptose. Les peptides mimétiques de l'ApoA-I inhibent également l'angiogenèse tumorale en supprimant les voies de signalisation du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) (Gao et al., 2011a). Le même groupe de recherche a, par la suite, montré que l'administration d'HDLs mimétiques inhibe la croissance tumorale de cancer du côlon dans un modèle murin à la suite de l'inoculation de cellules cancéreuses CT26, en plus du nombre et de la tailles des métastases pulmonaires par ces cellules (Su et al., 2012), suggérant alors que le rôle anti-tumoral de l'ApoA-I peut s'étendre à différents types de cancer. De façon consistante avec ces résultats, l'absence de l'ApoA-I augmente la progression tumorale à un rythme beaucoup plus rapide (Zamanian-Daryoush et al., 2013). En effet, la croissance des cellules de mélanome B16F10L *in vivo* ainsi que de cancer de poumon LLC-1 dans un modèle murin déficient pour l'ApoA-I est augmenté par rapport aux souris possédant l'ApoA-I, induisant alors aux souris un désavantage significatif en termes de survie. Cet effet pro-tumoral est aboli par l'injection de l'ApoA-I humaine de manière dose-dépendante. Il est suggéré que l'ApoA-I *in vivo* exerce des effets biologiques antinéoplasiques indirectement via des altérations des fonctions des macrophages et d'autres cellules immunitaires telles que les MDSCs (*myeloid derived suppressor cells*), ce qui modifie alors les réponses immunitaires innées et adaptatives, permettant une réponse anti-tumorale efficace. Ainsi, l'ApoA-I diminue l'environnement tumoral « permissif » en diminuant l'infiltration et l'accumulation de MDSCs dans la tumeur.



**Figure 2.14 : Le rôle anti-tumoral de l'ApoA-I.**

La surexpression de l'ApoA-I par des modèles transgéniques ou par l'administration de peptides mimétiques de l'ApoA-I chez les souris permettent d'élever les taux des HDLs plasmatiques. Dans des modèles syngéniques murins de cancer, cette surexpression de l'ApoA-I permet de réduire la croissance tumorale en diminuant la prolifération des cellules, l'angiogenèse et le recrutement des cellules immunitaires pro-tumoral.

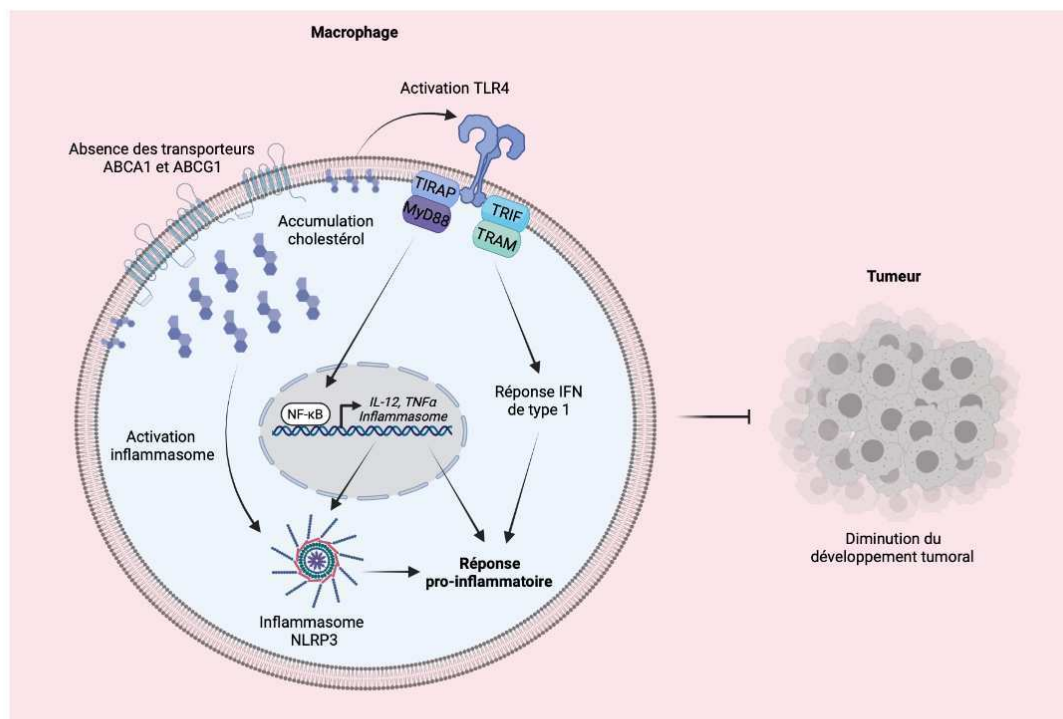
L'élévation des taux de l'ApoA-I et des HDLs réduisent la croissance tumorale dans différents modèles murins de cancer. Afin de comprendre les mécanismes par lesquels l'augmentation de l'efflux du cholestérol semble être bénéfique pour lutter contre la progression tumorale, il est intéressant de mieux comprendre l'impact de l'efflux du cholestérol à la fois dans les populations immunitaires et les cellules cancéreuses, en particulier le rôle de l'efflux du cholestérol médié par ABCA1 et ABCG1, discuté dans les paragraphes suivants.

#### 2.4.2.2. Le rôle de l'efflux dans l'immunité tumorale

Au sein des tumeurs, les macrophages représentent la population immunitaire la plus abondante. Les transporteurs ABCA1 et ABCG1 impliqués dans l'efflux du cholestérol des macrophages semblent favoriser la progression tumorale. En effet, dans des modèles de souris, l'absence du transporteur ABCG1 dans les macrophages diminue la progression tumorale de carcinome de vessie MB49 et de mélanome B16F10 (Sag et al., 2015). Ce phénotype n'est révélé que lorsque les cellules cancéreuses sont inoculées en sous-cutanée dans des souris hypercholestérolémiques, engendré par une nutrition de type « Western-Diet » ou par le fond génétique des souris déficientes pour LDL-R ou ApoE. Ainsi, les macrophages déficients pour ABCG1 accumulent du cholestérol de manière accélérée par l'hypercholestérolémie, tandis que les macrophages des souris âgées accumulent du cholestérol au fil du temps, aboutissant au même phénotype. Ce phénotype anti-tumoral est expliqué par différents mécanismes engendrés lors de l'absence d'ABCG1 dans les macrophages : dans un premier temps, ces macrophages présentent une susceptibilité augmentée à l'apoptose par rapport aux macrophages sauvages, causé par l'accumulation d'oxystérols toxiques tels que le 7-KC. Ainsi, le nombre de macrophage infiltrant la tumeur, communément appelé TAMs (*tumor-associated macrophages*) est alors fortement réduit. Une étude précédente a en effet pu démontrer que l'efflux de 7-KC dépendait d'ABCG1 (Terasaka et al., 2007). Néanmoins, les macrophages qui ne succombent pas à la mort cellulaire subissent cependant des changements fonctionnels (Duan and Luo, 2021). En effet, l'accumulation de cholestérol et de ses dérivés dans les macrophages déficients pour ABCG1 engendre la polarisation de ces macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire, ce qui modifie la réponse immunitaire ainsi que les populations infiltrantes les tumeurs, conduisant notamment à une diminution des LTs régulateurs, permettant l'augmentation par la suite des cellules NK (*natural killer*) et des LTs CD4<sup>+</sup> (Sag, Nat Com 2015). Ces résultats ont par la suite été confirmés par la délétion d'ABCA1 et d'ABCG1 seule ou concomitante dans les mêmes modèles de cancer (Zamanian-Daryoush et al., 2017).

D'un point de vue mécanistique, le cholestérol membranaire, et plus précisément les radeaux lipidiques, joue un rôle central dans la modulation de la signalisation cellulaire telle que la production de cytokines pro-inflammatoire, notamment par

l'activation des voies TLRs (Figure 2.15) (Yvan-Charvet et al., 2008b). De ce fait, l'inactivation génétique des gènes *Abca1* et *Abcg1* des macrophages dans des modèles murins élève le cholestérol membranaire de ces cellules. Cela augmente alors l'expression des TLR4 à la surface membranaire des macrophages et active les voies de signalisations associées, telle que la réponse à l'interféron de type I ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires par activation du facteur nucléaire  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) (Yvan-Charvet et al., 2010a). Outre le rôle dans l'activation des voies des TLRs, l'accumulation de cholestérol participe également à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*) (Tall and Yvan-Charvet, 2015). Les inflammasomes sont des complexes intracellulaires comprenant la molécule détectrice du récepteur de type NOD, la protéine adaptatrice ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) et la caspase-1. Afin d'être activé, l'inflammasome requiert deux signaux : le premier permet l'activation de l'expression génique des constituant de l'inflammasome et le second permet le clivage de la pro-caspase-1 et donc son activation. L'activation de NF- $\kappa\text{B}$  par la voie des TLRs par exemple augmente la transcription de tous les composants de l'inflammasome NLRP3, appelée amorçage de l'inflammasome. Par la suite, le cholestérol intracellulaire accumulé sous forme libre ou de cristaux de cholestérol, active la caspase-1 qui clive alors les pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 en leur forme mature, nécessaire à leur sécrétion (Duell et al., 2010). De plus, il a récemment été mis en évidence que l'absence des transporteurs ABCA1 et ABCG1 dans les cellules myéloïdes active les inflammasomes NLRP3 (Westerterp et al., 2018).



**Figure 2.15 : Le cholestérol active les voies pro-inflammatoires des macrophages.**

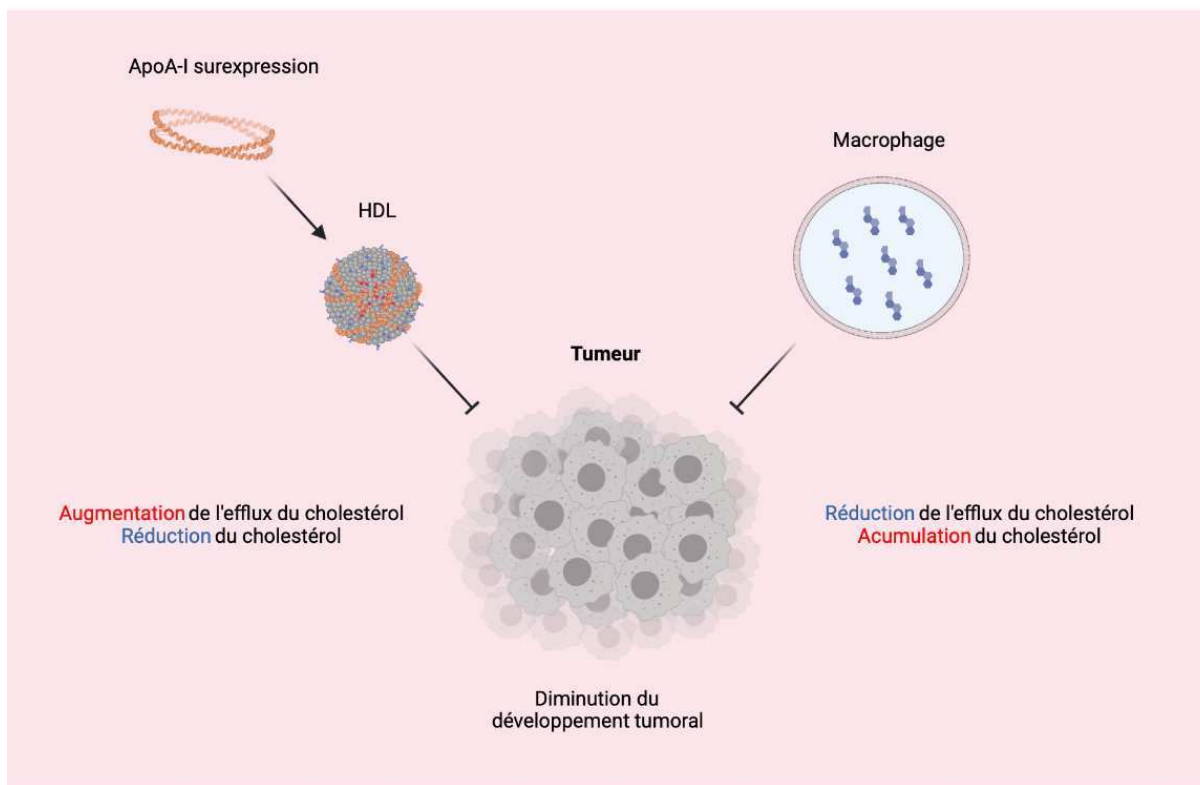
L'accumulation de cholestérol engendré par l'absence des transporteurs ABCA1 et ABCG1 dans les macrophages active la voie des TLR4 et l'inflammasome NLRP3. Dans des modèles syngéniques murins de cancer, les macrophages pro-inflammatoires réduisent la croissance tumorale.

Ces caractéristiques pro-inflammatoires reflètent la polarisation des macrophages vers un phénotype classiquement activé, caractéristiques des « macrophages M1-like ». Les modifications de la teneur en cholestérol de la membrane plasmique des macrophages par la délétion d'ABCA1 et ABCG1 affectent donc considérablement l'activation des macrophages et favorisent une réponse anti-tumorale (Fessler and Parks, 2011; Sag et al., 2015). Ces études permettent de conclure que l'efflux du cholestérol des TAMs est augmenté dans les tumeurs, ce qui diminue leur contenu intracellulaire en cholestérol et diminue alors leur rôle pro-inflammatoire. De ce fait, les cellules cancéreuses échappent à la surveillance immunitaire ce qui contribue à la progression tumorale.

Une autre étude permet d'identifier certains des mécanismes responsables de l'efflux du cholestérol des TAMs (Goossens et al., 2019). Dans un modèle de cancer ovariens ID8, les cellules cancéreuses produisent et sécrètent l'acide hyaluronique, reconnue par les récepteurs CD44 (*homing cell adhesion molecule*, HCAM) et LYVE1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*) des TAMs, ce qui activent l'efflux cellulaire du cholestérol des TAMs de manière dépendante des transporteurs ABCA1 et ABCG1. D'une part, l'augmentation de l'efflux de cholestérol des TAMs modifie les voies de signalisation intracellulaires associées aux radeaux lipidiques, permettant alors l'activation de la voie de l'IL-4. Ainsi, l'efflux du cholestérol polarise les macrophages vers un phénotype alternativement activé, c'est à dire anti-inflammatoire, appelé « macrophages M2-like ». En effet, la voie de l'IL-4 active les voies JAK/STAT6, parmi d'autres, et permet l'expression de gènes favorisant la croissance tumorale en réduisant la réponse immunitaire d'une part, et en soutenant l'invasion et les métastases d'autre part (Duan and Luo, 2021). De plus, les cellules cancéreuses sont fortement avides du cholestérol et sont capables de le récupérer dans le microenvironnement tumoral grâce à la surexpression des apolipoprotéines et de leurs récepteurs (Guillaumond et al., 2015), mais également en induisant l'efflux du cholestérol cellulaire des TAMs, qui libère alors du cholestérol dans l'environnement tumoral disponible par la suite pour les cellules cancéreuses. De ce fait, l'efflux du cholestérol médié par ABCA1 et ABCG1 des TAMs contribue à la fois à la diminution des réponses anti-tumorales des cellules immunitaires mais également à la prolifération des cellules cancéreuses.

Ainsi, d'une part l'élévation des taux de l'ApoA-I et des HDLs favorisent l'efflux du cholestérol et protège de la croissance tumorale, et d'autre part, l'efflux du cholestérol des TAMs contribue à la progression tumorale (Figure 2.16). Ces résultats diamétralement opposés peuvent être expliqués, du moins en partie, par plusieurs mécanismes : l'efflux du cholestérol des macrophages diminue leurs propriétés pro-inflammatoires qui sont requises lors des réponses immunitaires anti-tumorales. Subséquemment, ces réponses pro-inflammatoires sont activées par l'inactivation génétique des transporteurs *Abca1* et *Abcg1* dans les TAMs induisant l'accumulation intracellulaire de cholestérol. Cependant, il a été montré dans un contexte hors cancer qu'une forte augmentation de l'efflux du cholestérol révèle également les fonctions

pro-inflammatoires des macrophages, induites par un stress du réticulum endoplasmique (Fotakis et al., 2019). Ainsi, les HDLs mimétiques ou ceux provenant des animaux transgéniques exprimant l'ApoA-I sont alors de très bons accepteurs de l'efflux de cholestérol et pourraient révéler le phénotype pro-inflammatoire des macrophages. Une seconde explication, qui n'exclue pour autant pas la première, résiderait dans le rôle du cholestérol des cellules cancéreuses. En effet, le cholestérol est un élément de base important pour la prolifération et les voies de signalisation des cellules cancéreuses, et son efflux diminuerait la capacité des cellules cancéreuses à proliférer.



**Figure 2.16 : Le double rôle de l'efflux cellulaire du cholestérol.**

L'efflux cellulaire du cholestérol réduit la croissance tumorale, cependant, interrompre l'efflux cellulaire des macrophages limite également la progression tumorale. Ainsi, l'effet anti-tumoral de la surexpression de l'ApoA-I ne repose pas par une action au niveau des macrophages, et d'autres types cellulaires et mécanismes sont alors mis en jeu.

#### 2.4.2.3. Les mécanismes identifiés dans les cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses sont hautement prolifératives et dépendent du cholestérol pour satisfaire la biosynthèse des nouvelles membranaires. En conséquence, le cholestérol est généralement bénéfique pour la croissance et la progression des cancers. De plus, le cholestérol présent à la membrane plasmique assure différentes fonctions : les radeaux lipidiques des membranes cellulaires sont riches en diverses molécules de signalisation et sont associés à un certain nombre de

fonctions biologiques, notamment la survie, la prolifération et la migration des cellules (Vona et al., 2021). En effet, la compartimentation stricte du reste de la membrane permet de réguler la balance entre les voies oncogéniques et apoptotiques. Les radeaux lipidiques se caractérisent par une teneur élevée en cholestérol et les niveaux de cholestérol membranaire sont donc un facteur important pour la stabilité et l'organisation des radeaux. La perturbation des radeaux lipidiques par l'appauvrissement en cholestérol de la membrane plasmique engendrée par l'efflux cellulaire du cholestérol par exemple est susceptible de déréguler un certain nombre de voie de signalisation intracellulaire.

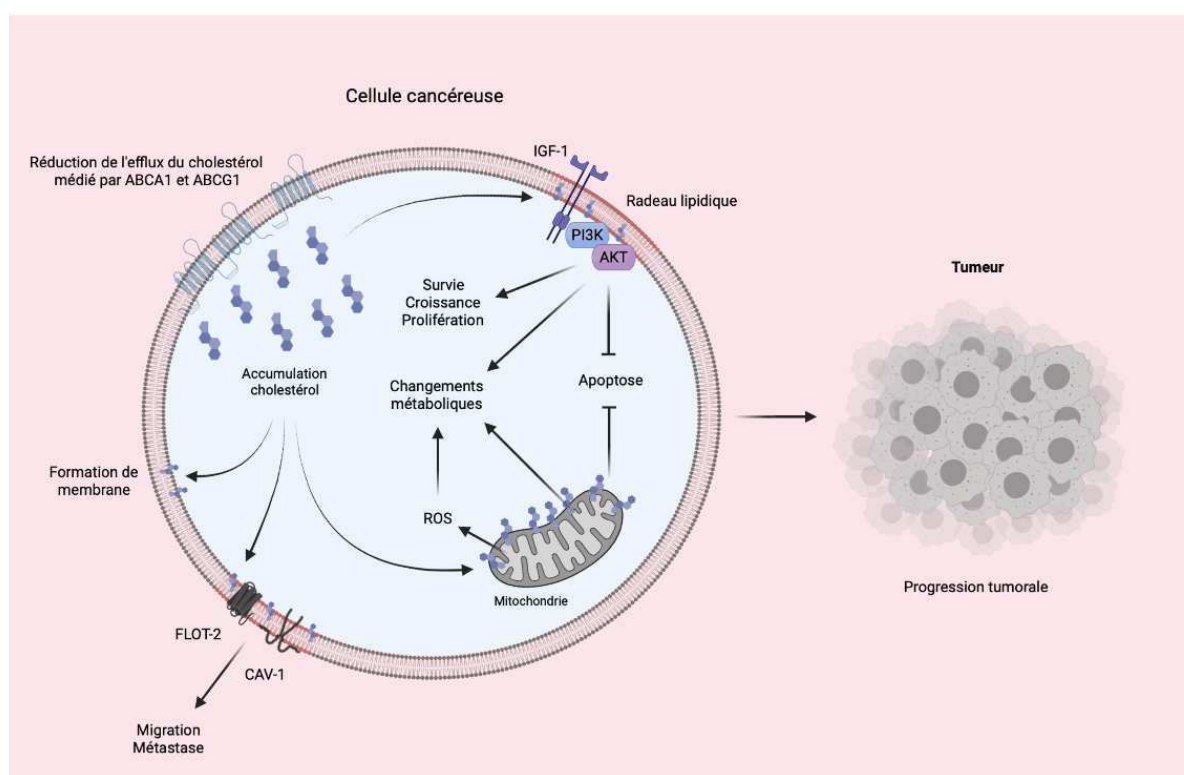
La signalisation des facteurs de croissance est souvent dérégulée dans les cellules cancéreuses. Le facteur de croissance à l'insuline IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), par l'intermédiaire de son récepteur, est l'un des plus puissants activateurs naturels de la kinase PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) qui active à son tour AKT (*protein kinase B*, PKB) (Figure 2.17). La voie de signalisation PI3K/AKT joue un rôle central dans la survie et la croissance des cellules, et contrôle par de nombreux aspect le métabolisme des cellules (Hoxhaj and Manning, 2020). L'AKT est également un régulateur de la mort cellulaire par apoptose, puisque lorsqu'elle est activée, elle phosphoryle et inactive les protéines pro-apoptotiques. Ainsi, l'AKT régule la balance prolifération cellulaire – apoptose et une activation aberrante de la voie PI3K/AKT contribue au développement et à l'invasivité des cellules cancéreuses (Chimento et al., 2019; Gao et al., 2011b). L'activation de cette voie dépend des domaines lipidiques de la membranes plasmiques, de ce fait, la déplétion en cholestérol des cellules cancéreuses diminue l'activation d'AKT, favorisant alors l'apoptose (Li et al., 2006). De plus, il a été montré que l'efflux du cholestérol médié par le transporteur ABCA1 diminue l'expression d'AKT en réduisant le cholestérol des radeaux lipidiques (Landry et al., 2006). Ces résultats ont été également confirmés grâce à l'activation du facteur de transcription LXR : l'activation de LXR par son agoniste synthétique T0901317 augmente l'expression des gènes cible de LXR, dont *Abca1* et *Abcg1*, ce qui augmente par conséquent l'efflux cellulaire du cholestérol. Ainsi, le traitement des cellules de cancer de la prostate LNCaP par l'agoniste T0901317 permet *in vitro* et *in vivo* d'inhiber l'activité d'AKT, ce qui diminue par conséquent sa fonction dans la survie cellulaire d'une part, et permet d'induire l'apoptose d'autre part (Pommier et al., 2010).

Les radeaux lipidiques participent également à l'invasion et la migration des cellules cancéreuses. En effet, une caractéristique essentielle de l'agressivité des cellules cancéreuses est représentée par l'acquisition d'un phénotype invasif. Les cellules cancéreuses sont capables d'adhérer à la matrice extracellulaire, de migrer et d'envahir d'autres tissus, ce qui conduit aux métastases. Les modifications de la membrane plasmique sont impliquées durant le processus d'invasion et de métastase et ainsi, les membranes des cellules cancéreuses forment des structures hautement spécialisées capables de favoriser l'adhésion et la pénétration de la cellule tumorale dans la matrice extracellulaire sous-jacente, le stroma et la membrane basale. Ces structures membranaires sont riches en éléments du cytosquelette, en molécules

d'adhésion et en enzymes de dégradation et nécessitent la présence de radeaux lipidiques, qui sont déterminants pour l'établissement de cette structure invasive et dynamique (Nicolson, 2015). La calvéoline 1 (CAV-1), un composant typique des structures de radeaux lipidiques de la membrane calvéolaire, représente un régulateur essentiel de l'invasion des cellules cancéreuses du sein médiée par ces structures membranaires atypiques (Figure 2.17) (Yamaguchi et al., 2009). La perturbation des radeaux lipidiques par la déplétion du cholestérol membranaire à l'aide de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD) entrave la formation de ces structures et par conséquent, l'invasion tumorale, fournissant ainsi la preuve de l'implication des radeaux lipidiques dans le processus de métastase dans le cancer du sein. De la même façon, la surexpression de CAV-1 dans des cellules de cancer de la vessie, induit une transition épithéliale-mésenchymateuse gouvernée par l'activation de PI3K/AKT (Zhu et al., 2014). D'autres études ont permis de mettre en évidence le rôle des radeaux lipidiques non calvéolaires dans le processus d'invasion et de la formation de métastase, impliquant la protéine flotilline-2 (FLOT-2) (Vona et al., 2021).

Outre son rôle dans les radeaux lipidiques, de récentes études permettent d'établir un rôle du cholestérol mitochondrial dans la croissance tumorale. Étant donné le rôle crucial du cholestérol dans les propriétés physiques de la membrane, et bien que les membranes mitochondriales soient généralement considérées comme pauvres en cholestérol, son accumulation dans les mitochondries perturbe les caractéristiques biophysiques et fonctionnelles membranaires. Ainsi, l'accumulation de cholestérol mitochondrial semblerait nuire à la fonction mitochondriale et à l'activité des transporteurs mitochondriaux, favorisant alors à la production de ROS (Figure 2.17) (Ribas et al., 2016). Les ROS contribuent d'une part à la stabilisation et l'activation de la voie HIF-1 $\alpha$ , participant alors à la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses en altérant le métabolisme oxydatif mitochondrial d'une part et en augmentant la glycolyse aérobie d'autres part (Papandreou et al., 2006). De ce fait, il a été montré que l'inhibition la synthèse du cholestérol par la délétion de SREBP2 dans des cellules de cancer de côlon altère le métabolisme mitochondrial ce qui réduit la prolifération des cellules *in vitro*, en plus de diminuer la formation de tumeur *in vivo* (Wen et al., 2018). Mais d'autre part, les ROS engendrés par une accumulation de cholestérol dans les membranes mitochondriales sont capables d'activer la voie de dégradation des mitochondries par la machinerie de l'autophagie, appelé mitophagie, qui sera détaillé dans le chapitre 3 de ce manuscrit. Pour autant, le fort taux de cholestérol intracellulaire (en plus de son accumulation dans les membranes mitochondriales) aboutit à une dégradation mitochondriale incomplète en raison d'une altération de la voie lysosomale (Roca-Agujetas et al., 2021). Bien que le lien direct entre la mitophagie, les taux de cholestérols intracellulaires et le développement de cancer n'a pas été mis en évidence, des nombreuses perturbations de la dégradation mitochondriale ont été associées au développement de cancer. De plus, dans certaines cellules cancéreuses, l'accumulation de cholestérol dans les membranes mitochondriales est susceptible d'inhiber l'apoptose en diminuant la libération de protéines apoptotiques. En effet, les mitochondries isolées des cellules de carcinome

hépatocellulaire humain sont fortement enrichies en cholestérol (Montero et al., 2008) et cette augmentation a été associée à une résistance à la perméabilisation de la membrane mitochondriale et à la libération de cytochrome, diminuant l'induction de l'apoptose en réponse à différents stimuli (Galluzzi et al., 2018; Montero et al., 2008). La diminution des taux de cholestérol par extraction du cholestérol augmente alors la sensibilité des cellules à la mort induite par des agents chimiothérapeutiques. Des résultats similaires ont également été démontrés dans des cellules cancéreuses du colon où la diminution de l'expression du transporteur ABCA1 conduit à une augmentation du cholestérol mitochondrial, participant à la survie des cellules en inhibant l'apoptose (Smith and Land, 2012). Ici encore, la réduction du cholestérol mitochondrial engendré par la surexpression d'ABCA1 augmente la sensibilité des cellules à l'apoptose.



**Figure 2.17 : Le rôle du cholestérol dans la cellule cancéreuse.**

Le cholestérol dans la cellule cancéreuse participe à la croissance tumorale. Lorsque l'efflux du cholestérol est diminué dans les cellules cancéreuses, le cholestérol s'accumule. Il va participer à la formation de nouvelles membranes pour assurer la croissance des cellules cancéreuses, il forme les radeaux lipidiques dans lesquels sont régulés les voies de signalisation associées à l'AKT mais également les structures permettant l'invasion des cellules cancéreuses et leur migration. Le cholestérol s'accumule également dans les membranes mitochondriales, dérégulant leur fonctionnement.

Ainsi, l'accumulation du cholestérol au sein des cellules cancéreuses participe à la croissance tumorale par les divers mécanismes abordés, tandis que l'accumulation dans les cellules myéloïdes et plus particulièrement les macrophages diminue la progression tumorale. Il a été suggéré que les cellules cancéreuses imposent l'efflux cellulaire des macrophages en sécrétant des médiateurs dans l'environnement

tumoral, ce qui permet d'une part de diminuer les voies pro-inflammatoires des macrophages par la perte du cholestérol, mais également de rendre ce cholestérol disponible dans l'environnement pour les cellules cancéreuses. Par conséquent, l'augmentation de l'efflux du cholestérol par l'élévation des taux des HDLs plasmatiques diminue la progression tumorale en limitant l'accumulation au sein des cellules cancéreuses. Les altérations métaboliques du cholestérol dans les tumeurs semblent représenter ainsi un nouvel axe qui pourrait être ciblé pour limiter la croissance tumorale des patients atteints de cancers.

### 3. La mitophagie dans le développement tumoral

La mitochondrie est une organelle intracellulaire des cellules eucaryotes. Elles jouent un rôle fondamental dans les cellules en régulant le métabolisme énergétique, la production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS), la mort cellulaire et participent également à la réponse immunitaire. Étant donné leurs rôles essentiels, les voies de régulation des fonctions mitochondriales sont cruciales pour permettre l'adaptation cellulaire en réponse à divers stress. De ce fait, le contrôle de l'activité mitochondriale repose, en partie, sur différents mécanismes de contrôle qualité de la mitochondrie, dont l'élimination sélective des mitochondries par la machinerie de l'autophagie, appelée mitophagie. L'autophagie est un processus catabolique permettant de favoriser la survie cellulaire lors d'une crise énergétique et d'une privation en nutriments en recyclant les biomolécules pour alimenter la cellule, mais l'autophagie permet également d'éliminer sélectivement les molécules et organelles cytoplasmiques. Ainsi, l'autophagie maintient l'intégrité mitochondrial et élimine sélectivement les mitochondries endommagées, dysfonctionnelles ou superflues. Cependant, les dysfonctionnements de la mitophagie altèrent l'homéostasie mitochondriale et cellulaire ce qui participe grandement à l'initiation et la progression tumorale (Javadov et al., 2020).

#### 3.1. La mitochondrie

##### 3.1.1. Découvertes et structure de la mitochondrie

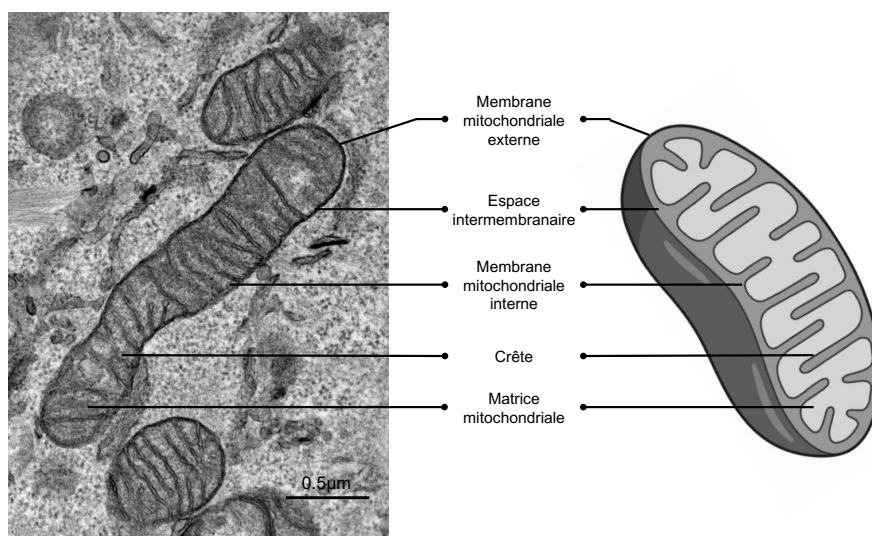
La découverte des mitochondries s'est déroulée en plusieurs étapes, mais les premières observations datent de 1850, Rudolph Albert von Kölliker décrivant des structures semblables à des granules dans les cellules musculaires (Kölliker, 1856). Quelques années plus tard, en 1890, ces structures ont été mises en évidence par Richard Altmann dans différents types cellulaires grâce à une technique de coloration. Altmann nomme ces structures « bioplastes », les qualifie d'organismes élémentaires vivants dans les cellules et leur attribue le rôle d'unité de base de l'activité cellulaire (Altmann, 1890). En 1898, Carl Benda rebaptise les bioplastes en mitochondries provenant du grec pour *mitos* signifiant « fil » et *chondros* « granule » après leurs découvertes dans la spermatogénèse (Benda, 1898). Les premières propriétés et fonctions des mitochondries ont été éclaircies des années plus tard (Ernster and Schatz, 1981). De plus, l'origine des mitochondries a été questionnée lorsque les études de leurs caractéristiques structurales et biochimiques ont révélé des similitudes à celles des bactéries. Ainsi, Lynn Margulis proposa la théorie endosymbiotique en 1967 (Sagan, 1967) : des  $\alpha$ -protéobactéries en symbiose avec les cellules eucaryotes primitives, il y a environ 1,5 milliards d'années, formeraient aujourd'hui les mitochondries. L'analyse de l'origine des gènes mitochondriaux quelques années plus tard, grâce aux progrès en génétique, ont permis de confirmer leur origine bactérienne, argumentant ainsi en faveur de la théorie endosymbiotique

(Roger et al., 2017). De nombreux changements évolutifs se sont produits depuis, permettant la transition d'une bactérie endosymbiotique vers une organelle dépendant de la cellule, comme le transfert des gènes mitochondriaux vers le génome nucléaire.

La mitochondrie possède son propre génome caractérisé par un ADN double-brin circulaire, linéaire ou de forme ramifiée. Les gènes codés par l'ADN mitochondrial sont répliqués, transcrits et traduits indépendamment du génome nucléaire, avec un code génétique différent du code génétique universel (Gray et al., 1998). Parmi ces gènes, 13 vont coder des sous-unités des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire, 22 gènes génèrent des ARN de transfert et 2 des ARN ribosomiques. Malgré ce petit génome, pas moins de 1000 protéines sont localisées au niveau de la mitochondrie provenant alors du génome nucléaire (Zardoya, 2020).

Les mitochondries sont des organelles hautement dynamiques s'organisant en un complexe réseau interconnecté appelé réseau mitochondrial capable de se fragmenter, ce qui n'altère par leur fonction pour autant (Alexandre et al., 1978). Les mitochondries sont alors de morphologie diverse et leur taille varie entre 0,5µm et 10µm. Les mitochondries sont caractérisées par une double membrane, une externe et une interne définissant alors un espace intermembranaire et une matrice mitochondriale (Figure 3.1). La membrane externe mitochondriale est une bicouche lipidique de composition similaire à la membrane plasmique (Walther and Rapaport, 2009). Certaines protéines constituant la membrane externe participent à l'homéostasie mitochondriale et cellulaire telles que les événements de fusion/fission et l'apoptose pour ne citer qu'eux (Giacomello et al., 2020; Youle and Karbowski, 2005). D'autres protéines, comme les porines et plus particulièrement VDAC (*voltage dependent anion channel*) assurent le transfert actif des ions et des petites molécules dans la mitochondrie (Colombini, 2012). Les protéines cytosoliques de poids moléculaire supérieur à 10 kilo-dalton sont introduites par des complexes d'importations, le principal étant TOM (*translocase of the outer membrane*) et nécessitent alors une séquence d'adressage mitochondrial (*mitochondrial targeting sequence*, MTS) qui est positionnée généralement en N-terminal de la protéine (Schmidt et al., 2010). L'espace intermembranaire situé entre les deux membranes, a une composition assez similaire au cytosol du fait de la libre diffusion des ions et des petites molécules de la membrane externe. La membrane interne est quant à elle, imperméable aux ions et molécules car dépourvue de porine. Elle est constituée de 75% de protéines et de seulement 25% de phospholipides dont une forte concentration en cardiolipine, considérée comme le phospholipide caractéristique des mitochondries (Horvath and Daum, 2013). Elle possède de nombreux transporteurs permettant le passage contrôlé des ions et métabolites, et les protéines adressées à la mitochondrie ayant déjà empruntées la translocase TOM utilisent ensuite TIM (*translocase of the inner membrane*) afin de traverser la membrane interne (Schmidt et al., 2010). Cette membrane se replie sur elle-même et forment des invaginations, appelées crêtes mitochondriales, s'élançant dans la matrice mitochondriale (Cogliati et al., 2016). Les complexes membranaires de la chaîne respiratoire sont ancrés dans les crêtes,

participant à la phosphorylation oxydative et donc à la synthèse d'ATP. Du fait de leur emplacement et de leurs rôles, les crêtes sont en étroite collaboration avec la matrice mitochondriale où se déroule le cycle de Krebs.



**Figure 3.1 : La structure et les compartiments de la mitochondrie.**

Image de microscopie électronique de nos cellules en culture et schéma de la mitochondrie. La mitochondrie est une organelle possédant une double membrane, une externe et une interne, définissant l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Les crêtes apparaissent sombres dû à la densité des complexes protéiques présents, tandis que la matrice et l'espace intermembranaire sont clairs en raison de leur faible teneur en protéine. Échelle : 0,5µm.

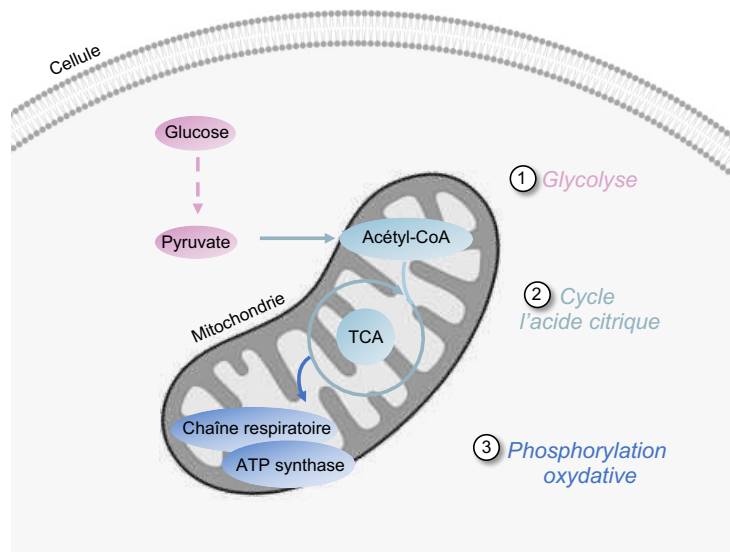
### 3.1.2. Les fonctions mitochondriales

Chaque cellule contient entre 500 à 2000 mitochondries, un nombre variable en fonction du type cellulaire ainsi que des besoins énergétiques. En effet, la mitochondrie est baptisée la centrale électrique de la cellule car elle est le siège de la respiration cellulaire et la principale source de synthèse d'ATP, comme présentée dans le chapitre 1.3.1.1 Le métabolisme du glucose de ce manuscrit. Outre ce rôle, les mitochondries ont d'autres fonctions cellulaires essentielles. En effet, les mitochondries contrôlent la transduction des signaux et l'exécution de la mort cellulaire, qui peut dépendre ou non de l'activation des caspases et sont des modulateurs importants de la signalisation des dangers cellulaires activant les réponses immunitaires.

#### 3.1.2.1. Fonction énergétique de la mitochondrie

L'oxydation complète du glucose conduit à la formation d'ATP et se déroule en 3 étapes dans 2 compartiments cellulaires : la glycolyse dans le cytoplasme, et le cycle de Krebs couplé à la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie (Figure 3.2). La glycolyse est une série de réactions enzymatiques cytosoliques permettant de métaboliser le glucose en pyruvate, ce qui génère 2 molécules d'ATP et du NADH. En

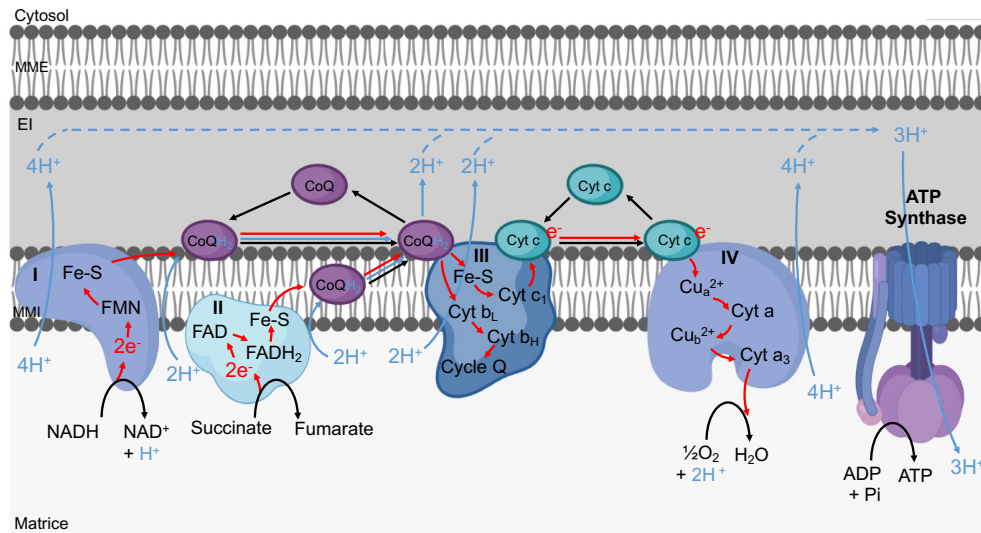
présence d'oxygène ( $O_2$ ), le pyruvate est transporté dans la mitochondrie, puis converti en acétyl-CoA, générant du dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) et du NADH. L'acétyl-CoA est par la suite oxydé en  $CO_2$  par différentes réactions enzymatiques du cycle de Krebs, permettant la génération des transporteurs d'électrons à haute énergie, le NADH et le  $FADH_2$ . La formation de ces transporteurs est indispensable à la phosphorylation oxydative se déroulant au niveau des crêtes de la membrane mitochondriale interne (Hay, 2016).



**Figure 3.2 : Le rôle central de la mitochondrie dans la respiration cellulaire.**

(1) La glycolyse, (2) le cycle de l'acide citrique (TCA) également appelé cycle de Krebs et (3) la phosphorylation oxydative sont les trois étapes clés de la production d'énergie. 2 de ces 3 étapes se déroulent dans la mitochondrie.

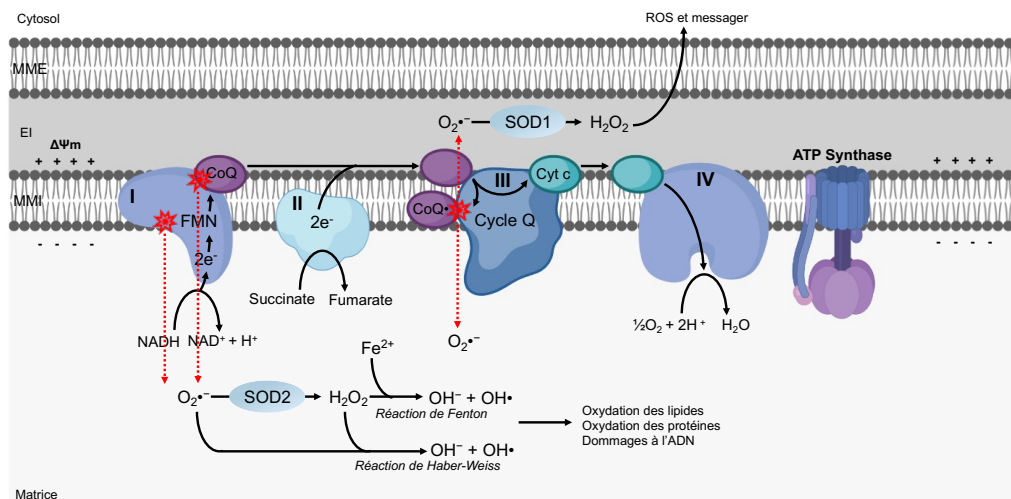
La plus grande partie de l'énergie libérée pendant le cycle de Krebs au cours de l'oxydation de l'acétyl-CoA est convertie dans les coenzymes réduites NADH et  $FADH_2$ . L'énergie stockée provisoirement dans ces transporteurs à haute énergie est convertie lorsque les électrons circulent dans le sens de leur gradient de potentiel électrique à travers les 4 complexes de la chaîne respiratoire, appelée également chaîne de transport d'électrons (*electron transport chain*, ETC) (Figure 3.3). De ce fait, le déplacement d'électrons à haute énergie vers l'accepteur final qui est l'oxygène permet aux complexes de l'ETC de pomper les protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, générant ainsi un gradient électrochimique de protons, appelée chimiosmose. Cette force proton-motrice stocke l'énergie qui est ensuite convertie pour la synthèse de l'ATP par l'ATP synthase (Nolfi-Donagan et al., 2020).



**Figure 3.3 : La phosphorylation oxydative.**

La chaîne respiratoire, composée de 4 complexes (I-II-III-IV), de la coenzyme Q (CoQ) ainsi que du cytochrome c (Cyt c) permet la création de la force proton-motrice servant ensuite à l'ATP synthase qui génère de l'ATP. Les flèches rouges représentent le transport des électrons ( $e^-$ ) tandis que les flèches bleues le parcours des protons ( $H^+$ ). MME et MMI : membrane mitochondriale externe et interne. EI : espace intermembranaire.

De plus, le pompage de protons de la matrice vers l'espace membranaire génère un potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), positif dans l'espace membranaire et négatif dans la matrice mitochondriale. La disparité du  $\Delta\Psi_m$  des crêtes mitochondriales au sein d'une même mitochondrie mise en évidence récemment, suggère que les crêtes se comportent en unité bioénergétique indépendante, permettant alors d'épargner les autres crêtes mitochondriales en cas de dysfonctionnement et de préserver la mitochondrie (Wolf et al., 2019). En effet, certains électrons de la chaîne respiratoire ne suivent pas le transfert habituel des électrons mais s'échappent de la chaîne, notamment au niveau des complexes I et III. Les électrons sont alors acceptés par l' $O_2$  et forment des espèces réactives de l'oxygène, telles que l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle  $\cdot OH$  (Murphy, 2009) (Figure 3.4). L' $\cdot OH$  est susceptible d'endommager les lipides, les protéines ainsi que l'ADN en s'additionnant sur les doubles liaisons des bases nucléiques par exemple. Alors que la production de ROS est bénéfique dans certaines fonctions physiologiques, celle-ci peut contribuer au vieillissement, et à de nombreuses pathologies (Zhao et al., 2019).



**Figure 3.4 : La formation des espèces réactives de l'oxygène.**

Dans la chaîne respiratoire, le complexe IV réduit l' $O_2$  qui agit en accepteur final d'électron, formant de l' $H_2O$  moléculaire. Cependant, certains électrons sont transférés à l' $O_2$  avant le complexe IV, ce qui génère des ROS (*reactive oxygen species*). Les  $O_2^{\bullet-}$  sont transférés dans la matrice et l'espace intermembranaire. Les systèmes de défense de la cellule permettent de contrôler la production de ces radicaux et ainsi, les  $O_2^{\bullet-}$  sont dismutés en  $H_2O_2$  par la superoxyde dismutase 2 (SOD2) dans la matrice ou par la SOD1 dans l'espace intermembranaire. L' $H_2O_2$  présent dans l'espace intermembranaire peut alors diffuser à travers les membranes, sortir de la mitochondrie et rejoindre le cytosol de la cellule. L' $H_2O_2$  n'est pas un radical libre mais il peut être converti  $\bullet OH$  par la réaction de Fenton, l'espèce radicalaire la plus délétère car la plus réactive. La réaction de Haber-Weiss catalyse également la production de  $\bullet OH$  à partir de l' $H_2O_2$  et de l' $O_2^{\bullet-}$ . MME et MMI : membrane mitochondriale externe et interne. EI : espace intermembranaire. Schéma adapté de (Nolfi-Donagan et al., 2020).

### 3.1.2.2. La mort cellulaire

Les mitochondries régulent activement la mort cellulaire programmée dans un large éventail d'organismes, allant des eucaryotes inférieurs comme la levure aux humains. La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) représente un événement de point de non-retour de multiples cascades de transduction du signal conduisant à la mort cellulaire, telles que l'apoptose définie par l'activation des caspases ainsi qu'à la mort indépendante des caspases (*caspase-independent cell death*, CICD). Ainsi, les mitochondries occupent une position centrale dans la régulation et l'exécution de la mort cellulaire.

À la différence de la voie extrinsèque ou de récepteur de mort qui résulte de signaux extérieurs à la cellule, l'apoptose déclenchée par la cellule elle-même en cas de détection de dommage est un mécanisme qui engage la mitochondrie, connu sous le nom de voie intrinsèque. Cette voie est activée par différents stress comme des lésions de l'ADN, la perte d'adhésion, une déprivation en facteurs de croissance ou une accumulation de protéines mal repliées pour ne citer qu'eux (Galluzzi et al., 2018). En effet, ces stress activent les membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2, en particulier BAX (*BCL2 associated X*) et BAK (*BCL2 antagonist/killer 1*), qui forment

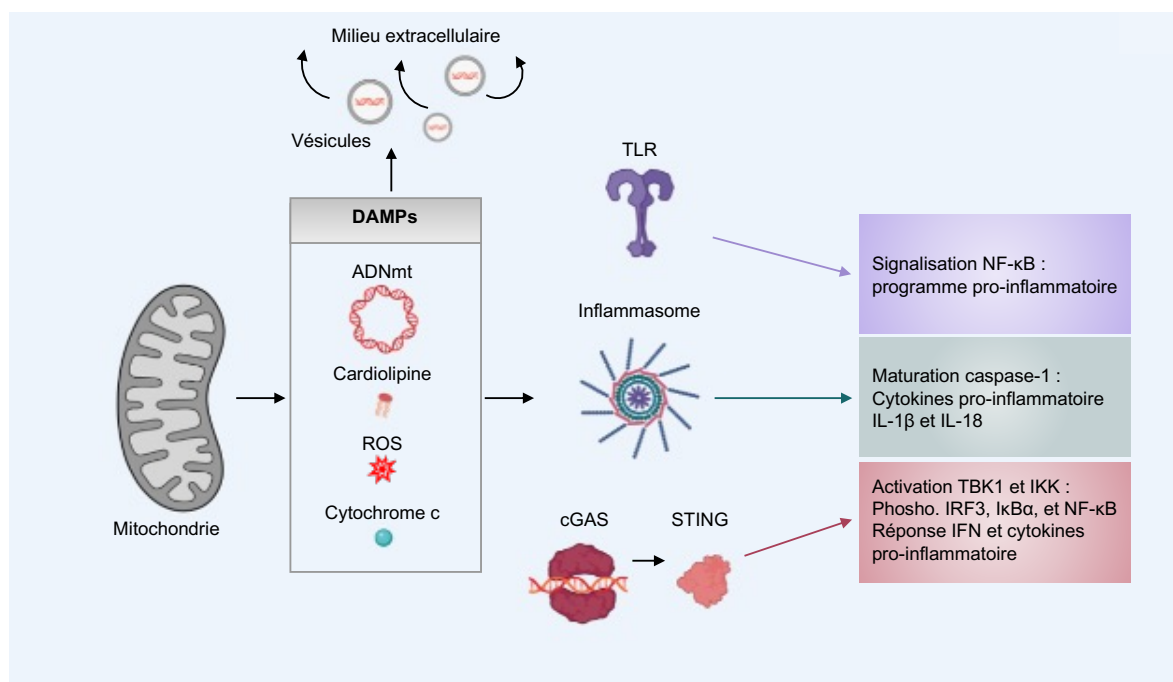
alors des pores dans la membrane externe des mitochondries ayant pour conséquence sa perméabilisation (MOMP) (Czabotar et al., 2014). A l'inverse, les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 préservent l'intégrité de la membrane mitochondriale et bloquent ainsi l'apoptose. La MOMP conduit à la libération de protéines solubles de l'espace intermembranaire mitochondrial dans le cytoplasme, tel que cytochrome c (Tait and Green, 2010). L'apoptose est définie par l'activation des caspases, ainsi, une fois dans le cytoplasme, le cytochrome c s'associe au facteur d'activation de la peptidase apoptotique 1 (*apoptotic peptidase activating factor*, APAF1) et à la pro-caspase 9 (CASP9) pour former le complexe supramoléculaire appelé apoptosome, activant alors la CASP9. La CASP9 activée induit alors l'activation de CASP3 et CASP7, communément appelées caspases exécutrices. L'activité catalytique des caspases exécutrices précipite la mort cellulaire et est responsable de la fragmentation de l'ADN, l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) et la formation de corps apoptotiques (Galluzzi et al., 2018). A la suite d'un stimulus apoptotique, l'inhibition de l'activité des caspases ou d'APAF1 bloque l'apparition phénotypique de l'apoptose, mais ne prévient pas pour autant la mort cellulaire (Pradelli et al., 2010). C'est ainsi que la mort cellulaire indépendante des caspases a été mise en évidence. Ce type de mort cellulaire programmée requiert également la MOMP, mais les caractéristiques typiques de l'apoptose telles que l'externalisation de la PS et la condensation de la chromatine à grande échelle ne sont pas observées lors de la mort par CICD. Peu de choses sont connues quant à la régulation de la MOMP, cependant, il a été montré que la GAPDH (Colell et al., 2007), ou encore très récemment l'E3 ubiquitine ligase UBR2 (*ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 2*) via l'activation de la voie MAPK/ERK (Villa et al., 2020), protègent de la mort par CICD.

De ce fait, les mitochondries semblent réguler un continuum de fonctions cellulaires, allant du métabolisme physiologique aux réponses au stress conduisant à la mort. La libération des constituant mitochondriaux en conséquence de la MOMP peut, en plus, participer à l'activation des réponses immunitaires (Bock and Tait, 2020). Les mitochondries sont alors des modulateurs importants de la signalisation des dangers cellulaires et des réponses immunitaires visant à restaurer l'homéostasie cellulaire ou tissulaire.

### 3.1.2.3. Le système immunitaire

Les mitochondries sont capables d'activer des réponses immunitaires, fait peu étonnant compte tenu de leur ressemblance avec des bactéries ancestrales selon la théorie de l'origine endosymbiotique (Figure 3.5). Ainsi, les DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) mitochondriaux incluant l'ADNmt (ADN mitochondrial), les cardiolipines, les ROS ou le cytochrome c libérés lors de dommages mitochondriaux et cellulaires activent les réponses immunitaires en se liant aux récepteurs de reconnaissance de motifs des cellules immunitaires innées (Weinberg

et al., 2015). Par exemple, l'ADNmt extracellulaire active la voie des TLRs entraînant le recrutement des neutrophiles (Pittman and Kubes, 2013). D'autres PRRs dépendent de la signalisation des ADNmt et ROS mitochondriaux, notamment les NLRs. Lorsqu'ils sont activés, les NLRs forment des complexes protéiques à plusieurs sous-unités appelés inflammasomes qui activent la caspase-1, ce qui entraîne le clivage protéolytique et la maturation de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  (Franchi et al., 2009; Shimada et al., 2012). De la même façon, l'ADNmt active l'inflammasome AIM2, permettant la maturation de l'IL-18 et permet ainsi de déclencher des réponses pro-inflammatoires (Zhou et al., 2011). De plus, l'ADNmt cytosolique permet l'activation de la voie cGAS-STING (*cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes*) : la liaison de cGAS à l'ADNmt active de manière allostérique son activité catalytique et conduit à la production d'une molécule qui sert de second messager, activant alors STING au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Cette liaison permet l'activation des kinases TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) et IKK (*inhibitor of nuclear factor kappa kinase*), permettant la phosphorylation d'IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) et l'activation de NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*), induisant ainsi l'expression des gènes codant les interférons de type I (IFN-I) et des cytokines inflammatoires (Chen et al., 2016). Ainsi, les DAMPs mitochondriaux entraînent une hyperactivation de l'immunité innée en l'absence d'infection par des pathogènes, appelée inflammation stérile.



**Figure 3.5 : L'activation des voies pro-inflammatoires par les DAMPs mitochondriaux.**

Les DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) mitochondriaux déclenchent diverses voies de signalisation cytosolique pro-inflammatoire. ROS : espèces réactive de l'oxygène. Phospho. : phosphorylation. Adaptée de (Riley and Tait, 2020).

### 3.1.3. Le contrôle qualité des mitochondries

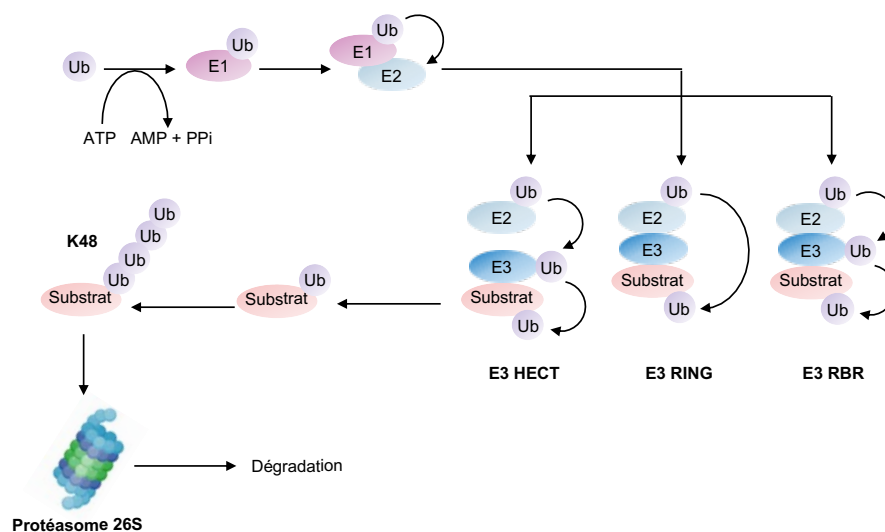
Compte tenu du rôle central de la mitochondrie dans l'homéostasie cellulaire, son dysfonctionnement est à l'origine de nombreuses perturbations pouvant conduire à la mort cellulaire. Ainsi, la cellule a développé des mécanismes de contrôle qualité afin de limiter les dommages mitochondriaux et d'assurer l'intégrité cellulaire. Cela se traduit par la mise en place de systèmes de surveillances spécifiques de la qualité des protéines mitochondriales, ainsi que de la dynamique des mitochondries permettant des phénomènes de fusion et fission conduisant à la dégradation des mitochondries endommagées. Le type de système de contrôle qualité engagé dépend de la nature et de l'intensité du dysfonctionnement mitochondrial.

#### 3.1.3.1. Le contrôle des protéines

##### 3.1.3.1.1. Le système ubiquitine-protéasome (UPS)

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est responsable de la dégradation de protéines à courte durée de vie, mal repliées ou endommagées et qui doivent être ubiquitinées (Figure 3.6). L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine conservée au cours de l'évolution qui agit comme un modificateur post-traductionnel en se liant de manière covalente aux protéines substrats, ce qui les cible notamment pour la dégradation par le protéasome (Callis, 2014), en plus de participer à de nombreuses fonctions cellulaires (Akutsu et al., 2016). L'ubiquitine est conjuguée au résidu lysine d'un substrat par liaison isopeptidique en trois étapes, nécessitant alors trois enzymes : une E1 enzyme activatrice de l'ubiquitine, une E2 enzyme de conjugaison et une E3 ubiquitine ligase. Les E1 activent l'ubiquitine par la formation d'une liaison thioester avec l'E2, un processus dépendant de l'ATP. L'E3 porte la spécificité de la réaction car c'est elle qui reconnaît le substrat à ubiquitiner et de ce fait, il existe plus de 600 enzymes de cette classe. L'ubiquitine contient 7 résidus lysines (K6, 11, 27, 29, 33, 48, 63) et un résidu méthionine N-terminal (M1) qui permettent la formation de chaînes d'ubiquitines polymères, conduisant à une issue différente pour la protéine ciblée (Akutsu et al., 2016; Swatek and Komander, 2016). Ainsi, la formation d'une chaîne de polyubiquitine engageant la lysine 48 (K48) conduit à la dégradation des substrats cibles par le protéasome 26S, un multi-complexe enzymatique qui rompt les liaisons peptidiques dans son noyau protéolytique et dégrade alors la protéine et recycle l'ubiquitine (Bard et al., 2018). L'UPS est largement utilisé par la cellule pour dégrader les protéines endommagées et cette voie de surveillance permet alors la dégradation des protéines de la membrane mitochondriale externe ainsi que des protéines originellement dans la matrice ou dans la membrane mitochondriale interne (Alsayyah et al., 2020). Par exemple, les protéines de la membrane externe mal repliées sont ubiquitinées par l'E3 ubiquitine ligase MARCH5 ce qui initie leur dégradation par le protéasome. De plus, le système de l'UPS est nécessaire à l'élimination sélective des mitochondries endommagées, grâce à l'ubiquitination de protéines substrats

permettant le recrutement de la machinerie de l'autophagie, qui sera traité dans le paragraphe 3.2.3.2 Les voies médiées par l'ubiquitine.



**Figure 3.6 : La cascade du système de l'ubiquitine-protéasome (UPS).**

Une enzyme E1 activatrice active l'ubiquitine (Ub) de manière dépendante de l'ATP et favorise une liaison thioester entre l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et la cystéine d'une enzyme de conjugaison E2. Le transfert final de l'Ub sur son substrat est médié par les enzymes E3 ubiquitines ligases. Les E3 peuvent jouer le rôle d'intermédiaire et former une liaison thioester avec l'Ub avant de la transférer sur son substrat comme pour les E3 HECT (*homologous to the E6AP carboxil terminus*), effectuer un transfert directement sur le substrat en passant par une étape d'association entre l'E2 et l'E3 telles que fonctionnent les E3 RING (*really interesting new gene*) ou fonctionner comme une hybride des deux, de type RING/HECT (RBR ligases E3). Les E3 permettent la formation d'une liaison isopeptidique entre l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et une lysine cible du substrat. L'ubiquitine peut elle-même être la cible de la cascade d'ubiquitination. Il en résulte la formation de chaînes avec des liaisons d'ubiquitine diverses qui peuvent déclencher des fonctions très distinctes, comme la chaîne polyubiquitine K48 qui permet la dégradation par le protéasome 26S. Adaptée de (Alsayyah et al., 2020).

### 3.1.3.1.2. Le système d'importation des protéines et les protéases mitochondriales

Le génome mitochondrial ne code que pour 13 protéines, or le protéome mitochondrial est estimé à 1200 protéines. De nombreuses protéines mitochondriales sont donc codées par le génome nucléaire. Ces protéines possèdent des séquences d'adressage à la mitochondrie afin d'être reconnues, une fois synthétisées dans le cytoplasme, et importées dans le compartiment mitochondrial adéquat. Le contrôle qualité de la mitochondrie dépend alors en partie du trafic et de l'importation appropriée des protéines cytosoliques. Différentes voies d'import sont décrites, mais la principale est appelée la voie de préséquence (Wiedemann and Pfanner, 2015). Synthétisées sous forme de précurseurs, les protéines possèdent une courte séquence en N-terminal, composée d'acides aminés hydrophobes chargés positivement permettant d'être adressées, reconnues et importées dans la mitochondrie par la translocase TOM présent dans la membrane mitochondriale

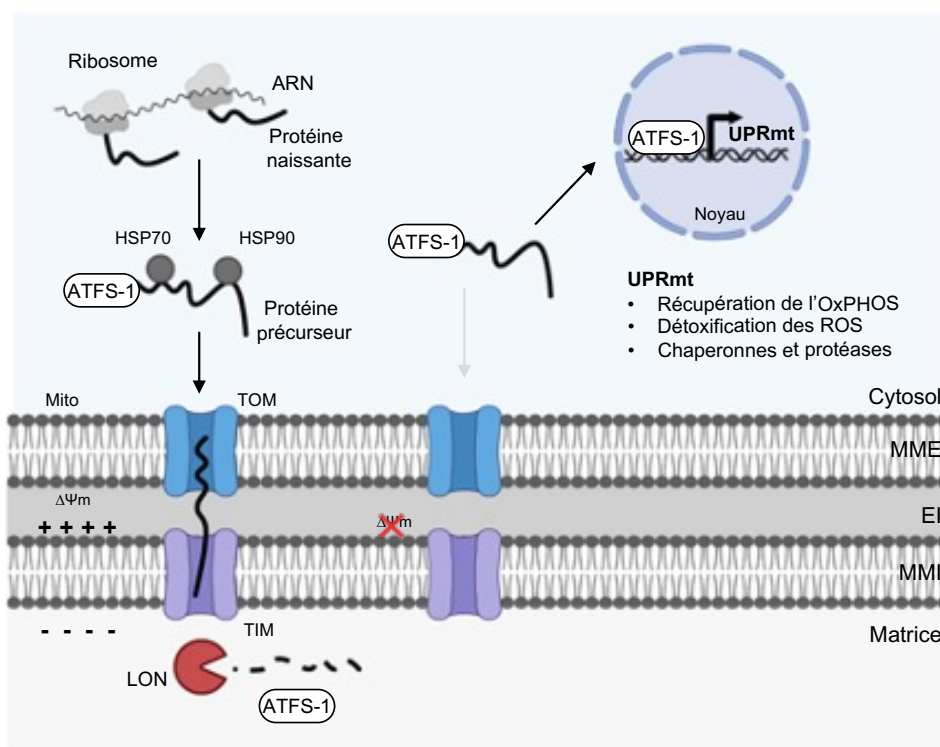
externe. Pour que la translocation soit possible, les protéines précurseurs interagissent avec des chaperonnes de type HSP70 et HSP90 dépendante de l'ATP appartenant à la famille des protéines de choc thermique (Young et al., 2003) : ces chaperonnes préviennent l'agrégation des protéines en protégeant leur région hydrophobe et facilitent le transport des protéines dépliées jusqu'à TOM. Cependant, un repliement prématuré des protéines pendant leur import par TOM conduit à leur accumulation à la membrane mitochondriale externe. Le point de contrôle MAD (*mitochondrial-associated degradation*) engage la reconnaissance de ces protéines par un groupe de protéases appelées AAA+ ATPase VCP/p97 qui permettent l'extraction des protéines de la membrane et ainsi facilite leur dégradation ultérieure par l'UPS. La MAD possède également un important rôle dans la clairance des protéines mitochondriales oxydées (Liao et al., 2020). De plus, l'accumulation de protéines destinées à la mitochondrie bloquées dans les translocases active différentes réponses, dont la mitoCPR (*mitochondrial compromised protein response*) (Yoke Wui Ng et al., 2021). Cette réponse permet de décharger les protéines de la machinerie d'importation afin de libérer les voies mais également de conduire ces protéines à la dégradation, et possiblement d'aider au réarrangement des protéines qui se sont repliées ou agrégées pendant l'attente de l'import mitochondrial, afin de leur donner une seconde chance d'entrée (Weidberg and Amon, 2018). L'UPRam (*unfolded protein response activated by mistargeting of proteins*) est une voie décrite chez la levure qui atténue les effets protéotoxiques de l'accumulation des protéines mitochondriales mal localisées et non importées en activant le protéasome et en inhibant la synthèse des protéines (Wrobel et al., 2015). L'élimination des précurseurs de protéines mitochondriales est essentielle puisque leur accumulation peut conduire à la mort cellulaire chez la levure, un processus nommé stress d'accumulation des précurseurs mitochondriaux (*mitochondrial compromised protein response*, mPOS) (Wang and Chen, 2015).

Après leur transport dans la mitochondrie, les protéines restent sous la surveillance de protéases permettant le contrôle de la qualité des protéines, mais qui exercent également des fonctions régulatrices protéolytiques. Il a été montré l'existence de 18 protéases spécifiques de la mitochondrie qui résident dans les différents sous-compartiments. Dans la matrice mitochondriale se trouve par exemple MMP (*mitochondrial processing peptidase*), ainsi que LON et cette dernière régule l'expression des gènes mitochondriaux, la maintenance de l'ADNmt, et la phosphorylation oxydative, mais également la dégradation d'autres protéines importantes (Yoke Wui Ng et al., 2021).

#### 3.1.3.1.3. L'UPRmt

La machinerie d'importation mitochondriale est intimement liée à l'état énergétique des organites car elle nécessite le potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) et l'ATP pour fonctionner efficacement. De ce fait, des perturbations de la

phosphorylation oxydative, la production de ROS ou la perte du  $\Delta\Psi_m$  entravent la machinerie d'importation, qui agit alors comme un détecteur de dysfonctionnement mitochondrial et déclenchent des événements de contrôle de qualité appelés réponse transcriptionnelle aux protéines mitochondriales mal repliées (*mitochondrial unfolded protein response*, UPRmt) (Shpilka and Haynes, 2018). Le facteur de transcription ATFS-1 (*activating transcription factor associated with stress-1*) chez *Caenorhabditis elegans* et son homologue ATF5 chez l'Homme joue un rôle important dans cette réponse : dans une mitochondrie saine, ATFS-1 est importé vers la matrice mitochondriale où il est dégradé par la protéase LON (Nargund et al., 2012). Lorsque la machinerie d'importation est défectueuse, ATFS-1 est transloqué cette fois-ci dans le noyau puisqu'il n'est plus dégradé dans la matrice mitochondriale, et active l'expression de gènes en réponse à l'altération de la machinerie d'importation et sert donc de signal de non-fonctionnalité de la mitochondrie. Ainsi, l'UPRmt favorise la survie des cellules et la récupération des mitochondries grâce à des adaptations métaboliques et à un programme précis de biogenèse mitochondriale, en plus de l'activation de l'expression des protéines chaperonnes et des protéases (Figure 3.7). Une autre protéine possède la qualité de signaler aux machineries de dégradation cellulaire la présence de mitochondrie défectueuse, et repose également sur la perte du potentiel membranaire mitochondrial : le rôle de PINK1 dans la mitophagie sera décrit dans le paragraphe 3.2.3.2.1.1 PINK1 : le gardien de la mitochondrie.



**Figure 3.7 : Le système de l'UPRmt.**

Le facteur de transcription ATFS-1 est normalement transporté dans la mitochondrie où il est dégradé par la protéase LON. L'altération de l'importation mitochondriale favorise la translocation ATFS-1 vers le noyau pour initier la transcription des chaperonnes, des protéases et favoriser la survie des cellules et la récupération des mitochondries.

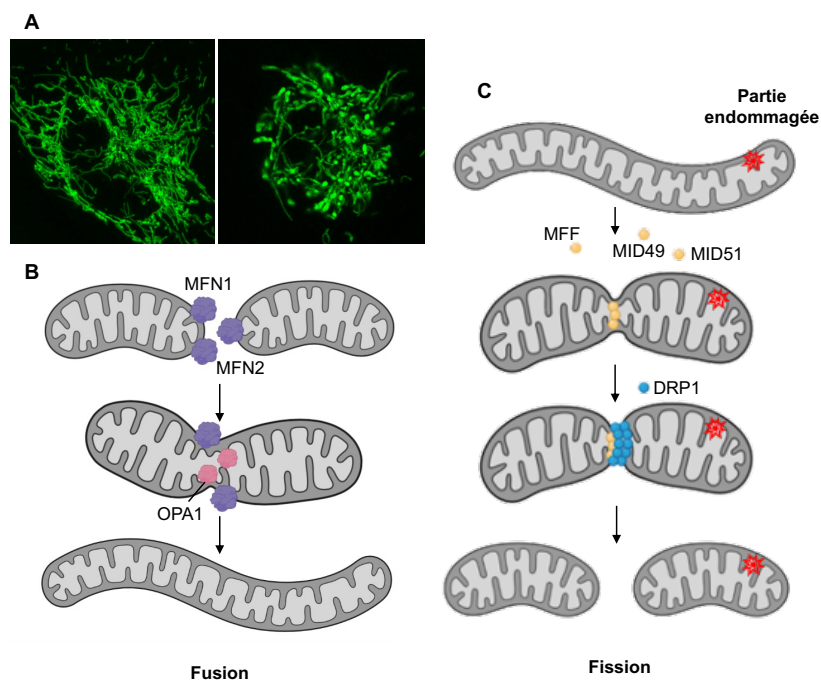
### 3.1.3.2. Le contrôle de l'organelle

#### 3.1.3.2.1. La dynamique des mitochondries : fusion/fission

Les mitochondries sont des organelles organisées en réseau dynamique, capable de se réarranger lorsqu'une partie de ce réseau est endommagé (Figure 3.8.A). Pour cela, les mitochondries peuvent subir des fusions et des fissions, ce qui permet l'échange de matériel entre les mitochondries saines par le processus de fusion et la ségrégation des mitochondries endommagées par le processus de fission (Figure 3.8.B et C), permettant alors de retirer une partie du réseau mitochondrial endommagée sans atteindre l'intégrité du réseau entier.

La fusion de deux mitochondries permet le rapprochement et la jonction de deux organelles en une seule. Elle nécessite la fusion des deux membranes externes puis des membranes internes. Pour cela, les protéines à activité GTPase mitofusines 1 et 2 (MFN1 et 2) sont recrutées à la membrane externe des deux mitochondries adjacentes et interagissent entre elles en dimères homo- ou hétérotypiques, formant une superhélice. Leur changement de conformation engendrée par l'hydrolyse du GTP facilite le processus de fusion. Les membranes mitochondriales internes fusionnent quant à elles grâce à l'activité GTPase de la protéine OPA1 (*optic atrophy type 1*) (Song et al., 2007). La fusion préserve l'intégrité cellulaire afin d'augmenter la production d'ATP, de ce fait, la fusion se produit lorsque la glycolyse est inhibée ou lorsque les besoins en ATP sont augmentés (Gomes et al., 2011) (Figure 3.8.B).

La fission est médiée par une GTPase cytosolique, la protéine dynamine de type 1 (*dynamin-related protein 1*, DRP1) chez l'Homme et DNM1 chez la levure. DRP1 est recrutée à la membrane mitochondriale externe par trois récepteurs protéiques : MFF (*mitochondrial fission factor*), MID49 et MID51 (*mitochondrial elongation factor*, MIEF2 et 1 respectivement). Sa forme oligomérique en anneau force la membrane à se contracter en créant une zone tubulaire d'étranglement (Ingeman et al., 2005). La constriction est finalement assurée par son activité GTPase provoquant la division des mitochondries (Figure 3.8.C). DRP1 est soumis à des modifications post-traductionnelles afin de réguler sa fonction. Ainsi, durant la division cellulaire nécessitant une répartition équitable des mitochondries dans les deux cellules filles, DRP1 est phosphorylée par les protéines du cycle cellulaire CDK1/Cycline B. De plus, les mitochondries endommagées dont le potentiel membranaire est diminué, sont fragmentées afin de protéger le réseau sein et ces mitochondries isolées sont dégradées par la mitophagie (Burman et al., 2017; Narendra et al., 2008) avant que l'apoptose ne soit induite par la libération de protéines pro-apoptotiques. De ce fait, la délétion de DRP1 diminue la mitophagie (Gomes et al., 2011) et la dégradation des protéines de fusion MFN1 et MFN2 par l'UPS contribue à augmenter les événements de fission (Moehlman and Youle, 2020).



**Figure 3.8 : La dynamique des mitochondries : fusion/fission.**

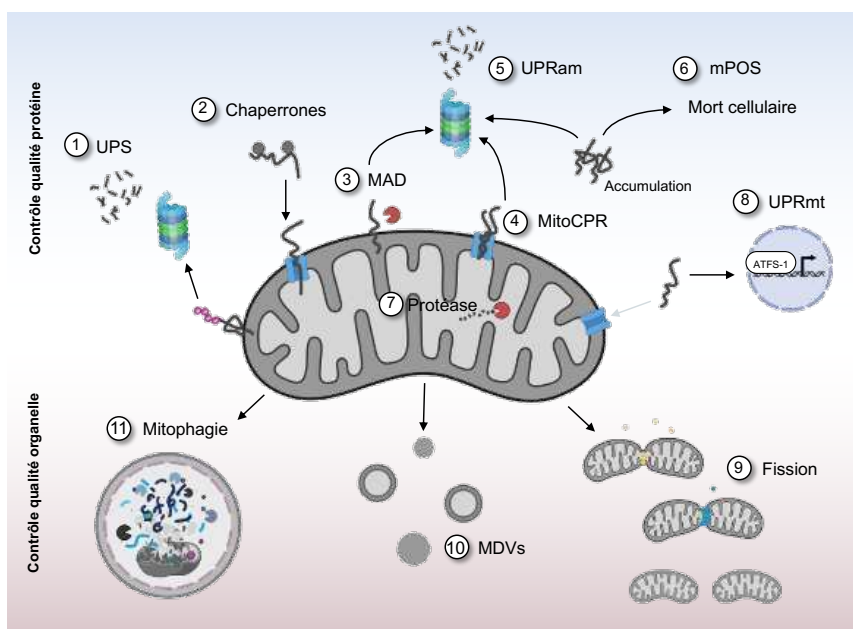
(A) Images de microscopie confocale de mitochondrie de nos cellules HeLa et A549. Les deux types cellulaires présentent des réseaux mitochondriaux différents. (B) Fusion : les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et 2) sont recrutées à la membrane mitochondriale externe des deux mitochondries adjacentes à fusionner et interagissent entre elles de manière homo ou hétérotypiques afin de rapprocher les membranes. La fusion des membranes mitochondriales internes est assurée par OPA1 (*optic atrophy type 1*). (C) Fission : DRP1 (*dynamamin-related protein 1*) se lie à ses récepteurs MFF (*mitochondrial fission factor*), MID49 et 51 (*mitochondrial elongation factor, MIEF2 et 1*) présents à la membrane mitochondriale externe et s'oligomérisent pour former un anneau. L'hydrolyse du GTP permet la constriction des membranes et génère deux mitochondries filles.

### 3.1.3.2.2. Les vésicules dérivées de la mitochondrie

Les vésicules dérivées des mitochondries (*mitochondrial-derived vesicles*, MDVs) est un système de navette fonctionnant via la génération et la libération de vésicule, mis en place pour éliminer des parties des protéines mitochondriales ainsi que des parties de mitochondrie légèrement endommagées. Certaines études suggèrent que les MDVs représentent un système qui fonctionne indépendamment de la dépolarisation mitochondriale (Soubannier et al., 2012), alors que d'autres démontrent qu'elle se déroule en parallèle d'autres voies de dégradation mitochondriale (McLelland et al., 2016). Le système peut dépendre des protéines de la machinerie de l'autophagie (Guerroué et al., 2017) ou se mettre en place de manière indépendante (Towers et al., 2021). Les mécanismes et le rôle des MDVs restent alors à éclaircir, mais les preuves actuelles indiquent un rôle protecteur pour la mitochondrie et semblerait protéger des stress oxydatifs (Soubannier et al., 2012)

### 3.1.3.2.3. La mitophagie

La dégradation sélective des mitochondries par l'autophagie, un processus appelé mitophagie, est essentielle dans des processus physiologiques cellulaires nécessitant l'élimination spécifique des mitochondries. Cependant, la mitophagie permet également l'élimination des mitochondries endommagées ou dysfonctionnelles, ce qui représente alors un contrôle qualité au niveau de l'organelle. L'altération du potentiel membranaire mitochondrial permet le recrutement et l'activation de protéines spécifiques dont l'activité conduit à la reconnaissance ciblée de l'organelle endommagée grâce à une machinerie complexe. Le processus dans l'ensemble nécessite de nombreuses protéines qui permet alors la dégradation des mitochondrie grâce à la voie lysosomale. L'autophagie, suivie de la mitophagie, sont décrit dans les prochains paragraphes.



**Figure 3.9 : Contrôle qualité de la mitochondrie.**

Des systèmes de surveillance du contrôle qualité des protéines sont présents dans la cellule et comportent (1) le système ubiquitine-protéasome, (2) l'importation des protéines précurseurs du cytosol vers la mitochondrie par les protéines chaperonnes HSP70 et HSP90, (3) les protéases AAA+ ATPase VCP/p97 qui permettent d'extraire les protéines repliées prématurément par la MAD (*mitochondrial-associated degradation*), (4) le déchargement des protéines bloquées dans les translocases via la mitoCPR (*mitochondrial compromised protein response*), (5) l'UPRam (*unfolded protein response activated by mistargeting of proteins*) dirige les protéines mal repliées accumulées dans le cytosol vers le protéasome, (6) l'activation de la mort cellulaire par l'accumulation des protéines mal repliées appelée mPOS (*mitochondrial compromised protein response*), (7) la surveillance des protéines par les protéases dans la mitochondrie et (8) l'activation de l'UPRmt (*mitochondrial unfolded protein response*) par ATFS-1. Le contrôle qualité de la mitochondrie implique également des mécanismes au niveau de l'organelle, tels que (9) la ségrégation d'une partie mitochondriale abimée grâce à la fission, (10) la formation de vésicules extrayant une partie de la mitochondrie (*mitochondrial-derived vesicles*, MDVs) ou (11) la dégradation de la mitochondrie par la mitophagie.

## 3.2. La mitophagie : une forme d'autophagie sélective

### 3.2.1. L'autophagie

L'autophagie est un processus catabolique possédant des fonctions cytoprotectrices : hautement dynamique, elle est induite en quelques minutes en réponse à divers stress et favorise la survie en cas de pénurie d'énergie et de nutriments. Elle protège également la cellule des dommages potentiels engendrés par des protéines ou organelles défectueuses. De ce fait, l'autophagie prévient de la mort cellulaire. Cela est rendu possible grâce à une multitude de voies cellulaires signalant à la machinerie de l'autophagie les différents stress.

#### 3.2.1.1. Découverte et caractéristiques

L'autophagie est le processus de dégradation et de recyclage du matériel cytoplasmique des cellules par la voie des lysosomes. Alors que la fonction lysosomale dans la dégradation fut découverte quelques années auparavant (Appelmans and Duve, 1955), Keith Porter, le pionnier de la microscopie électronique et son étudiant font l'observation d'une modification du nombre, de la taille et de la localisation des lysosomes lorsque le métabolisme des cellules est modifié (Ashford and Porter, 1962). Ils observent que le glucagon, l'hormone hyperglycémiant, influence le contenu des lysosomes renfermant alors du matériel cytoplasmique dont des organelles cellulaires. Cependant, leur interprétation quant à l'origine et la formation de ces lysosomes particuliers est erronée. Christian De Duve identifie plus tard une nouvelle structure, l'autophagosome, capable de séquestrer le contenu cytoplasmique et de fusionner ensuite avec les lysosomes (Deter et al., 1967). Le terme autophagie provenant du grec « se manger soi-même » décrit alors l'ensemble de la machinerie, hautement conservée au cours de l'évolution permettant les processus cataboliques par lesquels la cellule dégrade et recycle son contenu cytoplasmique, médié par la voie lysosomale. L'identification et la caractérisation des protéines de la machinerie de l'autophagie dont les AuTophagy-related genes (ATG) par Yoshinori Ohsumi dans les années 1990 lui ont valu le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 2016. Depuis, au vu de la quantité et de l'hétérogénéité des substrats ciblés par l'autophagie, l'étude de son rôle et son fonctionnement dans l'homéostasie cellulaire et son implication dans les pathologies telles que le cancer n'a cessé d'augmenter.

L'autophagie est strictement définie par la dégradation du matériel cytoplasmique par la voie lysosomale. De ce fait, l'autophagie est à distinguer des autres voies de trafics vésiculaires présentes dans la cellule, appelées hétérophagies, qui prennent naissance à la membrane plasmique aboutissant également à la dégradation lysosomale. L'hétérophagie regroupe les processus d'endocytose tels que la phagocytose permettant l'absorption de matériel ou débris cellulaires, la pinocytose consistant à l'ingestion des fluides et liquide extracellulaire, ainsi que l'endocytose

médiée par les récepteurs régulant des voies de signalisation. De plus, d'autres processus cataboliques sont capable de prendre en charge et de dégrader le contenu cytoplasmique sans impliquer la voie lysosomale, tel que la dégradation protéasomale impliquant le protéasome 26S (l'UPS), bien que des substrats puissent être communs à l'autophagie et à l'UPS (Galluzzi et al., 2017).

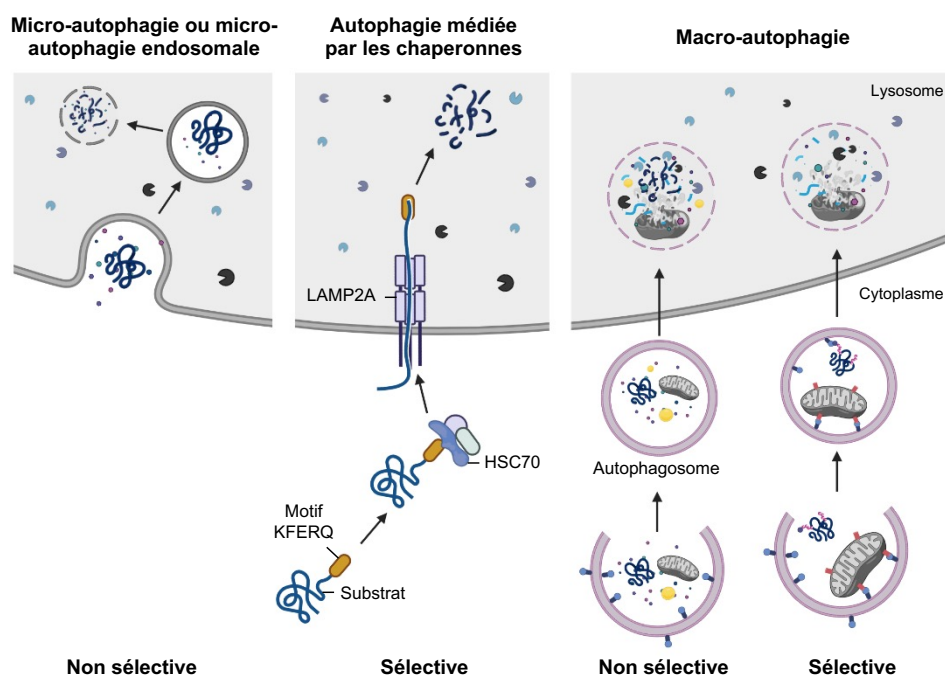
### 3.2.1.2. Les sous-types d'autophagie

Trois types différents d'autophagie sont décrits : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperonne et la macro-autophagie (Galluzzi et al., 2017) (Figure 3.10). La micro-autophagie peut être sélective ou non sélective (Schuck, 2020). Elle diffère des autres types car elle ne nécessite pas d'intermédiaires de transport tels que des protéines chaperonnes ou des autophagosomes décrit par De Duve. A la place, la membrane du lysosome chez les plantes et la levure s'invagine et séquestre le contenu cytoplasmique formant la cargaison autophagique. Le contenu lysosomal multivésiculaire est alors dégradé. Un mécanisme similaire est décrit chez l'Homme, nécessitant les endosomes tardifs, appelée alors « la micro-autophagie endosomale ». La microphagie est peu étudiée, néanmoins, il est désormais admis qu'elle joue un rôle important dans le transport des biomolécules, l'adaptation métabolique, le remodelage des organelles ainsi que le contrôle qualité de la cellule.

Le second type d'autophagie est une voie médiée par les chaperonnes et est exclusivement sélective (Kaushik and Cuervo, 2018) car elle requiert la présence d'une séquence spécifique d'acides aminés (KFERQ) des protéines adressées à cette voie de dégradation. La reconnaissance de ce motif par un complexe de translocation de protéines, protéines chaperonnes cytosoliques (HSC70 chez la levure et HSP8A chez l'Homme), permet l'acheminement de la protéine substrat vers les lysosomes afin d'y être internalisée et dégradée. La dégradation de protéines cytosoliques module, entre autres, le métabolisme du glucose et des lipides, la réparation de l'ADN, la reprogrammation cellulaire et la réponse cellulaire au stress.

Le troisième type d'autophagie, la macro-autophagie, est de loin la voie autophagique la plus étudiée et la mieux caractérisée à ce jour. Contrairement aux deux autres voies, le processus de dégradation de la macro-autophagie requiert la formation d'une structure vésiculaire à double membrane appelée autophagosome, capable de séquestrer du matériel cytoplasmique et des organelles cellulaires entier ou en partie, de transiter et de fusionner avec les lysosomes afin d'assurer la dégradation de son contenu. De plus, la macro-autophagie est considérée comme une voie de dégradation massive des composants cellulaires car les structures vésiculaires engouffrent une large quantité de contenu cytoplasmique et d'organelles contrairement aux deux autres voies. Les caractéristiques spécifiques de la macro-autophagie entraînent dans ce cas des modifications morphologiques du compartiment vésiculaire facile à distinguer et expliquent en partie la découverte

précoce de ce processus durant l'étude des ultrastructures cellulaires en microscopie électronique (Deter et al., 1967). La macro-autophagie sera nommée autophagie dans les prochains paragraphes.



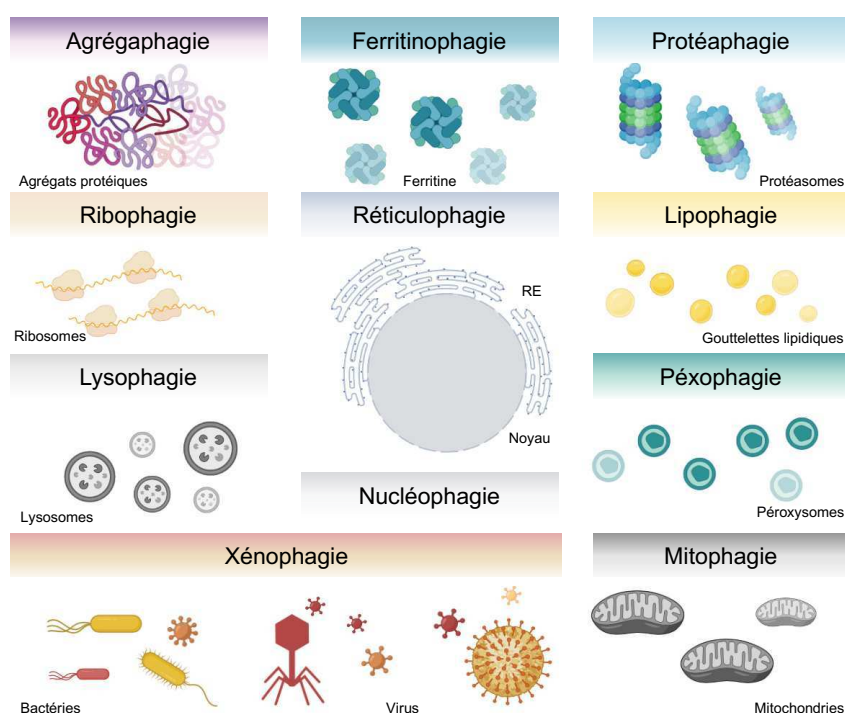
**Figure 3.10 : Les différentes formes d'autophagies.**

La micro-autophagie (ou miro-autophagie endosomale chez l'Homme) est la séquestration du matériel cytoplasmique par invagination du lysosome (ou endosome tardif). Seulement la micro-autophagie non sélective est représentée ici. L'autophagie médiée par les chaperonnes est exclusivement sélective, elle permet la dégradation des protéines possédant un motif KFERQ, reconnu par une chaperonne HSC70. La macro-autophagie internalise le contenu cytosolique de manière sélective ou non, grâce à la formation d'une organelle à double membrane appelée autophagosome qui fusionne ensuite avec les lysosomes pour dégrader les substrats et le matériel cytosolique séquestrés. Adaptée de la figure de (Kaushik and Cuervo, 2018).

### 3.2.1.3. Les différentes formes d'autophagie sélective

L'autophagie a longtemps été considérée comme un processus de dégradation de masse non sélectif, il est cependant désormais admis qu'une autophagie sélective élimine le matériel cytosolique indésirable et défectueux, potentiellement dangereux, telles que les mitochondries endommagées (mitophagie) ou les agrégats de protéines (agrégaphagie), afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. Cette autophagie sélective est également essentielle pour répondre aux besoins spécifiques de la cellule, comme la dégradation du contenu des gouttelettes lipidiques par la lipophagie capable de cataboliser les triglycérides, les diglycérides, les esters de cholestérol (Kounakis et al., 2019). Ainsi, la séquestration sélective nécessite l'identification des entités à dégrader par un signal « mangez-moi », permettant le recrutement de récepteurs autophagiques qui servent de point d'ancrage à l'autophagosome. C'est ainsi que P62, connu aussi sous le nom de séquestosome-1 (SQSTM1), a été le premier récepteur

identifié et impliqué dans la dégradation des protéines agrégées par l'autophagie. En effet, P62 recruté et lié aux substrats, permet l'identification et la reconnaissance par l'autophagosome grâce à ses domaines d'interaction LIR (*LC3-interacting region*) assurant l'association avec des protéines sur la membrane de l'autophagosome (Bjørkøy et al., 2005). Depuis, de nombreux autres récepteurs ont été identifiés (Kim et al., 2016). Différentes macromolécules et organelles cellulaires sont soumises à la dégradation par la voie de l'autophagie portant alors le nom d'agrégophagie, ferritinophagie, protéaphagie, ribophagie, xénophagie, lysophagie, péxophagie, lipophagie, réticulophagie, nucléophagie ainsi que mitophagie (Galluzzi et al., 2017) (Figure 3.11). La dégradation sélective nécessite alors toute la machinerie de l'autophagie à commencer par la formation de vésicules à double membrane afin de séquestrer le substrat à éliminer.



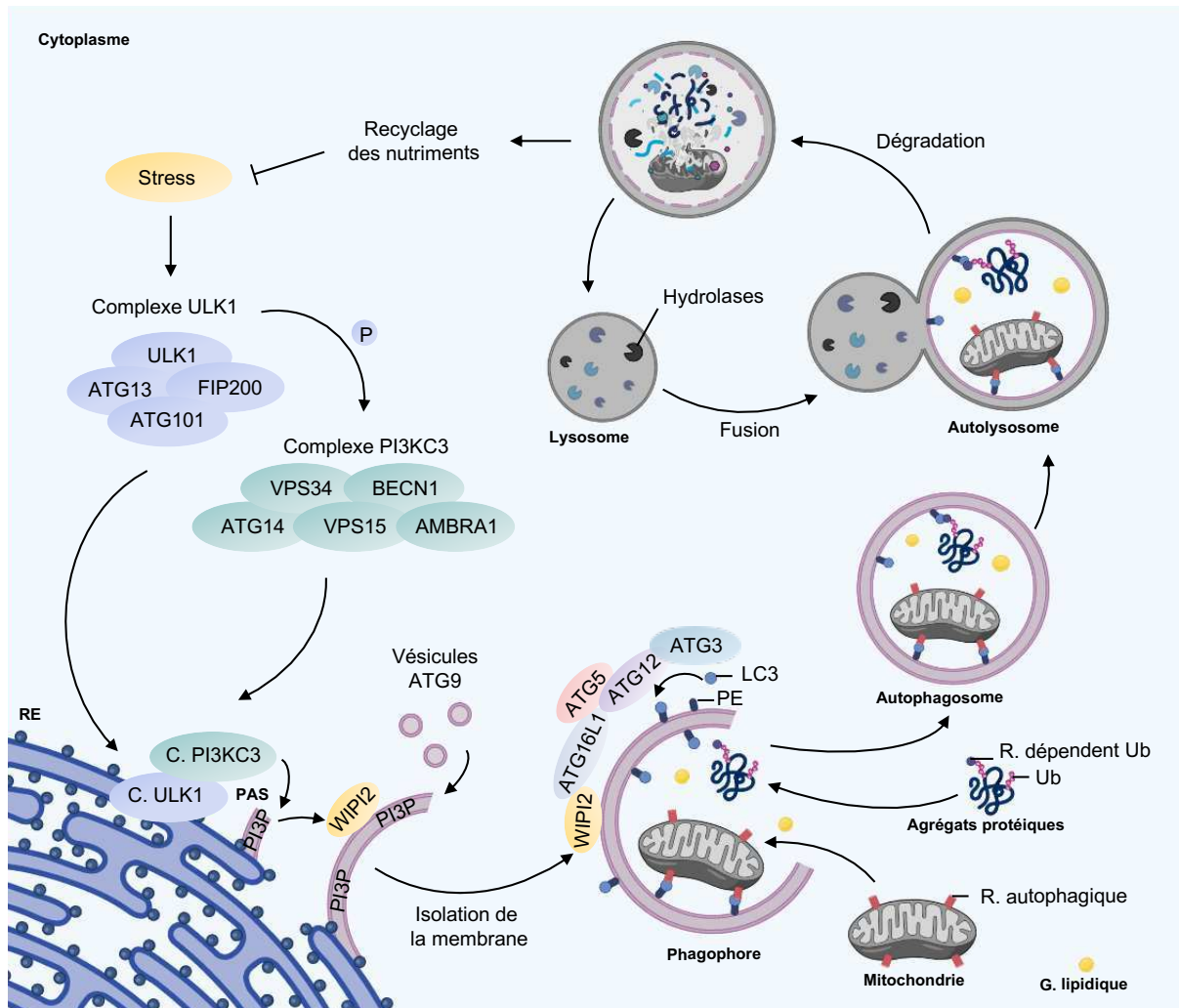
**Figure 3.11 : Les formes sélectives de la macro-autophagie et leurs différents substrats.**

Différentes macromolécules et organelles cellulaires sont soumises à la dégradation par la machinerie de l'autophagie portant alors le nom des substrats séquestrés de manière sélective. RE : réticulum endoplasmique. Adapté de la figure de (Galluzzi et al., 2017).

#### 3.2.1.4. La machinerie moléculaire de l'autophagie

Le processus de l'autophagie consiste en une séquence d'évènements conduisant à l'activation des complexes protéiques et à leur recrutement au niveau du site d'assemblage du phagophore (l'initiation), à la biogénèse du phagophore (nucléation) qui par la suite s'étend et s'incurve (élongation) afin de devenir sphérique puis se ferme, séquestrant alors le matériel cytoplasmique et générant

l'autophagosome (maturation). Celui-ci est transporté aux lysosomes et fusionne, appelé alors autolysosome (fusion). La membrane interne de l'autophagosome et les matériaux séquestrés sont ensuite dégradés dans les autolysosomes contenant de nombreuses hydrolases, telles que des lipases, des protéases, des nucléases et des glycosylases (Dikic and Elazar, 2018; Nakatogawa, 2020). Les produits de dégradation sont recyclés dans le cytoplasme à différentes fins cellulaires (Figure 3.12).



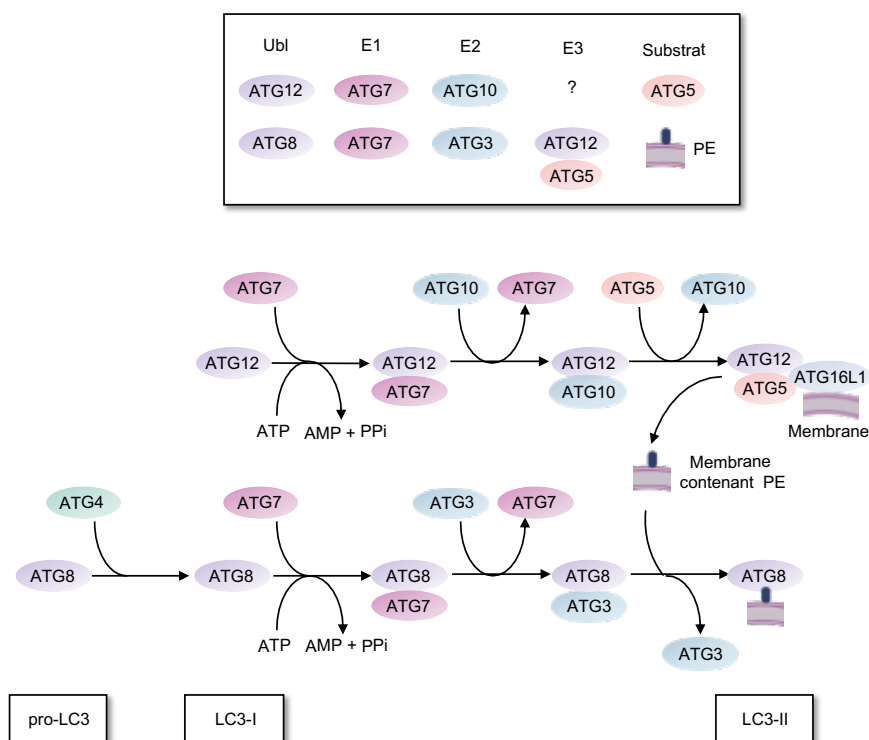
**Figure 3.12 : La machinerie de l'autophagie.**

Un stress cellulaire permet l'activation du complexe protéique ULK1 (C. ULK1) qui va activer à son tour le complexe PI3KC3 (C. PI3KC3). Ces deux complexes sont recrutés à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) au niveau du site d'assemblage du phagophore (PAS). La production de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) recrute d'autres protéines ainsi que des vésicules contenant des ATG9 permettant l'isolation et l'élongation du phagophore. Le phagophore peut séquestrer du matériel cytoplasmique de manière non sélective ou sélective, nécessitant dans le dernier cas des récepteurs autophagiques présents à la membrane des organelles substrats. L'autophagosome formé fusionne alors avec les lysosomes, générant l'autolysosome. La dégradation du contenu cytoplasmique et des organelles est assurée par les hydrolases acides libérées par le lysosome, et les macromolécules dégradées sont relarguées dans le cytoplasme. G. lipidique : gouttelette lipidique. Adaptée de la figure de (Dikic and Elazar, 2018).

L'initiation de l'autophagie débute par l'assemblage et l'activation du complexe protéique ULK1 (*unc-51 like autophagy activating kinase 1*) formé des protéines ATG13, ATG101, FIP200 (*focal adhesion kinase-interacting protein of 200 kDa*) et ULK1, recruté au niveau du site d'assemblage du phagophore (PAS), principalement au niveau du RE (Hayashi-Nishino et al., 2009) (Figure 3.12). Cependant, l'exacte origine permettant la formation du phagophore est controversée et de nombreuses autres organelles seraient impliquées (Biazik et al., 2015). Le complexe ULK1 permet ensuite le recrutement et l'activation par phosphorylation d'un second complexe multiprotéique avec une activité PI3 kinase (*phosphoinositide 3-kinase*, PI3K) de classe III formé de VPS34 (*vacuolar protein sorting 34*), VPS15, ATG14, BECN1 (*Beclin 1*) et AMBRA1 (*autophagy and Beclin 1 regulator 1*). Ainsi la production de PI3P (*phosphatidylinositol-3-phosphate*) par le complexe définit la structure caractéristique du phagophore, la membrane isolée précurseur de l'autophagosome. Le recrutement de vésicules contenant ATG9 qui proviennent de l'appareil de Golgi, des endosomes tardifs ou de la membrane plasmique (Galluzzi et al., 2017), fournissent des lipides et des protéines supplémentaires contribuant à la formation de la membrane du phagophore (Young et al., 2006). Le phagophore recrute ensuite des protéines possédant un domaine d'interaction au PI3P, telles que WIPI2 (*WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2*, ATG18 chez la levure) (Nishimura et al., 2017), assurant dans un premier temps le détachement de la double membrane isolée constituant le phagophore mais permet également l'interactions avec d'autres protéines ATG.

Deux systèmes moléculaires proches du processus d'ubiquitination sont décrits aboutissant à l'élongation du phagophore (Nakatogawa, 2020). Le premier système consiste à la formation du complexe ATG12~ATG5-ATG16L1 (Figure 3.13) : ATG12 est apparentée à l'ubiquitine et est activée par une enzyme E1 activatrice, ATG7, puis transférée vers une enzyme E2 de conjugaison, ATG10. ATG12 se lie ensuite à ATG5, ce qui forme le complexe ATG12~ATG5 (Kuma et al., 2002). Ce complexe interagit d'une part avec ATG16L1, capable de se lier à WIPI2 présent à la membrane du phagophore, mais d'autre part, ATG12~ATG5-ATG16L1 forme un complexe de type enzyme E3 ubiquitine ligase afin d'assurer les réactions du deuxième système, requis pour l'élongation du phagophore (Dooley et al., 2014). En effet, le deuxième système débute par le clivage des précurseurs des protéines de type ubiquitine de la famille des ATG8 qui, chez les mammifères, comprend les sous-familles LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) et GABARAP (*gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*), en leur forme mature. ATG4 clive la partie C-terminale de la forme pro-LC3, acquérant alors sa forme mature appelée LC3-I. Elle est ensuite activée par ATG7 jouant encore une fois le rôle d'enzyme E1 activatrice, pour ensuite transférer LC3-I à l'enzyme E2 de conjugaison, ATG3. Le stress lipidique membranaire local engendré par la courbure de la membrane du phagophore en formation active ATG3, lui conférant une spécificité spatiale et temporelle (Nath et al., 2014). Le complexe préalablement formé ATG12~ATG5-ATG16L1 présent à la membrane du phagophore va permettre la conjugaison de LC3 à une phosphatidyléthanolamine (PE)

membranaire, formant alors la forme LC3-PE conjuguée, forme LC3-II (Kabeya et al., 2004). LC3-II est caractéristique des membranes autophagiques : cette forme lipidée de LC3 se distribue de manière équitable entre les membranes interne et externe du phagosome. LC3-II sert de point d'ancrage à de nombreuses protéines présentant un domaine LIR (région d'interaction avec LC3), telles que les récepteurs autophagiques permettant la sélectivité des substrats, et est également requis pour l'élongation et la fermeture de la membrane du phagosome (Tsuboyama et al., 2016).



**Figure 3.13 : Les systèmes de conjugaison de l'autophagie.**

Les deux systèmes s'apparentent au système d'ubiquitine nécessitant les enzymes activatrices E1, les enzymes E2 de conjugaison et les enzymes E3 ubiquitines ligases. Dans ces systèmes, les molécules Ubl (*ubiquitin-like*) sont les protéines ATG12 et les protéines de la famille AT8 comprenant LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) et GABARAP (*gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*). Le substrat ATG5 couplé à ATG12 joue le rôle d'E3 dans le deuxième système, ce qui permet de lipider LC3 avec une phosphatidyléthanolamine (PE) présente à la membrane de l'autophagosome en formation. L'appellation des formes LC3 en fonction de leur maturation et de leur lipodation est précisée.

Une fois l'autophagosome complètement formé, l'élimination progressive des protéines ATGs de la membrane externe de l'autophagosome ainsi que le recrutement de la machinerie responsable de l'acheminement vers le lysosome permettent la maturation de l'autophagosome. Les autophagosomes et leur contenu cytoplasmique sont transportés grâce aux microtubules et aux complexes de transport dynéine/dynactine en direction des lysosomes, situés vers la région périnucléaire de la cellule (Cabukusta and Neefjes, 2018). La fusion avec le lysosome est assurée par les SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) (Stolz et al., 2014) et il semblerait que la forme LC3-II soit également nécessaire à la

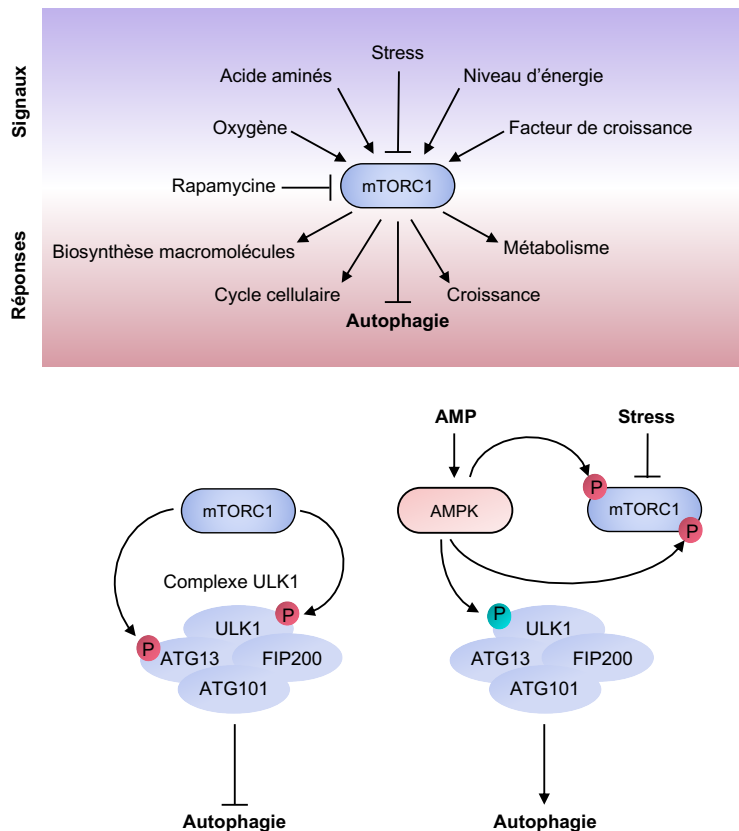
fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Nguyen et al., 2016; Vaites et al., 2018). Durant ce processus, la membrane externe de l'autophagosome fusionne avec la simple membrane du lysosome. De ce fait, l'autolysosome formé possède une simple membrane et la membrane interne de l'autophagosome est dégradée. La dégradation du contenu de l'autolysosome est possible par l'acidification luminale et l'activation consécutive d'hydrolases lysosomales.

#### 3.2.1.5. Les mécanismes de régulation de l'autophagie

La régulation de l'activation de l'autophagie par des stimuli de stress est principalement gouvernée par des modifications post-traductionnelles puisque la machinerie de l'autophagie est exprimée de manière constitutive dans toutes les cellules (Antonioli et al., 2017), permettant alors une réponse rapide et dynamique. Ainsi, l'autophagie est un processus adaptatif qui se produit en réponse à différentes formes de stress, telles que des niveaux faibles d'ATP ou des carences nutritionnelles et permet à la cellule d'adapter son métabolisme et de répondre aux besoins énergétiques engendrés par le stress : la dégradation des organelles et des substrats génère de nouveaux éléments disponibles à la cellule pour assurer les fonctions cellulaires essentielles (Galluzzi et al., 2014). En conséquence, l'autophagie chez les mammifères est fondamentale pour le métabolisme systémique pendant le jeûne prolongé : des études chez la souris ont révélé que l'incapacité d'activer l'autophagie au niveau cellulaire accélère le catabolisme des réserves de nutriments et entraîne un épuisement rapide des réserves de glycogène et de lipide du tissu adipeux, ainsi qu'un catabolisme musculaire important pour régénérer des acides aminés qui sont alors utilisés par le foie (Karsli-Uzunbas et al., 2014). De plus, l'autophagie joue un rôle majeur à la naissance dans le maintien des niveaux d'énergie dans différents tissus après l'arrêt de l'apport nutritif maternel via le placenta.

Sur le plan mécanistique, le principal acteur de la régulation de l'autophagie est mTOR (*mammalian target of rapamycin*). mTOR est une protéine kinase hautement conservée durant l'évolution, constituée de deux complexes catalytiques distincts : mTORC1 et mTORC2. Découvert par David M. Sabatini, mTOR fait l'objet d'un nombre incroyable d'études car ce complexe possède un rôle prépondérant dans la régulation des comportements cellulaires fondamentaux tels que la croissance et la prolifération (Sabatini et al., 1994). En effet, c'est le principal régulateur des processus anaboliques et cataboliques en réponse aux multiples signaux permettant d'informer sur la quantité de nutriments disponibles dans la cellule (Figure 3.14). mTORC1 intègre et répond aux signaux intra- et extracellulaires tels que les facteurs de croissance, le stress, le statut énergétique, l'oxygène et les acides aminés afin de contrôler de nombreux processus majeurs, dont la synthèse des protéines et des lipides ainsi que l'autophagie (Laplante and Sabatini, 2012; Saxton and Sabatini, 2017). De ce fait, lorsque les nutriments sont abondants, mTOR actif phosphoryle ATG13 et ULK1, protéines du premier complexe requis pour l'initiation de l'autophagie,

empêchant alors l'activation de ce complexe par d'autres modification post-traductionnelles (Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009; Kim et al., 2011). Durant un stress énergétique et lorsque la quantité de nutriments n'est plus suffisante dans la cellule, d'une part mTOR est inhibé par différents mécanismes, d'autre part, l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) est activée : cette protéine kinase est activée lorsque le ratio ATP/ADP est faible en conséquence d'une diminution des voies de la glycolyse ou de la respiration cellulaire par manque de glucose (Figure 3.14). L'activation de l'AMPK permet l'activation de l'inhibiteur TSC2 (*TSC complex subunit 2*) du complexe mTORC1 (Inoki et al., 2003), ainsi que de l'inhibition de Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) (Gwinn et al., 2008). Puisque mTOR est inactivé, l'AMPK peut alors phosphoryler ULK1. De plus, l'inactivation de mTORC1 induite par une carence nutritionnelle modifie son inhibition exercée sur le facteur de transcription EB (TFEB), qui se transloque alors vers le noyau, où il régule l'expression des gènes favorisant la production d'autophagosomes et de lysosomes (Settembre et al., 2012).



**Figure 3.14 : Les voies d'activation et d'inhibition de l'autophagie.**

Les différents signaux activant mTORC1 et les réponses induites sont représentés. mTORC1 inhibe le complexe ULK1 lorsque les nutriments sont abondants. Cependant, lorsqu'une carence en nutriments ou une baisse du ratio ATP/ADP sont détectées, l'AMPK est activée et inhibe mTORC1 en plus d'activer ULK1. P rouge : phosphorylation inhibitrice, P vert : phosphorylation activatrice. Adapté de (Saxton and Sabatini, 2017).

### 3.2.1.6. Le rôle de l'autophagie dans le cancer

Le rôle cytoprotecteur de l'autophagie dans l'élimination des constituants toxiques tels que les mitochondries endommagées ou les agrégats protéiques s'atténue avec l'âge et participe alors au vieillissement et aux maladies associées à l'âge. Ainsi, il a été montré que l'activation de l'autophagie au niveau de l'organisme entier par restriction calorique permet d'augmenter l'espérance de vie dans divers modèles animaux (Hansen et al., 2018; Madeo et al., 2015). Dans la continuité de ces études, l'inhibition de l'autophagie est à l'origine de nombreuses maladies et pathologies telles que la neurodégénérescence, les maladies cardiovasculaires, les désordres métaboliques ainsi que le développement de cancer (Galluzzi et al., 2015). L'autophagie confère une protection cellulaire en éliminant les composés défectueux toxiques qui pourraient engendrer des dommages génomiques conduisant à des mutations aberrantes au sein des cellules et être à l'origine de développement de cancer. Dans ce cas, l'autophagie possède un rôle anti-tumoral. Cependant, au vu de l'adaptation métabolique que prodigue la machinerie autophagique en réponse aux différents stress énergétiques, l'autophagie confère un avantage considérable à la cellule cancéreuse. Dans ces conditions, l'autophagie est alors pro-tumoral. Le rôle de l'autophagie dans le développement tumoral dépend du type de cancer, du stade et du contexte génétique. Étudier et comprendre ces deux aspects de l'autophagie est essentiel afin de développer des modulateurs autophagiques à des fins de thérapies anti-cancéreuses.

#### 3.2.1.6.1. L'autophagie dans la transformation maligne

L'autophagie peut servir de voie de suppression des tumeurs par plusieurs mécanismes : en maintenant la stabilité génomique, en éliminant les organelles subcellulaires défectueuses, notamment les mitochondries dépolarisées, et donc en supprimant les sources cellulaires de stress oxydatif, et en régulant l'inflammation. L'inactivation de la machinerie de l'autophagie par délétion d'un ou plusieurs gènes de l'autophagie chez la souris augmente le développement spontané de cancer, comme cela a été montré en premier lieu avec les souris hétérozygotes *Beclin1*<sup>+/-</sup> (un des composants du complexe PI3KC3) développant des carcinomes du sein (Liang et al., 1999), mais également des lymphomes (Qu et al., 2003). Une perte allélique de *Beclin1* a également été observée dans 40 à 75 % des cancers du sein, des ovaires et de la prostate (Sun and Peng, 2008). Un autre groupe observe que la délétion d'ATG5 dans l'ensemble de la souris puis d'ATG7 spécifiquement dans les cellules du foie induit le développement de lésions néoplasiques hépatiques, entraînant une accumulation de P62 ainsi qu'un stress oxydatif accompagné d'une instabilité génomique (Takamura et al., 2011). Dans cette dernière expérience, l'inhibition totale de l'autophagie engendre une transformation cellulaire alors que l'inhibition partielle de l'autophagie par l'hétérozygotie de *Beclin1* diminue l'autophagie, ce qui contribue à la transformation cellulaire, mais ne l'inactive pas complètement, ce qui participe

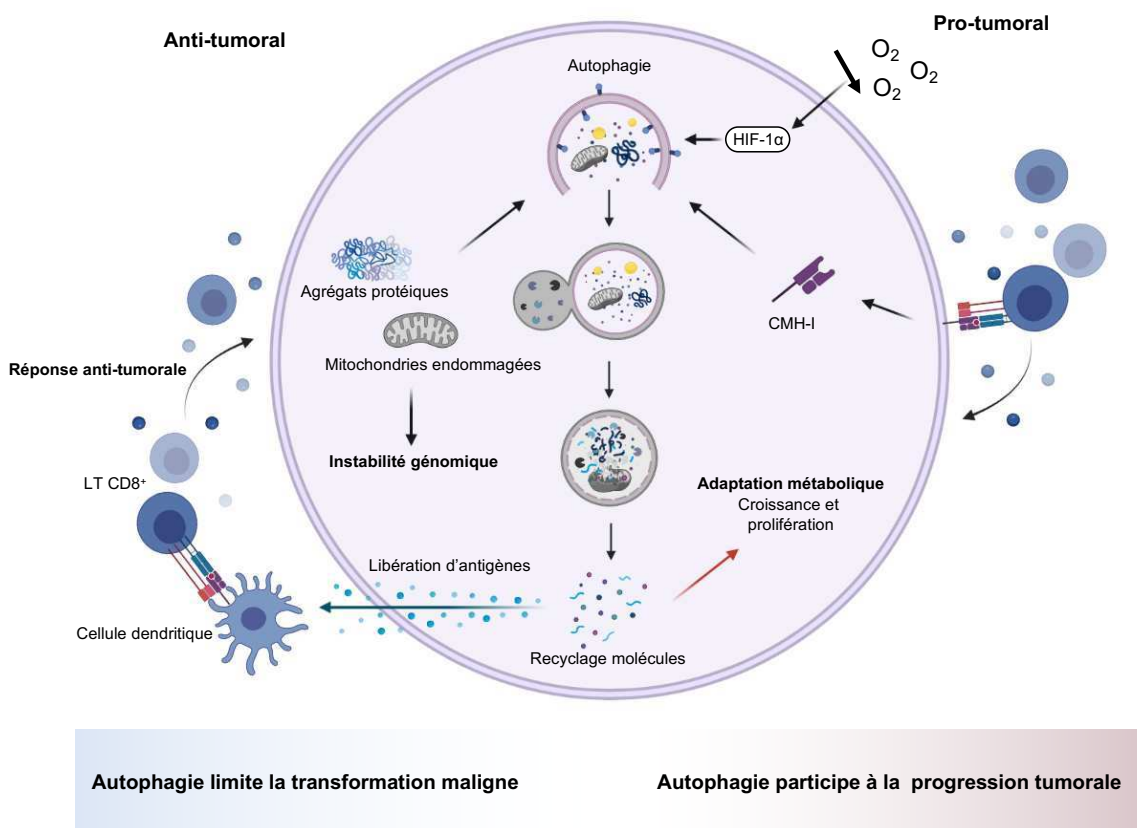
alors au développement de tumeurs malignes (Kimmelman and White, 2017). Cela suggère que l'autophagie prévient la transformation cellulaire, mais que dans une cellule cancéreuse, l'autophagie participe à la croissance tumorale (Figure 3.15).

De plus, bien que les modèles de souris génétiquement modifiées permettent d'étudier le rôle de l'autophagie dans le développement tumorale dans le tissu d'origine avec un système immunitaire fonctionnel, de nombreuses études se sont intéressées à l'inactivation de l'autophagie de l'organisme entier et donc de manière non spécifique, sans prendre en considération le rôle de l'autophagie dans le compartiment immunitaire dont la fonction peut différer de celle des cellules cancéreuses (Cianfanelli et al., 2015; Liang et al., 1999; Qu et al., 2003). Ainsi, l'inhibition de l'autophagie favorise la génération de ROS et la production en conséquence de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF), l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  (Crışan et al., 2011; Mathew et al., 2009), des phénomènes qui participent à l'inflammation chronique et qui ont été associés à un risque accru de transformation maligne dans de multiples tissus (Mantovani et al., 2008; Yamazaki et al., 2020a). De ce fait, l'autophagie inhibe les réponses inflammatoires. De plus, l'autophagie peut jouer un rôle important dans les cellules présentatrices d'antigènes en contribuant à la présentation d'antigènes au niveau des complexe du CMH II par exemple, participant alors aux réponses anti-tumorales (Münz, 2016). De même, l'autophagie des cellules cancéreuses influence les réponses immunitaires : l'inhibition de l'autophagie modifie la réponse immunitaire et diminue la réponse des lymphocytes T cytotoxiques. En effet, la présentation des antigènes des cellules en train de mourir aux cellules dendritiques nécessaire pour activer une réponse anti-tumorale efficace requiert l'autophagie (Li et al., 2008; Yamazaki et al., 2020b). De plus, l'inactivation de l'autophagie par la délétion spécifique d'ATG5 dans les cellules cancéreuses pulmonaires induite par l'oncogène KRAS diminue la surveillance immunitaire ce qui accélère la tumorigénèse initiale (Rao et al., 2014) (Figure 3.15).

#### 3.2.1.6.2. L'autophagie dans la progression tumorale

L'environnement tumoral est caractérisé par de faibles ressources en nutriments et un manque d'oxygène. Ces paramètres sont susceptibles d'activer la voie de l'autophagie afin de permettre à la cellule cancéreuse de s'adapter et de survivre. En effet, l'hypoxie stabilise le facteur inductible de l'hypoxie-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) qui induit alors l'autophagie en activant BECLIN 1 et participe à la croissance tumorale (Galluzzi et al., 2015). Ce n'est donc pas étonnant que la voie de l'autophagie soit fortement activée dans les cellules cancéreuses, phénomène expliqué par l'environnement et donc une demande élevée en nutriments pour subvenir aux besoins engendrés par une forte prolifération mais également pas une activation directe de la machinerie de l'autophagie par les signalisations oncogéniques (Guo et al., 2016; Perera et al., 2015). De ce fait, de nombreuses études ont démontré que les défauts de la machinerie de l'autophagie limitent la prolifération, la dissémination et le potentiel métastatique des

cellules cancéreuses. Dans des modèles génétiques murins de cancer du poumon induit par l'oncogène KRAS, l'inhibition de l'autophagie par délétion des gènes ATG5 ou ATG7 spécifiquement dans les cellules cancéreuses, diminue le développement tumoral (Bhatt et al., 2019; Guo et al., 2013; Rao et al., 2014) et modifie le métabolisme des cellules cancéreuses en fonction de la présence d'une mutation oncogénique concomitante. Ainsi, la délétion de P53 augmente la taille des gouttelette lipidiques alors que la délétion de LKB1 (*liver kinase B1*) augmente la dépendance à la  $\beta$ -oxydation ce qui épuise les réserves de lipides des cellules cancéreuses lorsque la machinerie de l'autophagie est inactive. Ces résultats démontrent que les cancers requièrent une autophagie fonctionnelle pour leurs adaptations métaboliques afin d'assurer leur croissance ainsi que leur progression (Figure 3.15).



**Figure 3.15 : Le double rôle de l'autophagie dans le cancer.**

L'autophagie prévient de la transformation maligne en éliminant les potentiels dangers cellulaires tels que les agrégats protéiques et les mitochondries endommagées. Elle permet également d'activer l'immunité par la libération d'antigènes, reconnu par les cellules dendritiques. Cependant, l'autophagie contribue aux adaptations métaboliques puisqu'elle est induite en réponse à l'hypoxie, mais qu'elle permet de recycler des biomolécules pour subvenir aux besoins engendrés par une forte prolifération des cellules cancéreuses. De plus, la dégradation du complexe majeur d'histocompatibilité réduit son expression à la surface des cellules et donc diminue la reconnaissance des cellules cancéreuses par le lymphocyte T CD8<sup>+</sup>.

Afin de déterminer le rôle du système immunitaire dans la diminution du développement tumoral lorsque l'autophagie est inactivée, des expériences d'allogreffes de cellules cancéreuses de mélanome B16F10 ou de carcinome colorectal MC38 et CT26 ont été réalisées dans des souris immunocompétentes ou immunodéficientes. Alors que la croissance tumorale est inchangée lorsque le système immunitaire est absent, les tumeurs implantées avec des cellules de carcinome colorectal déficientes pour ATG7 se développent moins rapidement que celles possédant une autophagie fonctionnelle dans des souris immunocompétentes (Arensman et al., 2020). La diminution de la croissance tumorale est attribuée à l'action des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> puisque leur inhibition par anticorps restaure la croissance tumorale. Ces résultats appuient l'échappement de la surveillance immunitaire mis en évidence dans un modèle murin de cancer pancréatique démontrant le rôle de l'autophagie dans la dégradation du CMH I des cellules cancéreuses (Yamamoto et al., 2020) (Figure 3.15).

La mitophagie est définie par la dégradation sélective des mitochondries par la machinerie de l'autophagie. Elle est induite en réponse aux programmes de différenciation cellulaire nécessitant l'élimination spécifique des mitochondries, mais également à la suite de dommages causés par le stress. La mitophagie est alors un mécanisme de contrôle qualité de la mitochondrie et assure des fonctions cytoprotectrices majeures. Ainsi, les dysfonctionnements de la régulation de la mitophagie altèrent l'homéostasie cellulaire ce qui participe à l'initiation et la progression tumorale (Javadov et al., 2020).

### 3.2.2. Découverte de la mitophagie

Keith Porter observe en 1962 pour la première fois, grâce à la microscopie électronique, la présence de fragments mitochondriaux dans les lysosomes (Ashford and Porter, 1962), phénomène associé à l'autophagie sans conclusion sur la sélectivité de la séquestration des mitochondries. Quelques années plus tard, les études portant sur les changements ultrastructuraux lors de la métamorphose chez le papillon *Antheraea polyphemus* démontre la dégradation sélective des mitochondries endommagées par un programme synchronisé (Beaulaton and Lockshin, 1977). Le terme mitophagie est alors utilisé pour la première fois en 1998 (Scott and Klionsky, 1998). La mitophagie est donc la dégradation sélective des mitochondries par la machinerie de l'autophagie. Depuis, au vu de l'importance de la fonction mitochondriale dans de nombreuses fonctions cellulaires ainsi que dans la production de ROS endommageant la cellule, la mitophagie est devenue un domaine de recherche extrêmement étudié. Les mécanismes intervenant dans le processus de la mitophagie ont été en partie découverts par les recherches sur la maladie de Parkinson, associant des défauts de mitophagie au développement de la maladie. Ces recherches ont permis d'identifier que la protéine kinase PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) partage une voie de signalisation commune avec une E3 ubiquitine

ligase PARKIN (Clark et al., 2006; Park et al., 2006), toutes deux responsables de la dégradation des mitochondries par l'autophagie (Narendra et al., 2008). En effet, la voie PINK1/PARKIN est présente dans de nombreuses cellules *in vitro* et est souvent considérée comme la voie principale de la mitophagie. Cependant, cette voie n'est pas unique et de nombreux autres mécanismes sont mis en jeu (Onishi et al., 2021).

### 3.2.3. Les différentes voies de la mitophagie

#### 3.2.3.1. Les voies médiées par les récepteurs et les cardiolipines

La mitophagie médiée par les récepteurs implique différentes protéines qui s'accumulent à la surface mitochondriale en réponse à divers stress, possédant des domaines d'interaction, appelés domaines LIR, avec les protéines de la famille ATG8 lipidées à la surface du phagosome en formation (Figure 3.16). Ces récepteurs mitophagiques représentent une voie alternative à la voie PINK1/PARKIN, cependant, dans certains cas la présence de PINK1 et PARKIN facilite leur fonctionnement.

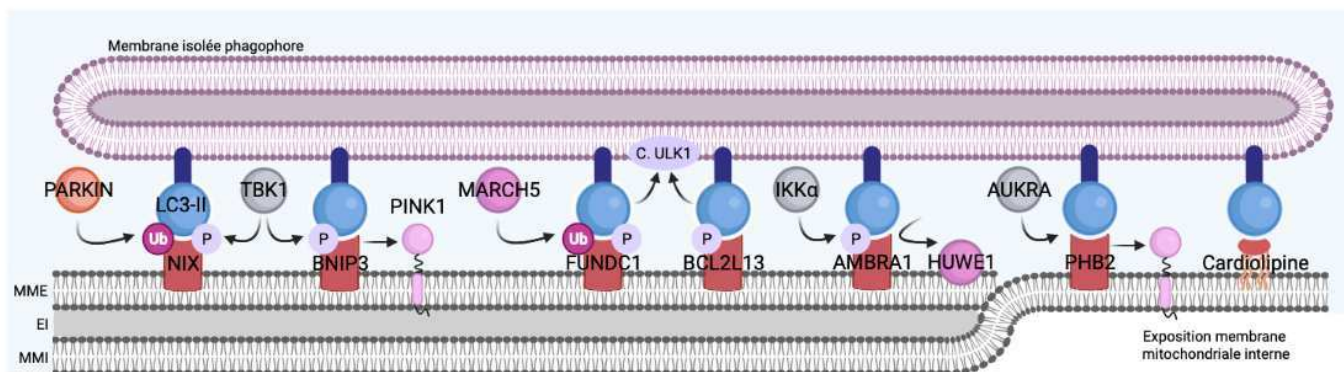
BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*) et BNIP3L/NIX (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like*) sont physiologiquement activés par l'hypoxie et la production de ROS mitochondriaux. Leur région N-terminale possédant des domaines LIR est orientée vers le cytosol, permettant le recrutement et l'association avec LC3-II présent sur la membrane de l'autophagosome en formation. Les phosphorylations sur ces deux récepteurs réalisées par la kinase TBK1 augmente l'affinité pour LC3-II (Villa et al., 2018). Alors que BNIP3 et NIX induisent la mitophagie dans des cellules n'exprimant pas PARKIN, lorsqu'elle est présente, PARKIN ubiquitine NIX favorisant l'interaction avec l'adaptateur autophagique NBR1 (*neighbour of breast cancer 1*) et BNIP3 facilite l'accumulation de PINK1 à la membrane mitochondriale externe, permettant alors le recrutement de PARKIN.

FUNDC1 (*FUN14 domain containing 1*) présente à la membrane mitochondriale externe participe également à la mitophagie induite par l'hypoxie. Elle possède un domaine LIR régulé par phosphorylation et déphosphorylation, ce qui permet durant l'hypoxie de favoriser les interactions entre FUNDC1 et LC3-II (Onishi et al., 2021). De plus, FUNDC1 fonctionne comme un récepteur à ULK1 permettant alors son activation et l'induction de la formation du phagophore (Wu et al., 2014). Afin de limiter la dégradation excessive des mitochondries en réponse à un stress hypoxique précoce, FUNDC1 est ubiquitinée par l'E3 ubiquitine ligase MARCH5 et dégradée par l'UPS (Chen et al., 2017b).

BCL2L13 (*BLC2 Like 13*) est également un récepteur permettant d'induire la mitophagie. En effet, c'est une protéine ancrée à la membrane mitochondriale externe possédant des domaines LIR régulés par phosphorylation (Murakawa et al., 2015). Il régule également la morphologie des mitochondries et sa surexpression induit la

fragmentation des mitochondries, tandis que son extinction entraîne leurs allongements. Il a récemment été démontré que la protéine BCL2L13 est capable d'induire l'activation d'ULK1 (Murakawa et al., 2019).

AMBRA1 fut d'abord identifiée régulant la nucléation des autophagosomes après l'induction de la mitophagie par PINK1/PARKIN. Cependant, l'identification du domaine LIR d'AMBRA1, impliqué dans la reconnaissance de LC3-II, permet de la reclasser en récepteur mitophagique (Strappazzon et al., 2015) et l'induction de la mitophagie par des agents découplant la mitochondrie permet la phosphorylation du domaine LIR d'AMBRA1 par la kinase IKK $\alpha$ , nécessaire à la mitophagie (Di Rita et al., 2018). Lorsque ce récepteur est localisé à la membrane externe, il peut promouvoir la mitophagie de manière dépendante ou indépendante de PINK1/PARKIN. De plus, AMBRA1 participe à la clairance des mitochondries grâce à une E3 ubiquitine ligase autre que PARKIN, HUWE1 (*UBA and WWE domain-containing 1*), qui est recrutée à la membrane mitochondriale par AMBRA1 et qui participe à la mitophagie grâce à l'ubiquitination et la dégradation de MFN2 par l'UPS.



**Figure 3.16 : La mitophagie indépendante de l'ubiquitination des protéines.**

Les récepteurs mitophagiques se trouvent à la membrane mitochondriale externe, sauf pour PHB2 et les cardiolipines qui se trouvent dans la membrane interne mais qui sont exposés lorsque la membrane externe est dégradée par le protéasome. Tous ces récepteurs mitophagiques possèdent des domaines de reconnaissance de LC3 permettant le recrutement du phagosome à la membrane mitochondriale. Ils sont majoritairement régulés par phosphorylation (P), les kinases étant en gris, mais également par des ubiquitination (Ub), les E3 ubiquitine ligases étant en rose sauf PARKIN (orange).

La protéine PHB2 (*prohibitin 2*) peut se combiner à PHB1 pour former un grand complexe sur la membrane mitochondriale interne. La rupture de la membrane mitochondriale externe médiée par PARKIN permet l'exposition de protéines de la membrane interne telles que PHB2 qui fonctionne alors comme récepteur mitophagique possédant un domaine LIR (Wei et al., 2017). Cette interaction semblerait être favorisée par la protéine kinase AURKA (Bertolin et al., 2021). De plus, PHB2 entrave la dégradation de PINK1 par PARL (*presenilin-associated rhomboid-like protease*), ce qui participe à la stabilisation de PINK1 et donc à l'induction de la mitophagie par la voie PINK1/PARKIN (Yan et al., 2019). De ce fait, lorsque PHB2 est

moléculairement inactivé, l'induction de la mitophagie est inhibée (Núñez-Vázquez et al., 2021; Yan et al., 2019).

Les cardiolipines sont les phospholipides majoritaires de la membrane interne mitochondriale. Cependant, en condition de stress mitochondrial, les cardiolipines sont externalisées à la membrane mitochondriale externe et se lient à LC3-II. De ce fait, ils servent également de récepteur permettant la reconnaissance de la mitochondrie endommagée par l'autophagosome, et ainsi les cardiolipines conduisent la mitochondrie vers la dégradation (Chu et al., 2013).

### 3.2.3.2. Les voies médiées par l'ubiquitine

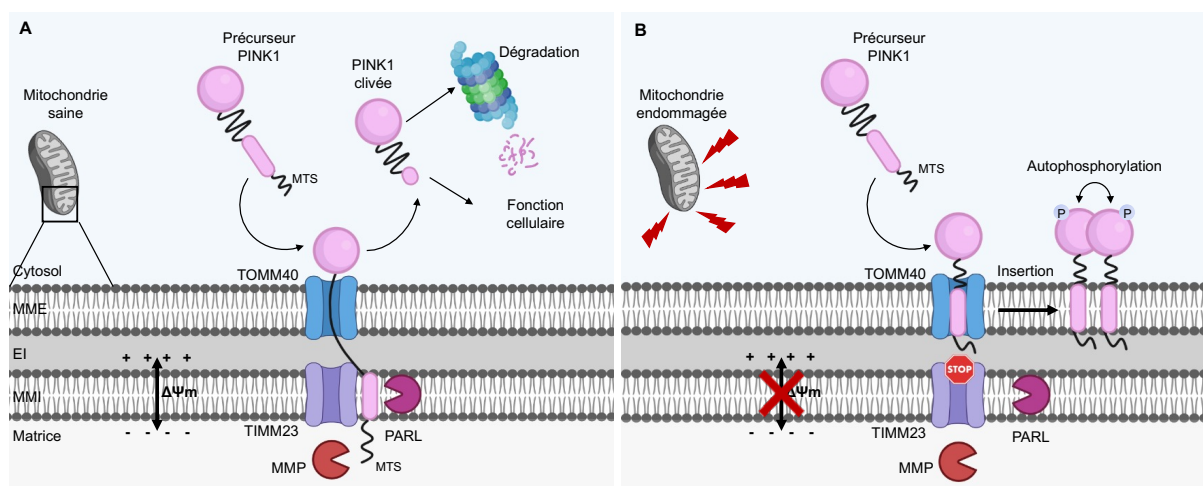
#### 3.2.3.2.1. La voie dépendante de PINK1/PARKIN

##### 3.2.3.2.1.1. PINK1 : le gardien de la mitochondrie

Lorsque les dommages mitochondriaux deviennent importants et sont irréversibles, l'induction de la mitophagie est alors nécessaire afin d'éliminer les mitochondries endommagées ou dysfonctionnelles. La mitophagie peut dépendre des voies décrites dans le paragraphe précédent, mais elle peut également être orchestrée par la sérine/thréonine kinase PINK1 dont l'activation se produit en réponse à différents stress mitochondriaux (Wang et al., 2020). L'élimination de l'organelle entier représente le stade ultime du maintien de l'homéostasie mitochondrial en partie contrôlé par PINK1, cependant, lorsque les dommages mitochondriaux sont légers, PINK1 régule également l'homéostasie mitochondriale avant d'engager la mitophagie. Ainsi, PINK1 agit comme un point de contrôle pour déterminer le mécanisme approprié pour maintenir l'homéostasie mitochondriale et PINK1 est alors considérée comme un gardien de la mitochondrie. Dans une mitochondrie saine définie par son potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), PINK1 est partiellement importée à la membrane mitochondriale interne grâce aux complexes TOM et TIM ainsi qu'à sa séquence d'adressage mitochondriale (MTS) (Matsuda et al., 2010) (Figure 3.17.A). La séquence d'adressage de PINK1 dans la membrane interne est alors retirée par MMP (Greene et al., 2012), puis le domaine transmembranaire de PINK1 qui est enchâssé dans la membrane mitochondriale interne est par la suite clivé par PARL (Jin et al., 2010; Meissner et al., 2011). Ainsi, PINK1 clivée (c-PINK1) est libérée dans le cytosol dans lequel une partie des c-PINK1 sera dégradée par le protéasome, tandis qu'une autre partie reste relativement stable grâce à la liaison de c-PINK1 aux chaperonnes. La forme c-PINK1 possède un domaine kinase fonctionnel, participant alors à de multiples processus cellulaires dans le cytoplasme, dont la régulation de la fonction mitochondriale. En effet, c-PINK1 peut réguler la biogénèse mitochondriale en favorisant indirectement la transcription de certains gènes nucléaires et mitochondriaux grâce à l'activation de partenaire, mais inhibe également la mitophagie, permettant de conserver les mitochondries fonctionnelles et d'assurer un

soutien énergétique suffisant pour l'activités cellulaires (Fedorowicz et al., 2014; Wang et al., 2020).

Lorsque la mitochondrie est endommagée, le  $\Delta\Psi_m$  est altéré empêchant alors l'import de PINK1 dans la membrane mitochondriale interne par TIM, de ce fait PINK1 n'est plus clivée et s'accumule sous sa forme entière à la membrane mitochondriale externe (Figure 3.17.B). Cette forme n'est pas reconnue par le protéasome et donc PINK1 n'est plus dégradée (Matsuda et al., 2010), au contraire, elle active la machinerie de la mitophagie. Ainsi, lorsque des dommages mitochondriaux surviennent, PINK1 et c-PINK1 jouent des rôles opposés dans l'induction ou l'inhibition de la mitophagie. Le devenir des mitochondries sous la surveillance des deux formes de PINK1 va dépendre de la gravité des dommages mitochondriaux. De ce fait, lors de dommages légers, l'induction de la mitophagie par l'accumulation modérée de PINK1 à la surface des mitochondries est plus faible que l'inhibition de la mitophagie engendrée par c-PINK1 dans le cytoplasme. Par conséquent, la mitochondrie n'est pas dégradée, mais pour autant, PINK1 stabilisée au niveau des mitochondries participe au maintien de l'homéostasie mitochondriale en régulant les altérations engendrées par les légers dommages mitochondriaux, ce qui représente la stratégie énergétique la plus économique afin de ne pas perdre la mitochondrie entière (Wang et al., 2020). Cependant, lorsque les dommages mitochondriaux sont sévères, une grande quantité de PINK1 s'accumule aux mitochondries pour promouvoir la mitophagie, ce qui surpasse l'inhibition de c-PINK1 et permet à la mitophagie de se produire pour éliminer les mitochondries endommagées. PINK1 est alors capable de fonctionner avec différents partenaires, dont les E3 ligases PARKIN, ARIH1 et MUL1 (*mitochondrial ubiquitin ligase activator of NF- $\kappa$ B1*).



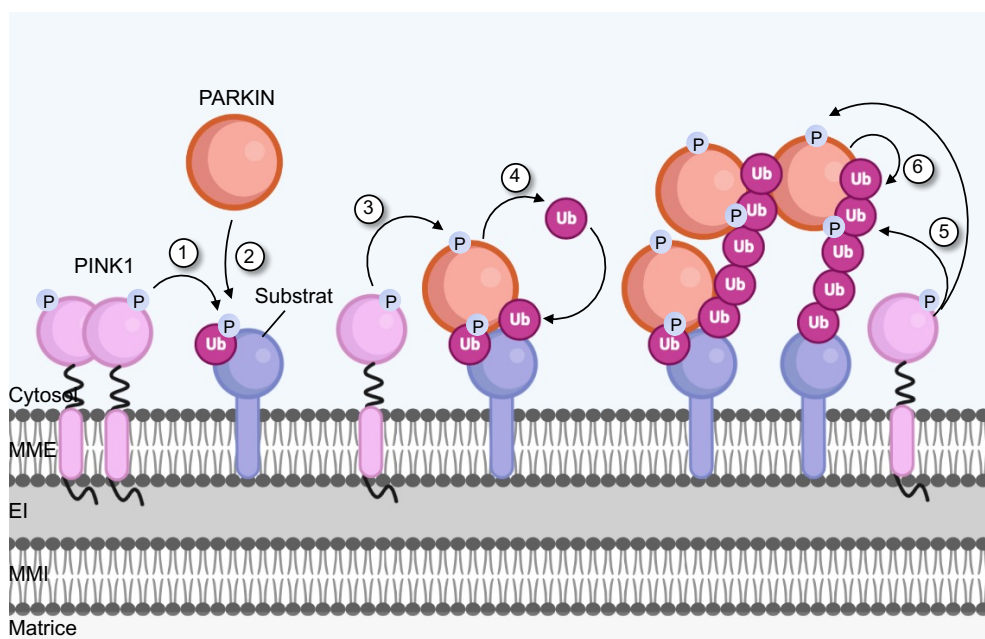
**Figure 3.17 : La dégradation et la stabilisation de PINK1.**

**(A)** PINK1 est continuellement importée dans la mitochondrie saine grâce à sa séquence d'adressage mitochondriale (MTS) et le complexe TOM à la membrane mitochondriale externe (MME). Le potentiel membranaire ( $\Delta\Psi_m$ ) conduit PINK1 dans la matrice par TIM qui se situe dans la membrane mitochondriale interne (MMI). Le MTS et le domaine transmembranaire de PINK1 alors sont dégradés par MMP et PARL respectivement. PINK1 est relâchée dans le cytosol une fois clivée et son clivage

génère une région N-terminale libre, reconnue par des E3 ligases qui l'ubiquitine et la cible vers le protéasome 26S où elle y est dégradée, mais elle peut également jouer d'autres fonctions cellulaires et participer à la régulation de l'homéostasie mitochondriale. **(B)** Lorsque la mitochondrie est sévèrement endommagée engendrant une dépolarisation de la membrane, PINK1 ne peut plus être importée par TIM, n'est pas clivée et elle s'accumule à la MME où elle se dimérise et s'autophosphoryle

### 3.2.3.2.1.2. Activation de la voie PINK1/PARKIN

Lorsque la forme PINK1 non clivée s'accumule à la membrane mitochondriale externe, des évènements d'autophosphorylation au niveau des sérines 228 et 402 permettent sa dimérisation et son activation (Figure 3.18). PINK1 activée phosphoryle ensuite une ubiquitine (Ub) présente à la surface de la mitochondrie, spécifiquement sur de la sérine 65 (Phospho-Ser<sup>65</sup> Ub) (Kane et al., 2014; Kazlauskaitė et al., 2014). PARKIN possède une forte affinité pour la Phospho-Ser<sup>65</sup> Ub. L'interaction de PARKIN avec l'ubiquitine phosphorylée entraîne un changement de conformation de PARKIN, favorisant sa phosphorylation par PINK1 sur le domaine semblable à l'ubiquitine (Ubl), au niveau de la sérine 65 également (Kondapalli et al., 2012). Cet évènement induit alors la libération du site catalytique de PARKIN et augmente son activité ligase. PARKIN étant une E3 ubiquitine ligase, elle interagit avec une enzyme E2 de conjugaison afin de transférer une Ub aux protéines de la membrane externe mitochondriale, conférant alors de nouvelles molécules Ub sujettes à la phosphorylation par PINK1, créant ainsi une amplification activatrice.

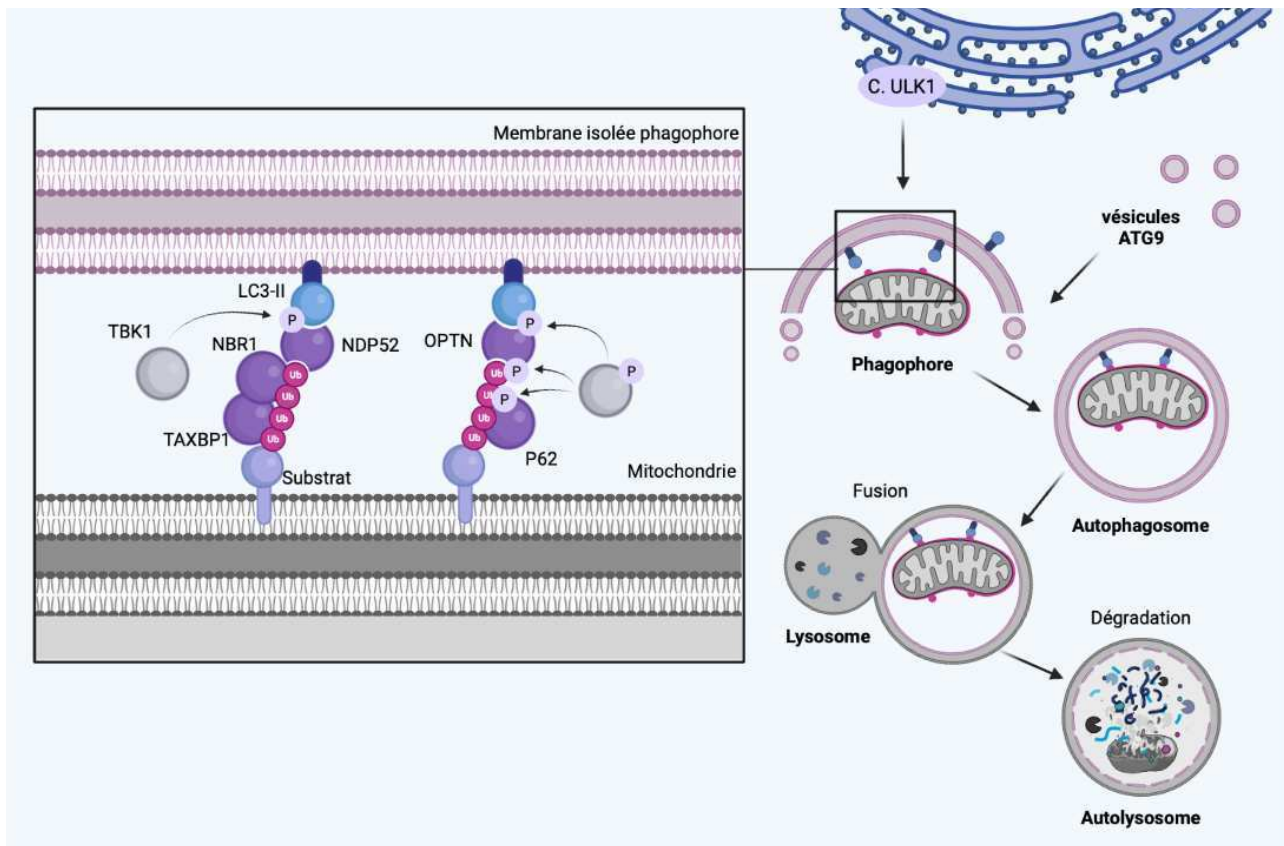


**Figure 3.18 : Le recrutement de PARKIN et la formation de chaîne d'ubiquitine.**

**(1)** PINK1 activée par la dépolarisation de la membrane phosphoryle au niveau de la sérine 65 une ubiquitine (Ub) préexistante sur des protéines (substrats) de la membrane mitochondriale externe (MME). **(2)** PARKIN présente une forte affinité pour la Phospho-Ser<sup>65</sup> Ub qui permet alors son recrutement au niveau de la mitochondrie. **(3)** PARKIN recrutée est alors phosphorylée par PINK1, ce qui active PARKIN. **(4)** PARKIN étant une E3 ubiquitine ligase permet le transfert de l'Ub sur la protéine substrat. **(5)** Le recrutement de nouvelle Ub génère de nouvelle molécule d'Ub à phosphoryler par PINK1, permettant le recrutement à nouveau de PARKIN qui est activée par PINK1. **(6)** PARKIN

transfert alors des Ub sur les Ub existante, formant une chaîne d'ubiquitine, créant ainsi un cycle d'amplification activateur. EI : espace intermembranaire, MMI : membrane mitochondriale interne.

Plusieurs protéines de la membrane externe mitochondriale ont été identifiées comme des substrats de PARKIN, telles que les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et 2) et les chaînes d'ubiquitine de type K48 formées par PARKIN sur les protéines substrats vont permettre leur dégradation par la machinerie UPS décrit dans les paragraphes précédents. La dégradation de MFN1 et MFN2 empêche alors la fusion des mitochondries ce qui contribue à la ségrégation des mitochondries endommagées et facilite leur séquestration par la machinerie de l'autophagie (Gegg et al., 2010). Les substrats ubiquitinés avec des chaînes K63 par PARKIN fonctionnent quant à eux comme des signaux de dégradation médiée par l'autophagie. Des analyses de spectrométries de masses ont révélé que les cibles de PARKIN étaient nombreuses (Chan et al., 2011; Sarraf et al., 2013), et de ce fait, PARKIN semble avoir une sélectivité de substrat plutôt faible. Au lieu de cela, PARKIN a une sélectivité spatiale, et ubiquitine les protéines présentes à la membrane des mitochondries dépolarisées. Les chaînes K63 sont reconnues par des récepteurs autophagiques possédant alors à la fois des domaines de reconnaissance des chaînes polyubiquitine K63 (UBD) ainsi qu'un domaine de reconnaissance des domaines LC3 (LIR) (Figure 3.19). Les récepteurs décrits ici sont différents des récepteurs induisant la mitophagie indépendamment du mécanisme de l'ubiquitination décrit dans le paragraphe précédent. Ainsi, P62 possède la capacité de se lier à la fois à la forme LC3-II, ainsi qu'à l'ubiquitine (Geisler et al., 2010). Outre P62, NBR1, NDP52 (*nuclear domain 10 protein 52*), TAX1BP1 (*tax1 binding protein 1*) et l'OPTN (*optineurin*) ont été identifiés comme des récepteurs autophagiques impliqués dans la voie PINK1/PARKIN et leur implication dans la mitophagie dépend du type cellulaire (Lazarou et al., 2015). Ces récepteurs peuvent être phosphorylés par la kinase TBK1 ce qui contribue à l'augmentation d'affinité pour l'ubiquitine ainsi que pour LC3-II (Richter et al., 2016).



**Figure 3.19 : Le recrutement des récepteurs autophagiques au cours de la mitophagie.**

Les chaînes d'ubiquitine sur les substrats des mitochondries sont directement reconnues par les adaptateurs autophagiques, en particulier NDP52 (*nuclear domaine 10 protein 52*) et l'OPTN (*optineurine*). La kinase TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) phosphoryle ces domaines, ainsi que les régions situées en amont des domaines LIR permettant de lier les récepteurs au LC3 lipidé (LC3-PE, appelé aussi LC3-II) présent sur la membrane du phagophore. Les phosphorylations favorisent le recrutement de la membrane isolée du phagophore. La séquestration spécifique des mitochondries endommagées et identifiées grâce à PINK1 et PARKIN, ainsi qu'aux récepteurs autophagiques permettent la formation de l'autophagosome, qui fusionne ensuite avec les lysosomes formant un autolysosome pour ensuite être dégradé.

L'initiation de la formation du phagophore lors des stress énergétiques cellulaires est assurée par l'inhibition de mTORC1 et l'activation de la kinase AMPK, phosphorylant alors ULK1. Cependant, ce mécanisme ne semble pas être privilégié lors de la mitophagie médiée par PINK1/PARKIN. En effet, bien qu'une possible activation de l'AMPK localisée proche d'une mitochondrie endommagée produisant moins d'ATP pourrait être envisagée, cependant, cela ne serait pas suffisant pour inactiver mTORC1 et ainsi lever l'inhibition d'ULK1 (Herzig and Shaw, 2018). De ce fait, de nombreuses équipes de recherche ont tenté d'élucider les mécanismes permettant d'activer ULK1 lors de la mitophagie et ainsi d'augmenter le flux de l'autophagie pour générer davantage de phagophore. Il a récemment été démontré que le récepteur autophagique NDP52 associé aux protéines externes ubiquitinées des mitochondries endommagées permet le recrutement d'ULK1, médiée par la phosphorylation de la kinase TBK1 (Vargas et al., 2019). De plus, le récepteur autophagique OPTN est susceptible de former un complexe avec les vésicules ATG9

au niveau des membrane mitochondriales endommagées, ce qui permet la formation *de novo* de membranes du phagophore à proximité de la cargaison ubiquitinée (Yamamoto et al., 2020).

#### 3.2.3.2.2. La voie médiée par d'autres E3 ubiquitines ligases

L'ubiquitination par l'E3 ubiquitine ligase PARKIN est le processus de mitophagie le plus décrit dans la littérature. Cependant, de nombreuses études exploitent les résultats d'une utilisation de la surexpression de PARKIN dans des cellules qui de manière endogène ne l'expriment pas. Bien que cela soit un outil incontournable pour la compréhension des mécanismes et des protéines impliquées dans la mitophagie, cela peut cependant masquer d'autres voies d'activation de la mitophagie. Ainsi, d'autres E3 ubiquitines ligases ont été identifiées, participant à l'induction de la mitophagie, dépendante ou non de PINK1.

MUL1 est présente à la membrane mitochondriale externe et une partie des substrats cibles de cette E3 ubiquitine ligase sont communs à ceux préalablement identifiés de PARKIN. En effet, MUL1 ubiquitine DRP1 et les mitofusines. Ainsi, il a été montré que MUL1 est un acteur agissant en parallèle de la voie PINK1/PARKIN lorsque la mitophagie est induite par des agents découplants (Yun et al., 2014), mais stabilise PINK1 lorsque la mitophagie est induite par d'autres agents chimiques sans dépolarisation mitochondriale et de manière indépendante de PARKIN (Igarashi et al., 2020). De plus, MUL1 possède un domaine LIR ce qui complique l'identification de son rôle car elle pourrait alors être considérée comme un récepteur mitophagique (Ambivero et al., 2014).

L'E3 ligase ARIH1 (*ariadne RBR E3 Ub protein ligase 1*), appartenant à la même famille des RBRs (RING-in-Between-RING) ligases que PARKIN, joue un rôle important dans la mitophagie, notamment des cellules cancéreuses de poumon (Villa et al., 2017). En effet, l'induction de la mitophagie par des agents découplants dans des cellules surexprimant ARIH1 conduit à la perte d'expression de protéines mitochondriales et à l'augmentation de l'adressage des mitochondries vers les lysosomes via la machinerie de l'autophagie. Ce processus est également dépendant de l'activité E3 ligase d'ARIH1, et dépend, tout comme PARKIN, de la kinase PINK1. Cependant les récepteurs autophagiques impliqués dans la séquestration des mitochondries endommagées n'ont pas été identifiés car l'absence des protéines NDP52 et OPTN n'altère pas la mitophagie médiée par la surexpression d'ARIH1. Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer les substrats et/ou partenaires d'ARIH1 impliqués dans cette nouvelle voie de mitophagie des cellules cancéreuses. Néanmoins, ARIH1 semble jouer un rôle dans le développement tumoral, comme nous le verrons plus loin. Il est intéressant de noter que la même année, une autre équipe a démontré le rôle d'ARIH1, orchestré avec deux autres E3 ubiquitines ligases LRSAM1 (*leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1*)

et HOIP (*HOIL-1 interacting protein*), dans la dégradation des bactéries par la voie de l'autophagie, appelée xénophagie (Polajnar et al., 2017).

Deux autres E3 ubiquitines ligases, MARCH5 et HUWE1 participent à la mitophagie mais ne sont pas classifiées ici car elles reposent sur des récepteurs mitophagiques décrit dans le paragraphe précédent.

### 3.2.4. Les fonctions de la mitophagie

#### 3.2.4.1. Fonctions physiologiques

La mitophagie est essentielle dans des processus physiologiques cellulaires nécessitant la dégradation des mitochondries (Onishi et al., 2021). Au cours du développement, la mitophagie est requise pour le processus de différenciation des érythrocytes impliquant les récepteurs mitophagiques NIX ainsi que lors de l'élimination des mitochondries paternelles dans les spermatozoïdes.

De plus, la mitophagie joue un rôle central dans le contrôle qualité des mitochondries car les mécanismes initiant la mitophagie sont activés lors de défauts mitochondriaux permettant l'élimination spécifique des mitochondries endommagées. Par conséquent, une mitophagie basale continue s'opère dans la cellule permettant d'éliminer les mitochondries vieillissantes et endommagées. Récemment, deux modèles de souris transgéniques exprimant des rapporteurs fluorescents permettant de monitorer la mitophagie *in vivo* ont été générés, et ont permis de montrer que la mitophagie basale varie entre les types cellulaires (McWilliams et al., 2016; Sun et al., 2015), avec une forte activité dans les cellules hautement métaboliques (McWilliams et al., 2018). Ces modèles d'animaux ont également permis de révéler que la mitophagie basale ne semble pas dépendre de l'activité de PINK1 *in vivo*, résultats confirmés chez la drosophile (Lee et al., 2018). Ces résultats sont en accord avec une précédente étude *in vitro* démontrant d'une part que la mitophagie permet de préserver les mitochondries des dommages associés à un métabolisme oxydatif élevé par la production naturelle de ROS par exemple associées aux cellules métaboliquement actives (Melser et al., 2013). Ainsi, la dégradation des mitochondries dans ce cas survient avant même l'émergence de dommages mitochondriaux, un mécanisme qui prévient, plutôt que de résoudre, le vieillissement mitochondrial. D'autre part, la voie activée dans ces conditions d'études est dépendante de Rheb (*ras homolog enriched in brain protein*) et semblerait être indépendante de PINK1. En effet, Rheb interagit directement avec NIX, ce qui permet d'augmenter son association avec LC3-II présent à la surface de l'autophagosome, permettant alors l'élimination de la mitochondrie. Ainsi, en lien avec les études de McWilliams, la mitophagie des tissus métaboliquement actifs indépendante de dommages mitochondriaux et de l'activation consécutive de PINK1, permettrait de protéger les cellules d'éventuelles dommages liés à la production excessive de ROS.

L'homéostasie de l'ensemble des mitochondries est donc sous le contrôle de la mitophagie mais également de leur biogénèse. Ainsi, la biogénèse mitochondriale permet de remplacer les mitochondries endommagées dégradées, et ce phénomène est favorisé par la mitophagie. En effet, PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$* ) est un élément important de la régulation de la biogénèse mitochondriale (Shin et al., 2011) mais sa transcription est réprimée par PARIS (Shin et al., 2011). Après induction de la mitophagie, PINK1 phosphoryle PARIS ce qui facilite sa reconnaissance par PARKIN qui l'ubiquitine (Lee et al., 2017). En effet, PARIS a été identifié comme nouveau substrat de PARKIN. Lorsqu'il est ubiquitiné, il est dégradé par l'UPS, conduisant alors à l'augmentation de la transcription de PGC-1 $\alpha$  ce qui favorise la biogénèse mitochondriale.

Outre l'activité anormale et la production des ROS, la mitochondrie endommagée peut participer à la mort cellulaire. En effet, la perméabilisation de la membrane externe (MOMP) conduit à l'exécution du programme de mort programmée. La mitophagie permet alors la clairance de ces mitochondries. Mais l'activation de la mitophagie par le recrutement de PARKIN permet également l'inhibition des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2, BAX et BAK, limitant de ce fait la cascade conduisant à la mort cellulaire (Bernardini et al., 2019; Charan et al., 2014). Cependant, lorsque le nombre de mitochondries endommagées augmente au-delà de ce qui peut être éliminé par la mitophagie, la voie de la mort cellulaire finit par être activée et son activation contribue à l'inhibition de la mitophagie. Par exemple, l'activation des caspases entraîne le clivage d'AMBRA1, révélant alors son domaine similaire à BH3 (*BH3-like domain*) qui interagit et inhibe les protéines anti-apoptotiques BCL-2 (Strappazzon et al., 2016). Par conséquent, l'équilibre entre la mitophagie et la voie de la mort cellulaire semble jouer un rôle essentiel dans la détermination de la survie en fonction des conditions de stress.

#### 3.2.4.2. Fonctions pathologiques

La mitophagie est essentielle dans tous les organes où les mitochondries jouent un rôle important et étant donné le rôle central de la mitophagie dans l'homéostasie et le contrôle qualité des mitochondries, son dysfonctionnement est associé à de nombreuses pathologies. La maladie de Parkinson, par exemple, est caractérisée par une dégénérescence des neurones dopaminergiques causée par une accumulation d'agrégats protéiques toxiques ainsi que de nombreuses délétion de l'ADN mitochondrial (Poewe et al., 2017). Tandis que la voie PARKIN/PINK1 ne semble pas requise pour la mitophagie basale, les défauts de son activité sont associés à la maladie de Parkinson. Puisque la maladie se développe tardivement chez l'Homme, cela pourrait suggérer que les défauts de la mitophagie sont révélés avec l'âge comme cela a été démontré chez les souris déficiente pour PARKIN âgées de 110 semaines (Noda et al., 2020). Ainsi, la mitophagie est impliquée dans le développement des

pathologies telles que les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires, hépatiques, métaboliques, immunitaires et inflammatoires, mais également le cancer.

### 3.3. Les rôles de la mitophagie dans le cancer

Bien qu'une mitophagie aberrante soit liée au développement de la maladie de Parkinson par la perte de PINK1 ou de PARKIN, de plus en plus de preuves indiquent que les défauts de la machinerie de la mitophagie peuvent également jouer un rôle dans le développement et la progression de cancer. Le rôle anti-tumoral ou pro-tumoral de la mitophagie dépend du stade de développement du cancer, mais également à son tissu d'origine ainsi qu'aux partenaires mitophagiques impliqués (Vara-Perez et al., 2019). De ce fait, le rôle de la mitophagie dans le cancer n'est pas absolu mais voici quelques éléments permettant de comprendre son implication (Figure 3.20).

#### 3.3.1. Protection contre l'oncogénèse

La mitophagie participe au maintien de l'intégrité cellulaire. La perte de fonction de plusieurs gènes entraîne l'inhibition de la mitophagie et l'accumulation de mitochondries endommagées, une production élevée de ROS déclenchant des dommages à l'ADN, ce qui favorise la tumorigénèse, ainsi, la mitophagie est considérée comme un mécanisme suppresseur de tumeurs (Figure 3.20) (Palikaras et al., 2017). De ce fait, l'invalidation de PARKIN augmente la prolifération des cellules cancéreuses ainsi que leur résistance à l'apoptose, aboutissant à la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses et donc au développement spontané de carcinome hépatocellulaire (Fujiwara et al., 2008). Dans la continuité de ces résultats, la délétion du gène de PARKIN *in vivo* sensibilise le développement spontané de tumeurs après irradiation des animaux (Zhang et al., 2011). De plus, il a été démontré que PARKIN est sous-exprimé dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses et tumeurs primaires, suggérant fortement un rôle suppresseur de tumeur de PARKIN (Bernardini et al., 2017). Des défauts de la machinerie de la mitophagie participe donc à l'oncogénèse. Cependant, les mitochondries endommagées et la production de ROS peuvent déclencher des réponses inflammatoires anormales, augmenter la sécrétion de cytokines inflammatoires et l'activation des cellules immunitaires.

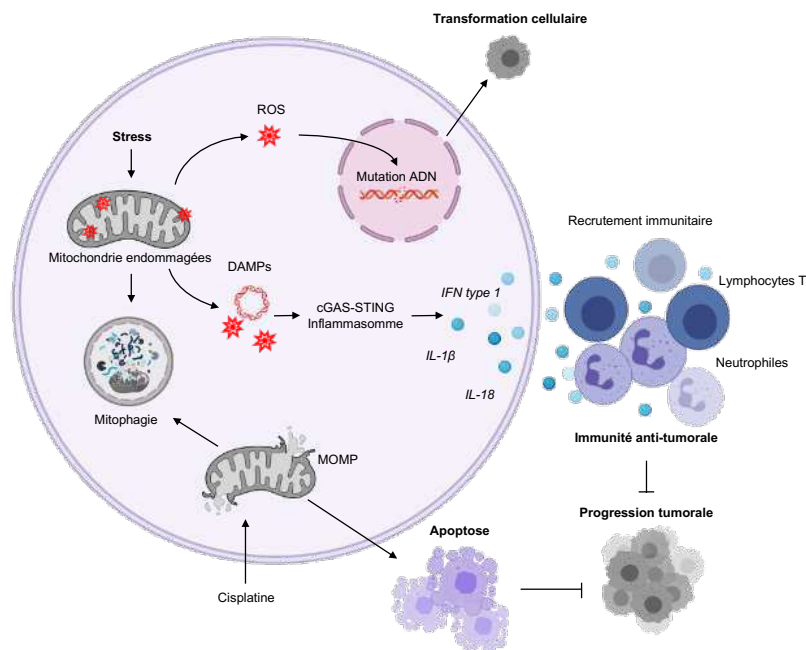
#### 3.3.2. Contrôle de l'immunité anti-tumorale

L'activation de la voie cGAS-STING et de l'inflammasome NLRP3 par l'ADN mitochondrial (ADNmt), induit l'immunité anti-tumorale (Decout et al., 2021; Zhou et al., 2011). En effet, ces voies vont permettre l'activation de l'expression de l'IFN de type 1 et de cytokines inflammatoires, et lorsque cette voie est activée par des ligands synthétiques de STING, la réponse immunitaire est stimulée ce qui réduit la croissance tumorale (Figure 3.20) (Li et al., 2016b). Une étude a montré que la déficience en

PARKIN et PINK1 favorisait la libération de l'ADNmt, entraînant un fort phénotype inflammatoire (Sliter et al., 2018). De plus, l'inhibition de l'autophagie améliore la réponse immunitaire grâce à l'accumulation d'ADNmt dans le cytosol des cellules cancéreuses après radiothérapie (Yamazaki et al., 2020b), de ce fait, il est alors tentant d'extrapoler ces résultats quant à l'inhibition directe de l'élimination spécifiques des mitochondries par la mitophagie. Ainsi, la mitophagie élimine les mitochondries endommagées et donc limite la présence ADNmt cytosolique, ce qui diminue les réponses inflammatoires et réduit l'immunité anti-tumorale.

### 3.3.3. Résistance aux traitements

Alors que PARKIN est sous-exprimée dans de nombreux cancers, il a été montré que l'expression d'une autre E3 ubiquitine ligase, ARIH1, est fortement augmenté dans de nombreuses lignées cellulaires de cancer humains (Villa et al., 2017). Étant donné que plusieurs traitements anti-cancéreux provoquent directement ou indirectement un dysfonctionnement mitochondrial, la production de ROS et la libération du cytochrome c, l'élimination de ces mitochondries dysfonctionnelles par la mitophagie peut entraver l'initiation de la cascade apoptotique. Par conséquent, l'induction de la mitophagie par les thérapies anti-cancéreuses module la capacité cytotoxique des molécules et contribue à la résistance des cellules aux traitements (Figure 3.20) (Abdrakhmanov et al., 2019; Vara-Perez et al., 2019). Ainsi, la mitophagie médiée par ARIH1 protège les cellules de cancer du poumon de la mort induite par les dommages causés par les agents découplants mitochondriaux mais lorsque ARIH1 est inhibé, la sensibilité des cellules aux agents alkylants tel que la cisplatine est considérablement augmentée (Villa et al., 2017). De même, les cellules déficientes pour PINK1, ATG7 ou ATG12 sont sensibilisées à la cisplatine. Ces résultats suggèrent alors que la mitophagie dépendante d'ARIH1 protège les cellules de la mort cellulaire et de fait, l'inhibition de la mitophagie sensibilise les cellules aux traitements couramment utilisés dans le traitement des cancers du poumon. Dans un premier temps il semblerait intéressant de cibler ARIH1 afin d'augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques, mais dans un second temps il a récemment été démontré qu'ARIH1 induit la dégradation par le protéasome de PD-L1 (Wu et al., 2021). De ce fait, la surexpression d'ARIH1 dans des cellules de cancer du sein implantées en sous-cutanée diminue la croissance tumorale *in vivo* car augmente la reconnaissance des cellules cancéreuses par les lymphocytes T.



**Figure 3.20 : Les rôles de la mitophagie dans le cancer.**

La dégradation des mitochondries endommagées protège de la transformation maligne engendrée par une instabilité génomique induite par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cependant, la libération des ROS et l'ADN mitochondrial déclenche l'activation de cGAS-STING et des inflammasomes NLRP3 et AIM2, ce qui permet une réponse IFN de type 1 ainsi que la production d'IL-1 $\beta$  et IL-18 qui participent aux recrutements du système immunitaire et donc à l'immunité anti-tumorale. Dans ce cas, la mitophagie prévient la réponse anti-tumorale en éliminant les mitochondries relarguant les DAMPs (*damage-associated molecular patterns*). De plus, le déclenchement de l'apoptose à la suite des traitements par les agents chimiothérapeutiques tels que la cisplatine est amoindrie par la mitophagie. MOMP : perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

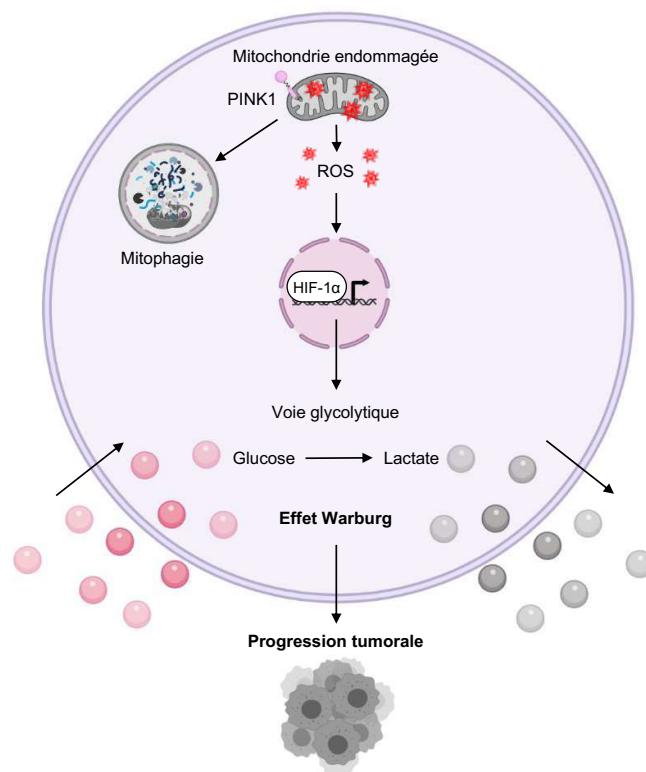
### 3.3.4. Reprogrammation métabolique et la progression tumorale

#### 3.3.4.1. L'hypoxie induit la mitophagie et l'effet Warburg

L'environnement tumoral est caractérisé par une faible teneur en oxygène et l'hypoxie stabilise le facteur HIF-1 $\alpha$ . Ce facteur est capable d'induire la mitophagie car le programme transcriptionnel de HIF-1 $\alpha$  comprend les récepteurs mitophagiques BNIP3 et NIX, et ainsi HIF-1 $\alpha$  module la masse mitochondriale de la cellule (Daskalaki et al., 2018). Par conséquent, la diminution de la masse mitochondriale des cellules cancéreuses diminue leur capacité à générer de l'ATP grâce à la respiration cellulaire par la phosphorylation oxydative et ce phénomène participe aux changements métaboliques observés dans les tumeurs favorisant la survie des cellules cancéreuses (Vara-Perez et al., 2019). Ainsi, la mitophagie contribue aux adaptations métaboliques favorisant la progression tumorale.

### 3.3.4.2. PINK1 diminue la progression tumorale

Cependant, de nombreuses études permettent d'argumenter en faveur d'une voie commune de PINK1 dans la progression tumorale, démontrés dans différents types de cancers tel que les glioblastomes, les cancers pancréatiques ainsi que les cancers colorectaux (Agnihotri et al., 2016; Li et al., 2018; Yin et al., 2021) (Figure 3.21). De manière simplifiée, la délétion spécifique de PINK1 inhibe la mitophagie ce qui conduit à l'accumulation de mitochondries endommagées productrices de ROS. Ces ROS stabilisent le facteur HIF-1 $\alpha$  qui permet alors l'expression des gènes de la voie glycolytique comme les transporteurs de glucose et les enzymes de la glycolyse. L'augmentation du flux glycolytique favorise la conversion du pyruvate en lactate au lieu de son oxydation complète par le cycle de Krebs. De ce fait, l'inhibition de la mitophagie médiée par PINK1 participe aux modifications métaboliques des cellules cancéreuses et ainsi à l'effet Warburg (Requejo-Aguilar et al., 2014) et la surexpression de PINK1 restaure ce phénotype, ce qui inhibe la croissance tumorale (Yin et al., 2021). De manière intéressante, ces mêmes effets ont été observés lors de la délétion de PARKIN dans les cancers pancréatiques (Li et al., 2018) ou de BNIP3 dans le cancer du sein (Chourasia et al., 2015). Cela constitue donc des preuves supplémentaires que ces phénotypes ne sont pas engendrés par la perte de PINK1 en tant que telle, mais par la perte de l'élimination des mitochondries endommagées. Outre la modification métabolique se traduisant par l'effet Warburg, certaines de ces études ont permis de mettre en évidence l'altération de l'immunité anti-tumorale par l'activation de HIF-1 $\alpha$ . En effet, HIF-1 $\alpha$  active l'inflammasome AIM2 dans les cellules tumorales, ce qui induit l'expression de PD-L1 (Li et al., 2018). De plus, moins de lymphocyte T cytotoxiques sont présents dans l'environnement tumoral. Cela suggère donc que la PINK1 et la mitophagie contrôle la progression tumorale en limitant les adaptations métaboliques mais également en activant la réponse immunitaire.



**Figure 3.21 : L'absence de PINK1 contribue à la progression tumorale.**

PINK1 induit la mitophagie et participe à l'élimination des mitochondries endommagées. Son absence augmente les mitochondries productrices de ROS, qui par la suite stabilisent HIF-1 $\alpha$ . Le programme transcriptionnel de HIF-1 $\alpha$  comprend les transporteurs du glucose et les enzymes de la glycolyse, ce qui augmente le flux glycolytique de la cellule et modifie le métabolisme énergétique de la cellule induisant l'effet Warburg. Ainsi, l'absence de PINK1 augmente le développement tumoral. ROS : espèces réactives de l'oxygène.

### 3.3.4.3. PINK1 et les cancers du poumon

Peu d'études à ce jour permettent d'identifier l'existence de mécanismes similaires dans les cancers du poumon. Cependant, PINK1 est sous-exprimée dans les adénocarcinomes pulmonaires par rapport aux tissus sains adjacents et son expression corrèle à l'infiltration immunitaire (Lin et al., 2021; Zhu et al., 2020). De plus, une faible expression de PINK1 est associée de manière significative à un mauvais pronostic de survie des patients atteints d'adénocarcinomes (Lin et al., 2021), ce qui pourrait expliquer l'augmentation du nombre de mitochondries dysfonctionnelles identifiée dans les tumeurs distantes à la suite du processus de métastases des adénocarcinomes pulmonaires (Chuang et al., 2020). Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes de la régulation de la mitophagie dans le cancer du poumon permettrait de limiter la progression tumorale et de prévenir les événements métastatiques afin d'améliorer la survie globale des patients.



### ARTICLE 1 :

#### « Cholesterol efflux pathways hinder KRAS-driven lung tumor progenitor cell expansion »

Le cholestérol représente un constituant majeur des membranes des cellules dans lesquelles il régule la rigidité, la fluidité et la perméabilité. Il est également impliqué dans un certain nombre de processus biologiques tels que la signalisation membranaire et est le principal composant des radeaux lipidiques, une structure membranaire permettant de réguler l'assemblage et le fonctionnement de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Les cellules ont développé des mécanismes complexes pour réguler l'abondance et la distribution du cholestérol cellulaire. Le cholestérol intracellulaire peut être utilisé par la cellule pour répondre aux divers besoins biologiques, ou être stocké sous forme de gouttelette lipidique. Il peut également être exporté à l'extérieur de la cellule par les mécanismes d'efflux cellulaire du cholestérol, ce qui participe grandement à l'homéostasie cellulaire du cholestérol. L'efflux peut être médié par les transporteurs cellulaires ABCA1 et ABCG1 (*ATP binding cassette A1 and G1*), ainsi que par SR-BI (*scavenger receptor class B type 1*). Le cholestérol intracellulaire efflué sera accepté par l'apolipoprotéine A-I (ApoA-I) formant ainsi les HDLs dans la circulation sanguine, eux-mêmes capables par la suite d'accepter le cholestérol par les mécanismes d'efflux. Les HDLs associés au cholestérol sont ainsi appelés HDL-Cholestérol (HDL-C).

Les altérations de l'équilibre homéostatique cellulaire du cholestérol sont connues pour être associées aux développements de cancer. En effet, l'augmentation du cholestérol intracellulaire est une des caractéristiques de nombreuses cellules cancéreuses qui sont hautement prolifératives et dépendent du cholestérol pour satisfaire la biosynthèse des nouvelles membranes. En conséquence, le cholestérol et ses dérivés contribuent à la progression tumorale, notamment à la prolifération, à la migration et à l'invasion des cellules cancéreuses. Cependant, le cholestérol au sein des cellules immunitaires et plus particulièrement des macrophages active différentes voies pro-inflammatoires, qui, dans une tumeur, participent aux réponses anti-tumorales et limite la progression tumorale. Ainsi, le cholestérol peut avoir plusieurs rôles en fonction du type cellulaire l'accumulant, par conséquent son efflux peut influencer la progression tumorale. Étant donné que les taux d'HDL-C sont inversement corrélés au développement de cancer de poumon (Lin et al., 2017) et qu'une accumulation du cholestérol dans les tumeurs pulmonaires par rapport aux tissus adjacents sains a été identifiée (Dessi et al., 1992), il semblerait que la diminution de l'efflux cellulaire du cholestérol participe au développement de cancer de poumon. Ainsi, dans l'équipe dirigée par le Dr. Laurent Yvan-Charvet et sous sa

direction, nous avons alors tenté d'élucider le rôle du cholestérol et de l'efflux cellulaire dans la progression tumorale des cancers de poumon, représentant mon premier sujet de thèse.

## **Cholesterol efflux pathways hinder KRAS-driven lung tumor progenitor cell expansion.**

**Emma Guilbaud<sup>1</sup>, Marius Ilie<sup>2</sup>, Stoyan Ivanov<sup>1</sup>, Vincent Sarrazy<sup>1</sup>, Nathalie Vaillant<sup>1</sup>, Marion Ayrault<sup>1</sup>, Alexia Castiglione<sup>1</sup>, Guylène Rignol<sup>1</sup>, Patrick Brest<sup>2</sup>, Venetia Bazioti<sup>3</sup>, Konstantin Zaitsev<sup>4</sup>, Kevin Lebrigand<sup>5</sup>, Virginie Magnone,<sup>5</sup> Corine Bertolotto<sup>1</sup>, Sandrine Marchetti<sup>1</sup>, Ira Goldberg<sup>6</sup>, Thierry Huby<sup>7</sup>, Marit Westerterp<sup>3</sup>, Emmanuel L. Gautier<sup>7</sup>, Bernard Mari<sup>5</sup>, Pascal Barbry<sup>5</sup>, Paul Hofman<sup>2</sup>, Laurent Yvan-Charvet<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1065, Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Atip-Avenir, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OncoAge, 06204 Nice, France (E.G., S.I., V.S., N.V., M.A., A.C., G.R., C.B., S.M., L.Y.C.)

<sup>2</sup>Institute of Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), Inserm U1081, CNRS UMR7284, Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, Hospital-Integrated Biobank (BB-0033-00025), Université Côte d'Azur, CHU de Nice, University Hospital Federation OncoAge, 06107 Nice, France (M.I., P.B., P.H.)

<sup>3</sup>Department of Pediatrics, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, The Netherlands (V.B., M.W.)

<sup>4</sup>Computer Technologies Department, ITMO University, Saint Petersburg, Russia (K.Z.)

<sup>5</sup>Université Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), CNRS UMR7275, FHU-OncoAge, Nice Sophia-Antipolis, France (K.L., V.M., P.B.)

<sup>6</sup>Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, NYU Langone Medical Center, New York, NY, USA (I.G.)

<sup>7</sup>Sorbonne Université, INSERM, UMR\_S 1166 ICAN, F-75013 Paris, France (T.H., E.L.G.).

Address correspondence to LYC: [yvancharvet@unice.fr](mailto:yvancharvet@unice.fr)

**Short title:** Defective cholesterol efflux in LUAD

**Keywords:** Lung adenocarcinoma, KRAS, high-density lipoprotein, cholesterol efflux, tumor microenvironment

## Summary

Cholesterol efflux pathways have anti-inflammatory and anti-proliferative properties that could be exploited in tumor biology to unravel cancer vulnerabilities. Using a mouse model of lung-tumor bearing KRAS<sup>G12D</sup> mutation, we identified that disruption of cholesterol efflux pathways by specific inactivation of *Abca1* and *Abcg1* in epithelial cancer progenitor cells and to some extent in macrophages promoted a pro-tolerogenic tumor microenvironment (TME) and tumor growth. Mechanistically, defective cholesterol efflux in epithelial cancer progenitor cells dominated tumor growth by governing their transcriptional landscape to support their expansion and creating TME heterogeneity that compromises anti-tumor immunity. Overexpression of the apolipoprotein A-I, to raise HDL levels, limited the cholesterol lung retention and protected these mice from tumor development and dire pathologic consequences. Cholesterol removal therapy with cyclodextrin inhalation also reduced tumor burden in progressing tumor by suppressing the proliferation and expansion of epithelial progenitor cells of tumor-origin. Local and systemic perturbations of cholesterol efflux pathways was confirmed in human lung adenocarcinoma. Our results position cholesterol removal therapy as a putative metabolic target in lung cancer progenitor cells.

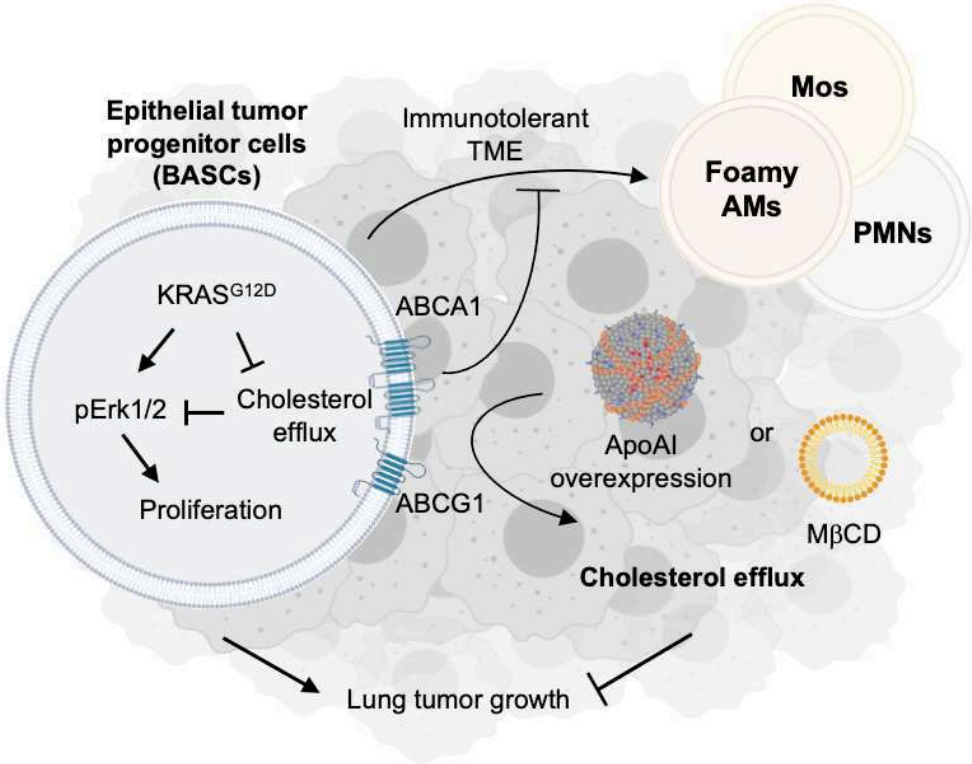
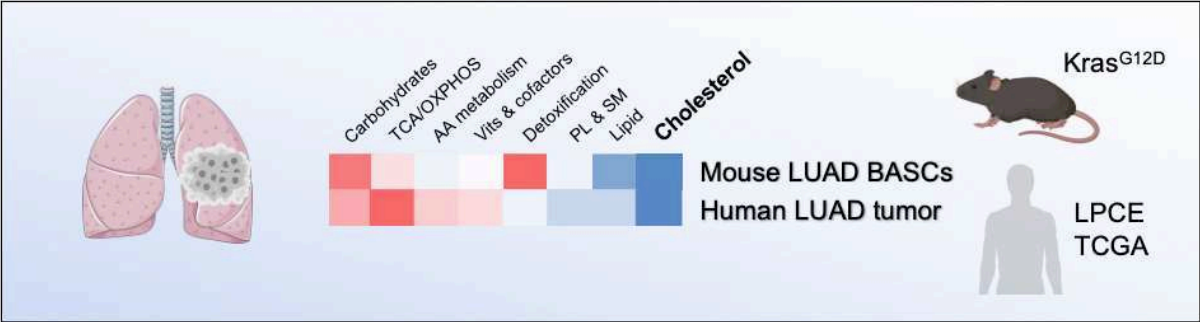
## In brief

Guilbaud et al., show that hijacking the defective cholesterol efflux pathways observed in lung epithelial tumor progenitor cells can transcriptionally reprogram outgrowth, survival instructions and anti-tumor immunity initiated by oncogenic KRAS mutation *in vivo*.

## Highlights

- Impaired cholesterol efflux pathways is a hallmark of lung adenocarcinoma in mice and humans.
- Defective cholesterol efflux pathways in epithelial tumor progenitor cells dominates tumor growth and the transcriptional landscape in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice.
- Overexpression of human apoA-I transgene prevents KRAS-driven lung tumorigenesis by suppressing the proliferation and expansion of epithelial progenitor cells of tumor-origin.
- Cholesterol removal strategy with cyclodextrin inhalation in established tumors showed antitumor activities.

Graphical abstract



## Introduction

Advances in cancer metabolism research over the last decades have extended the original observation that most tumor cells rely on glucose and glutamine catabolism to sustain the energetic and biosynthetic demands of uncontrolled proliferation (Zhu and Thompson, 2019; Hirschev *et al.*, 2015; DeBerardinis and Chandel, 2016). Cancer metabolic reprogramming in an *in vivo* setting is a complex phenomenon that depends on intrinsic tumor properties (driver mutation, tissue of origin, stage) and on constraints imposed by its microenvironment (Yuneva *et al.*, 2012). Recent evidence highlights a metabolic competition between tumor and immune cells that creates an immunosuppressive/tolerogenic tumor microenvironment (TME). This includes a glucose steal mechanism by tumor cells (Chang *et al.*, 2015) or the generation of pro-tolerogenic metabolites such as lactate (Colegio *et al.*, 2014) or hyaluronic acid (Goossens *et al.*, 2019). This global reprogramming enables tumor cells to carry outgrowth and survival instructions initiated by oncogenic mutations. Thus, gaining a better understanding of the nature of nutrient utilization by cancer cells and the metabolic routes used to sustain tumor growth is important, as it will provide insights into the mechanisms of spontaneously arising tumors.

Lung cancer is a leading cause of cancer mortality worldwide, with non-small cell lung cancer (NSCLC) representing almost 85% of all cases. It is estimated to kill 1.7 million people worldwide per year (more than 19% of the total cancer deaths) (Siegel *et al.*, 2018). In the absence of early warning signs, patients with localized lung cancer can be cured by surgical resection. However, most of the patients are diagnosed with late-stage lung cancer with poor prognosis and clinical outcome, pressing the need to identify early biomarkers. Activating mutations of the proto-oncogene KRAS (V-KI-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) occur in ~30% of NSCLC cases (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011) and cultured mutant KRAS-driven tumor cells have specific metabolic consequences *in vitro* (White, 2013). While increased aerobic glycolysis with glucose-to-lactate conversion (Warburg effect) is a common feature of KRAS mutant cells, preclinical studies assessing early metabolic alterations in KRAS-driven lung tumorigenesis remain sparse. While the group of DeBerardinis recently showed evidences for oxidation of multiple nutrients within and between lung tumors (Hensley *et al.*, 2016), the group of Vander Heiden showed that KRAS-driven lung tumors in rodents are less dependent on glutamine metabolism than culture cells (Davidson *et al.*, 2016). Nevertheless, dietary control exerts a robust anti-tumor effect in the same mouse model of KRAS-driven lung cancer, indicating that this type of tumor is sensitive to metabolic changes (Ramadori *et al.*, 2015).

A meta-analysis of randomized controlled trials of lipid-altering therapies with 625,000 patients and >8,000 incident cancers revealed that a 10-mg/dL increase in the plasma high-density lipoproteins (HDL)-cholesterol level was associated with a 36% lowered risk of cancer incidence (Jafri *et al.*, 2010). However, the role for HDL-C in cancer development remains elusive, especially the link between its cholesterol efflux capacity and the control of tumor growth (Pirro *et al.*, 2018). The ability of HDL and its major apolipoprotein A-I (apo-AI) to promote the efflux of cholesterol from cells depends in part on the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1, but can also occur through scavenger receptor B1 (SR-BI) or passive efflux pathways (Tall and Yvan-Charvet, 2015). While raising HDL-C levels in syngeneic and xenogeneic mouse models of cancer metastasis limited tumor growth (Su *et al.*, 2010; Zamanian-Daryoush *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2012), increased cholesterol efflux pathways in tumor-associated macrophages (TAMs) rather generated a pro-tolerogenic TME (Sag *et al.*, 2015; Zamanian-Daryoush *et al.*, 2017; Goossens *et al.*, 2019). The reason of this discrepancy remains to be clarified but could highlight the limitation of the syngeneic and xenogeneic tumor models that do not take into account the diversity of TAMs in their specific tissue environment or the lack of understanding in the metabolic dialogue between tumor and immune cells (Shalapour and Karin, 2019; Guilbaud *et al.*, 2019).

To evaluate if cholesterol efflux pathways interfere with KRAS-driven lung tumorigenesis and unmask key cancer vulnerabilities, we used a model of lung adenocarcinoma development induced by specific expression of oncogenic KRAS mutation in

the lung (DuPage *et al.*, 2009). We made the unexpected observation that defective cholesterol efflux pathways in macrophages had only a mild pro-tolerogenic role in a mouse model of early NSCLC. We rather unravel the first *in vivo* evidence that defective cholesterol efflux pathways in epithelial tumor progenitor cells is a culprit of early NSCLC lesion development. Using the multiplexed capabilities of flow cytometry and single cell transcriptomics, we identify that defective cholesterol efflux pathways in epithelial tumor progenitor cells enable outgrowth and survival instructions initiated by oncogenic KRAS mutation and compromise anti-tumor immunity *in vivo*. Cholesterol removal strategies from the onset or in established tumors suppressed the proliferation and expansion of epithelial progenitor cells of tumor-origin. Finally, we have used topology of transcriptional regulatory networks to connect perturbed cholesterol efflux pathways in human lung adenocarcinoma to systemic reduced HDL-mediated cholesterol efflux capacity. These experiments collectively indicate a novel anti-tumorigenic role of cholesterol efflux pathways in lung cancer that could be envisioned as a novel checkpoint blockade therapy on tumor progenitor cells.

## Results

**Reduced cholesterol efflux pathways is part of the global metabolic rewiring of tumors from KRAS-mutant mice of non-small cell lung cancer.** To examine the phenotypic, transcriptomic and metabolic diversity of lung tumor cells, we generated single cell transcriptomics (scRNAseq) from tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> (LR) mice bred with the epithelial-specific cell secretory protein (CCSP)-CreER<sup>TM/+</sup> mouse model (CC-LR) (DuPage *et al.*, 2009) (Fig. 1A). Whole lung tissue from control and CC-LR mice was enzymatically digested and scRNA-seq libraries were prepared. After sequencing, we detected up to 1,638 different genes with approximately 60,000 sequencing reads per cell (data not shown) and applied unbiased clustering on 7,247 cells in the merged dataset. To group cells with similar gene expression, we applied an unsupervised cluster detection algorithm (SEURAT3) and detected 17 distinct cell clusters (Fig. 1A and 1B). Gene expression data from cells extracted from all conditions were aligned and projected in a 2-dimensional space through t-stochastic neighbor embedding (t-SNE) to allow identification of isolated lung cell populations (Fig. 1A). Gene expression patterns allowed us to align putative biological identities to each cluster (Fig. 1B). We observed both immune and nonimmune cell clusters based on established canonical markers of leukocytes (*Cd45*), endothelial cells (*Cd31*) and pulmonary epithelial cells (*Wfdc2*) (Fig. 1C). The immune cell cluster included 9 populations (macrophages, two distinct monocytes, DCs, neutrophil/eosinophils, mast cells, NK-cells, B-cells and T-cells) (Fig. 1A and 1B). Macrophages characterized by canonical *Mertk* and *Mrc1* expression were the dominant immune cell type (Fig. S1A, left panel). The use of *Trem2* and *Lipa* markers confirmed the presence of a distinct metabolically active macrophage subset (Wu *et al.*, 2015) that expanded in the lung of CC-LR mice (Fig. S1A, right panel). Consistently, gene set enrichment analysis (GSEA) of the differentially expressed genes between control and CC-LR macrophages revealed an upregulation of several genes involved in metabolism (i.e. 'mitochondria and lipid metabolism') along with genes related to 'intracellular trafficking' and downregulation of genes involved in anti-tumoral signatures such as 'response to oxygen or cytokine' or 'cell differentiation and motility' (Fig. S1B). Among endothelial cells, we retrieved the two major subsets of general and aerocyte capillary cells (Fig. S1C). We also identified two clusters of multiciliated and bronchiolo-alveolar type II (AT2)-rich epithelial cells (Fig. 1A and Fig. S1D, upper panel). The first cluster expressed *FoxJ1* and *Cd24a* (Fig. 1B) and these ciliated cells have previously been described with no colony-forming capacity (McQualter *et al.*, 2010), suggesting there were not at the origin of the tumor. In contrast, the second cluster co-expressed the secretoglobulin family 1A member 1 (*Scgb1a1*, also known as CCSP) and the surfactant protein C (*Sftpc*, referred as SP-C) identifying the pulmonary stem cell population, previously termed bronchioalveolar stem cells (BASCs) (Kim *et al.*, 2005). Hence, this cluster is called 'epithelial enriched in BASCs' (BASC-rich Epi). The cellular origin of lung adenocarcinoma is still subject of debate but could originate from the transformation of BASCs that are located at the bronchoalveolar duct junction (BADJ) in mice bearing the *KRAS*<sup>G12D</sup> oncogene (Desai *et al.*, 2014; Treutlein *et al.*, 2014) (Fig. S1E). Of note, by crossing CC-LR mice with *Rosa26*<sup>LSL-EYFP</sup> reporter mice, we observed that expression of the EYFP, under the control of the CCSP promoter, expanded over lung tumor development in CD31<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup> epithelial stem/progenitor cells (McQualter *et al.*, 2010), indicating that these cells are most likely at the origin of the tumor (Fig. S1F). We next sought to unravel the phenotype of this BASC-rich Epi cluster by analyzing the specific expression patterns differentiating control and CC-LR mice. GSEA of the differentially expressed genes identified 'survival and metabolic processes' as GO terms as the most enriched terms for genes that were upregulated in BASC-rich Epi cluster from the lung of CC-LR mice, while cell dynamics (i.e. 'Adhesion, extracellular matrix and morphogenesis') were enriched for downregulated genes (Fig. S1G). The metabolic diversity highlighted by the GSEA analysis of macrophage and BASC-rich Epi clusters was also illustrated by their metabolic enrichment signature (Fig. S1D, lower panel). Deeper analysis highlighted an inverse enrichment of genes involved in carbohydrate metabolism between macrophages and BASC-rich Epi clusters in the lung of CC-LR mice

compared to normal lungs while a general decrease in lipid and cholesterol metabolism KEGG pathways was observed in both cell populations (Fig. 1D).

To explore the predictive reduced cholesterol homeostasis observed in lung tumor cell types, we next investigated how lung tumor handles cholesterol 24 hours after [<sup>3</sup>H] cholesterol inhalation in CC-LR mice (Fig. 1E). We found higher [<sup>3</sup>H] cholesterol accumulation and retention in the lung of these animals 6 weeks after initiating lung cancer development as compared to tumor-free controls (Fig. 1E and S1H). Phosphoimaging indicated that [<sup>3</sup>H] cholesterol accumulated within tumors (Fig. 1E, upper panel). This local cholesterol retention was associated with a systemic perturbation of cholesterol homeostasis as evidenced by the progressive decrease in plasma HDL-cholesterol (HDL-C) levels in tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice at 4 and 9 weeks after lung cancer initiation (Fig. S1I), indicative of impaired cholesterol efflux pathways (Rosenson *et al.*, 2012). We also observed reduced mRNA expression of two cholesterol efflux transporters *Abca1* and *Abcg1* in the lung of these mice (Fig. S1J). To pinpoint the cellular origin of this accumulation, BODIPY (bore-dipyromethene)-neutral lipid staining was quantified by flow cytometry in alveolar macrophages (AMs) and interstitial macrophages (IMs) or in CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> ciliated and CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> epithelial progenitor cells from CC-LR mice (McQualter *et al.*, 2010) (Fig. 1F). Low neutral lipid staining was observed in IMs with no difference between genotypes (Fig. 1F). In contrast, higher neutral lipid accumulation was observed in AMs and both epithelial cells from CC-LR mice (Fig. 1F). Thus, we next took advantage of the scRNAseq to investigate the specific expression of cholesterol efflux or influx transporters. Apart from the main active cholesterol efflux pathway involving ABCA1 and ABCG1-mediated unidirectional efflux, there is also SR-BI (*Scarb1*)-mediated bidirectional cholesterol flux that opposes CD36-mediated lipid influx (Tall and Yvan-Charvet, 2015). We observed that both macrophages and BASC-rich Epi cells from the lung of CC-LR mice exhibited lower *Abca1* and *Abcg1* expression but similar *Scarb1* and higher *Cd36* expression (Fig. 1G and S1K). Thus, both macrophages and BASC-rich Epi cells showed transcriptional perturbation of cholesterol efflux pathways in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice. Altogether, these findings reveal that impaired HDL-mediated cholesterol efflux pathways are causally linked to the development of adenocarcinoma in *Kras*-driven mice lung tumors.

**Defective ABCA1 and ABCG1 but not SR-BI dependent cholesterol efflux pathways in macrophages promotes a mild pro-tolerogenic tumor microenvironment in KRAS-driven non-small cell lung cancer.** Several studies have suggested a pro-tumoral role of cholesterol efflux pathways in tumor-associated macrophages (TAMs) from orthotopic or ectopic mouse models of cancer (Sag *et al.*, 2015; Zamanian-Daryoush *et al.*, 2017; Goossens *et al.*, 2019). Thus, to delineate the role of macrophage cholesterol efflux pathways in the non-metastatic mouse models of lung-tumor bearing *KRAS*<sup>G12D</sup> mutation, we first investigated the role of SR-BI by carrying out bone marrow (BM) transplantation from mice with SR-BI deficiency (*LyzM-Cre* x *Scarb1*<sup>fl/fl</sup> mice, referred as MΦ<sup>SRBI</sup>) (Galle-Treger *et al.*, 2019) (Fig. S2A). To interpret the potential role of SR-BI-mediated bidirectional cholesterol flux, we compared MΦ<sup>SRBI</sup> mice to mice with defective macrophage CD36-mediated unidirectional lipid influx pathway (*LyzM-Cre* x *Cd36*<sup>fl/fl</sup> mice, referred as MΦ<sup>CD36</sup>) (Son *et al.*, 2018). After BM transplantation from these mice into irradiated CC-LR recipient mice and a recovery period of four weeks, tumor initiation was induced by CreER<sup>TM</sup> tamoxifen induction (Fig. S2A). Peripheral hematologic parameters and plasma HDL-C levels were not affected in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice transplanted with MΦ<sup>SRBI</sup>BM compared to control or MΦ<sup>CD36</sup>BM transplanted mice (Table S1). In contrast to CD36 deficiency, knockdown of SR-BI did not alter neutral lipid accumulation in AMs or IMs (Fig. S2B and S2C). Consistent with the lack of effect of SR-BI deficiency on lung macrophage cholesterol homeostasis, we also did not observe significant changes in lung or bronchoalveolar lavage (BAL) cholesterol levels nor in surfactant composition as measured by similar amount of surfactant protein D (SP-D) or phosphatidylcholine (PC) levels in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice transplanted with MΦ<sup>SRBI</sup>BM compared to control or MΦ<sup>CD36</sup>BM transplanted mice (Table S1). In contrast to

CD36 deficiency, there was also no significant perturbation in the number of AMs in M $\Phi$ <sup>SRBI</sup>BM transplanted animals or in different myeloid populations (**Fig. S2D to S2F**). Consequently, the tumor analysis revealed that while macrophage CD36 deficiency limited tumor development (**Fig. S2G**), SR-BI did not (**Fig. S2H**). These findings suggest that in contrast to CD36, SR-BI-mediated bidirectional macrophage cholesterol flux is dispensable to modulate the tumor microenvironment (TME).

We next carried out BM transplantation from mice with combined deficiencies of cholesterol efflux transporters ABCA1 and ABCG1 in myeloid cells (LyzM-Cre x *Abca1<sup>fl/fl</sup>Abcg1<sup>fl/fl</sup>* mice, referred as M $\Phi$ <sup>DKO</sup>) ([Westerterp et al., 2013](#)) into irradiated CC-LR recipient mice (**Fig. 2A**). After a recovery period of four weeks, tumor development was initiated by CreER<sup>TM</sup> tamoxifen induction (**Fig. 2A**). Peripheral hematologic parameters were overall unaffected in CC-LR mice transplanted with M $\Phi$ <sup>DKO</sup>BM and similar plasma HDL-C and SP-D levels were observed (**Table S2**). In contrast, higher neutral lipid accumulation was observed in AMs from CC-LR mice transplanted with M $\Phi$ <sup>DKO</sup>BM (**Fig. 2B**). This cholesterol loading was ultimately linked to the disappearance of AMs in the lung of these mice (**Fig. 2C**). Thus, we investigated whether this could influence lung cholesterol homeostasis, surfactant clearance or lung inflammation. We did not observe significant changes in lung or BAL cholesterol levels nor in SP-D or PC levels in CC-LR mice transplanted with M $\Phi$ <sup>DKO</sup>BM (**Table S2**). However, we observed a strong pro-inflammatory environment in the lung of these animals as characterized by an increased number of CD206<sup>-</sup>SiglecF<sup>+</sup> eosinophils, CD11b<sup>hi</sup> PMNs and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (**Fig. 2C**). Consequently, the tumor analysis showed that despite similar size and amount of tumor nodules, there was an abnormal hyperplasia in CC-LR mice with defective macrophage cholesterol efflux pathways (**Fig. 2D**). Higher E-cadherin (CDH1) over vimentin immunostaining in CC-LR mice transplanted with M $\Phi$ <sup>DKO</sup>BM (**Fig. 2E**) also suggested more differentiated epithelial cells independently of mesenchymal transition. Thus, defective macrophage cholesterol efflux pathways shape a mild pro-tolerogenic TME in the KRAS<sup>G12D</sup>-driven lung tumor progression phase.

### **Defective ABCA1 and ABCG1 cholesterol efflux pathways in epithelial tumor progenitor cells exacerbates tumor growth in KRAS-driven non-small cell lung cancer.**

Accumulation of cholesterol in the lung of a mouse model of whole body cholesterol homeostasis perturbation induced by liver X receptor (LXR) deficiency had been previously associated to spontaneous lung cancer development ([Dai et al., 2016](#)). Thus, we first generated epithelial-specific ABCA1/ABCG1 knockouts by breeding CCSP-CreER<sup>TM</sup> mice with *Abca1<sup>fl/fl</sup>Abcg1<sup>fl/fl</sup>* mice (referred as CC and CC<sup>DKO</sup>, respectively). We did not observe spontaneous lesion development (**Fig. S3A**) or inflammatory infiltrate (**Fig. S3B**) at 7 months of age. Then, to test whether defective cholesterol efflux pathways increased tumorigenesis in Kras-driven cancers, CCSP-CreER<sup>TM</sup>*Kras<sup>LSL-G12D</sup>* mice were crossed to *Abca1<sup>fl/fl</sup>Abcg1<sup>fl/fl</sup>* mice, generating a conditional epithelial tumor-specific ABCA1/ABCG1 deficiency (referred as CC-LR and CC-LR<sup>DKO</sup>, respectively) (**Fig. 3A**). Quantification of BODIPY staining revealed that deficiency of these transporters exacerbated the neutral lipid accumulation observed in ciliated and BASC-rich Epi cells from lung-tumor bearing *Kras<sup>G12D</sup>* mice (**Fig. 3B**). In contrast, similar BODIPY staining was observed between macrophages from CC-LR and CC-LR<sup>DKO</sup> mice (**Fig. 3B**). We next further characterized the tumor growth in absence of cholesterol efflux pathways in epithelial tumor progenitor cells. Although similar amount of tumor nodules or hyperplasia was observed in CC-LR<sup>DKO</sup> mice compared to CC-LR mice, the size of the lesion was significantly increased (**Fig. 3C**). CCSP and SP-C co-staining suggested an expansion of BASCs in the lung of CC-LR<sup>DKO</sup> compared to CC-LR mice (**Fig. 3D, upper panel**). Consistently, scRNAseq performed on whole lung tissue from CC-LR<sup>DKO</sup> mice (**Fig. S3C**) indicated an increased number of epithelial progenitor cells expressing *Sftpc* (**Fig. 3D, lower panel**). Quantification of CD45<sup>-</sup> nonimmune cell clusters confirmed that defective cholesterol efflux promoted an increase in the percentage of BASC-rich Epi cluster at the expense of endothelial cells (**Fig. 3E**). A trend towards higher CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> BASC-rich Epi cells was also observed by flow cytometry in the lung of CC-LR<sup>DKO</sup> mice compared to CC-LR mice (**Fig.**

**S3D**). A higher and more diffuse CDH1 immunostaining in CC-LR<sup>DKO</sup> mice further supported an expansion of epithelial cells (**Fig. S3E**). GSEA of the differentially expressed genes revealed that the deficiency of cholesterol efflux pathways in CC-LR mice induced higher expression in various genes assigned to 'cell signaling' and 'energy metabolism', which could partly explain the expansion of these cells (**Fig. 3F**). Notably, these cells showed a gene signature that was higher for EGF signaling but not for pre-metastatic markers (**Fig. S3F**). Additionally, lower expression of genes involved in 'cellular dynamics' was observed in the epithelial tumor progenitor cell cluster from CC-LR<sup>DKO</sup> mice, suggesting tumor cells could perturb the TME (**Fig. 3F**). Thus, defective cholesterol efflux pathways in tumor progenitor cells promote their expansion and modulate their transcriptomic signature.

Quantification of CD45<sup>+</sup> immune cell clusters in the scRNAseq analysis revealed an imbalance in the percentage between the macrophage and the myeloid cell, especially monocyte, clusters (**Fig. 3G**). We confirmed that deficiency of cholesterol efflux pathway in tumor progenitor cells limited the expansion of infiltrated myeloid cells (i.e, eosinophils, Mos and PMNs) by flow cytometry (**Fig. 3H**), which most likely reflect a pro-tolerogenic TME. Interestingly, defective cholesterol efflux pathways in epithelial tumor progenitor cells strongly affected the transcriptomic signature of macrophages with an upregulation of genes involved in 'intracellular trafficking' and 'translation initiation' and a downregulation of genes related to apoptotic process' and 'cytokine response and secretion' (**Fig. 3I**). Of note, transplantation of M $\Phi$ <sup>DKO</sup>BM into CC-LR<sup>DKO</sup> mice (**Fig. S3G**), to test the synergy of defective cholesterol efflux pathways in these cell types, showed that despite the expected loss of AMs and higher myeloid cell infiltrates (**Fig. S3H**), there was no additive effect in tumor progression (**Fig. S3I**). Thus, defective cholesterol efflux pathways in epithelial tumor progenitor cells dominates tumor growth in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice. Inversely, reactivation of anti-tumor activity in CC-LR<sup>DKO</sup> mice with PD-1 blockade antibody (**Fig. S3J and S3K**) prevented the exacerbated tumor growth of these mice (**Fig. S3L**), supporting the concept that impaired cancer cell cholesterol efflux is part of the tumor strategy to escape immune surveillance. Altogether, these findings highlight the mechanism by which defective cholesterol efflux pathways in epithelial tumor progenitor cells promote a progression of the lesion size associated with an expansion of epithelial cancer cells that diverts the immune TME.

**ApoA-I overexpression protects mice from mutant KRAS-driven non-small cell lung cancer by limiting the expansion of epithelial progenitor cells of tumor-origin.** Since defective cholesterol efflux participates to tumor growth, we next explored the effect of human apoA-I overexpression to increase HDL levels in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice (**Fig. 4A and Table S3**). We first observed that apoA-I transgenic animals (LR/apoAI-Tg) survived longer compared to lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice (LR) (**Fig. S4A**). This was accompanied by prevention of metabolic alterations induced by lung tumor development including body weight loss (**Fig. S4B**) and epididymal fat mass atrophy (**Fig. S4C**). However, in absence of metastasis in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice, we did not observe significant changes in systemic inflammatory or hematological parameters (Cortez-Retamozo *et al.*, 2013) in presence or absence of the apoA-I transgene (**Table S3**), indicating these mechanisms were unlikely involved in the global beneficial effects of the apoA-I transgene. Pneumotachographs generated by spirometry rather indicated a direct link between increased apoA-I and HDL-C levels and the breathing rate (i.e, amount of volume and debit of air that can inhaled and exhaled) of lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice (**Fig. S4D**). Histological analysis with Hematoxylin and Eosin (H&E) stain and 3-dimensional reconstruction microscopy with CCSP and DAPI stains revealed that tumor progression was indeed significantly blunted by the apoA-I transgene 8 weeks after tumor induction (**Fig. 4B and S4E**) with a strong reduction in all histological subtypes (i.e, adenocarcinoma, adenoma, atypical adenomatous hyperplasia (AAH) and squamous dysplasia) (**Fig. 4C**). The underlying mechanism most likely involved the removal of excess tumor cholesterol as accumulation of cholesterol in the lung of tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice was prevented by the raise in plasma HDL-C levels induced by overexpression of the human apoA-I transgene (**Fig. 4D**). Altogether, these findings reveal

that HDL-mediated cholesterol efflux plays a preventing role in lung tumor development and long-term pathologic consequences.

We further investigated the relation of epithelial tumor progenitor cell expansion to HDL-mediated cholesterol efflux. Quantification of BASC-rich Epi and ciliated cells by flow cytometry revealed reduced numbers of these cells in the lung of LR-ApoAI<sup>T9</sup> compared to LR mice (**Fig. 4E**). Consistently, overexpression of the human apoA-I transgene in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice suppressed BASC expansion as shown by CCSP and SP-C co-staining (**Fig. S4F**). Colony-forming assays confirmed that the expansion of epithelial colony-forming units (eCFUs) from the lung of mice bearing the *KRAS*<sup>G12D</sup> oncogene was almost blunted by the *in vivo* overexpression of the human apoA-I transgene (**Fig. S4G**). Using Rosa26<sup>LSL-EYFP</sup> reporter mice crossed with LR and LR-ApoAI<sup>T9</sup> mice, we also observed reduced expansion of CD31<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>EYFP<sup>+</sup> epithelial progenitor cells of tumor origin (**Fig. S4H**). The prevention of epithelial tumor progenitor cell expansion paralleled a significant decrease in the SG2M cycling fraction in CD31<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> BASC-rich Epi cells from LR-ApoAI<sup>T9</sup> compared to LR mice (**Fig. 4F**) along with reduced levels of pErk1/2 (**Fig. 4G**). We also observed a significant decrease in Ki67-positive proliferative cells in the lung of these mice that paralleled a decrease in the LC3 autophagy marker (Rao *et al.*, 2014) (**Fig. S4F**). Exogenous addition of different concentrations of HDL or methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), which mediates cholesterol efflux from plasma membrane (Atger *et al.*, 1997), markedly reduced the number of eCFUs from controls or mice bearing the *KRAS*<sup>G12D</sup> oncogene (**Fig. 4H**). Consistent with the enhanced EGF signature in the epithelial progenitor cell cluster from CC-LR<sup>DKO</sup> mice (**Fig. S3F**), we found that HDL also reversed the *KRAS*<sup>G12D</sup>-dependent EGFR autocrine loop (Oda *et al.*, 2005) (**Fig. S4I**). The expression of cholesterol efflux transporters is heterogenous among lung cancer lines (**Fig. S4J**) but a tumor-derived cell line from *Kras*<sup>G12D</sup> mice has been previously generated harboring a strong sensitivity to metabolic changes recapitulating the *in vivo* setting (Guo *et al.*, 2013). Treatment of these cells with HDL reduced BODIPY neutral lipid staining and levels of pErk1/2 and prevented their clonogenic survival in nutrient-poor or -rich growth media (**Fig. S4K**). Altogether, these findings indicate that HDL-mediated cholesterol efflux cause an anti-tumoral effect by preventing the cell intrinsic expansion of epithelial progenitor cells of tumor-origin.

**Cholesterol removal prevents progressing tumor in KRAS-driven non-small cell lung cancer.** We next reasoned that therapeutic modulation of cholesterol efflux pathways could be beneficial in established tumors induced for 6 weeks in CC-LR mice. Then, animals were first exposed to liver X receptor (LXR) activator (T0901217; 50mg/kg twice a week) to promote transcriptional activation of cholesterol efflux pathways (**Fig. S5A**) (Tall and Yvan-Charvet, 2015). After 4 weeks of inhalation exposure, microscopic examination of the lung (**Fig. S5B**), revealed that LXR activator treatment had no effect on tumor development (**Fig. S5C**) despite partially limiting myeloid cell infiltrates (**Fig. S5D**). This could be partially explained by the lack of cell intrinsic effect of LXR on epithelial progenitor expansion isolated from CC-LR mice (**Fig. S5E**). This contrasted with the effect of M $\beta$ CD that specifically remove plasma membrane cholesterol (**Fig. 4H**). Thus, we next exposed mice with established tumors to M $\beta$ CD (4g/kg once a week) (**Fig. 5A**). After 4 weeks of inhalation exposure, microscopic examination of the lung (**Fig. 5B**), revealed that despite similar size and hyperplasia of tumor nodules, M $\beta$ CD treatment limited the number of nodules in progressing tumors (**Fig. 5C**) without impacting the myeloid infiltrate (**Fig. S5F**). Activation of antitumor activity with PD-1 blockade antibody in M $\beta$ CD-treated CC-LR mice (**Fig. S5G**) repressed hyperplasia but had not significant benefit on lesion size and tumor number (**Fig. S5H**) most likely because cholesterol removal therapy directly impacted the expansion of epithelial progenitor cells of tumor-origin. Thus, to delineate whether M $\beta$ CD treatment directly limited the expansion of epithelial progenitor cells of tumor-origin, we repeated a similar experiment taking advantage of CC-LR Rosa26<sup>LSL-EYFP</sup> reporter mice. We first confirmed that M $\beta$ CD treatment limited the progression of tumor nodules at 4 and 6 weeks after inhalation exposure (**Fig. 5D and 5E**). These observations paralleled reduced numbers of CD31<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>EYFP<sup>+</sup> cells in M $\beta$ CD-treated CC-LR mice

compared to saline nailling down that M $\beta$ CD treatment prevented the expansion of epithelial progenitor cells of tumor-origin (**Fig. 5F**). Altogether, our findings indicate that cholesterol removal therapy reduces tumor burden in progressing lung tumor from mice bearing the Kras<sup>G12D</sup> oncogene.

**Systemic and local perturbations of cholesterol efflux pathways in human lung adenocarcinoma.** To investigate the translational value of our findings, we first evaluated the systemic modulation of cholesterol efflux pathways by measuring plasma HDL-C levels in twenty-two patients with different stage of lung adenocarcinoma from the LPCE biobank compared to ten patients without lung adenocarcinoma (healthy volunteers and patients with chronic obstructive pulmonary disease, COPD) (**Table S4**). Plasma concentrations of HDL-C were lower by approximately 25% compared to controls (**Fig. 6A**). The ability of these HDL-C to mediate cholesterol efflux was also decrease by approximately 20% in patients with lung adenocarcinoma (**Table S4**), correlating with plasma HDL-C levels (**Fig. 6B**). These HDL were not dysfunctional as similar cholesterol efflux was observed when HDL levels were matched by concentration (**Table S4**). In lung adenocarcinoma patients, plasma HDL-PC and apoA-I levels were also reduced by ~25% and 50%, respectively, confirming reduced number of HDL particles (**Table S4**). Finally, we evaluated whether this decrease could be linked to other lung cancer biomarkers such as surfactant molecules, fibrinogen or a chronic inflammatory status. In this cohort, SP-B, SP-D, fibrinogen and angiotensin II (AngII) levels were similar within patient with or without lung adenocarcinoma (**Table S4**). Although plasma tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) levels were statistically increased in patients with lung adenocarcinoma (**Table S4**), there was no correlation with plasma HDL-C levels (**Fig. 6C**). This indicates that HDL is not merely a classical inflammatory biomarker.

To predict local perturbations in cholesterol efflux pathways, we performed a metabolic pathway enrichment analysis from RNAseq performed on fifty-seven lung adenocarcinoma specimens and eleven normal lung tissues ([Leon et al., 2019](#)). We first showed that 32% of metabolic transcripts were significantly modulated (i.e., 286 transcripts were increased and 286 were decreased) in stage I/II lung adenocarcinoma (**Fig.6D**). We next validated our approach by showing an enrichment of upregulated transcripts in carbohydrate metabolism, TCA cycle, oxidative phosphorylation (OXPHOS) and amino acid (AA) metabolism from KEGG pathways (**Fig. 6E**), consistent with the Warburg effect of tumors ([Zhu and Thompson, 2019](#); [Hirschey et al., 2015](#); [DeBerardinis and Chandel, 2016](#)). In contrast, lung adenocarcinoma metabolic signature showed down-regulation of transcripts involved in phospholipid (PL), sphingolipid (SM) and lipid metabolism with cholesterol pathway showing the greatest number of disrupted transcripts (**Fig. 6E**). To validate these findings in a larger cohort (i.e., 399 patients), we interrogated the publicly available cancer genome atlas (TCGA) gene expression dataset (**Fig.6D**). The transcriptomic analysis confirmed that up- and down-regulated transcripts recapitulated the same metabolic pathway enrichment signature (**Fig. 6D**). Venn diagram highlighted a core signature of cholesterol metabolism genes that was commonly regulated between the two independent cohorts (**Fig. 6F**). Thus, cholesterol-associated transcripts were the most down-regulated in lung adenocarcinoma. Topological analyses using CoMBI-T profiling ([Jha et al., 2015](#)) further illustrated how the cholesterol metabolism module was connected to the global metabolic transcriptome signature (**Fig. S6A**). Mapping regulation of cholesterol-associated transcripts at the cellular level highlighted an enrichment of down-regulated transcripts involved in cellular cholesterol trafficking that ultimately support cholesterol efflux pathway towards apolipoprotein A-I and HDL (**Fig. 6G**). Therefore, cholesterol efflux pathways are systemically and locally perturbed in patients with lung adenocarcinoma highlighting the translational value of our preclinical findings.

## Discussion

Our data support the requirement of cholesterol efflux pathways and HDL raising therapies as a potential metabolic liability of KRAS-driven lung tumor growth that might be exploited for NSCLC therapy. Given that diet-induced obesity and dyslipidemia are linked to tumor growth (Khandekar *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2016), there has been a long interest in the relationship between cholesterol and cancer. A role of cholesterol for tumor growth was first suggested a century ago following cholesterol injection into xenografts (Robertson and Burnett, 1913). However, this concept has been challenged by the lack of consistency in cell-culture studies aimed at understanding the metabolic phenotype of cancer cells, the diversity of cholesterol-related metabolic signature between different types of tumors and the limitation of syngeneic and xenogeneic mouse models of cancer (Kuzu *et al.*, 2016). These observations highlight the need to better understand the cholesterol routes that most likely depend on intrinsic tumor properties to enable tumor growth initiated by oncogenic mutations. Due to the multifaceted protective behavior of HDL-mediated cholesterol efflux in various inflammatory diseases (Tall and Yvan-Charvet, 2015), its association with cancer has regained a strong interest by the scientific community (Pirro *et al.*, 2018). In syngeneic and xenogeneic mouse models of melanoma and ovarian cancer, a protective effect of HDL has been observed on tumor metastasis (Su *et al.*, 2010; Smith and Land, 2012; Zamanian-Daryoush *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2012). However, most of the *in vivo* studies highlight a role of cholesterol efflux pathways in TAMs (Sag *et al.*, 2015; Zamanian-Daryoush *et al.*, 2017; Goossens *et al.*, 2019). Thus, the *in vivo* relevance of cholesterol efflux pathways to lung epithelial cancer cells has not yet been addressed to our knowledge. The metabolic fingerprint of mouse and human lung adenocarcinoma, defined in this study, demonstrates a strong perturbation in cholesterol efflux pathways, compared with nonmalignant lung. This was associated with systemic perturbations in apoA-I and HDL-C levels. Our tritium cholesterol labeling experiment in a mouse model of KRAS-driven lung tumors supports a model in which lung tumors are retaining cholesterol. Consistently, raising HDL levels through overexpression of the human apoA-I transgene or cholesterol removal with M $\beta$ CD resulted in robust inhibition of tumor growth in this biologically relevant model of NSCLC. These results emphasize that lung adenocarcinoma has elevated cholesterol requirements that is highly dependent on HDL-mediated cholesterol efflux.

Tissue-resident macrophages provide a pro-tumorigenic niche to NSCLC cells (Casanova-Acebes *et al.*, 2021) and enhanced production of myeloid cells through extramedullary myelopoiesis has also been shown to enhance cancer growth in mouse models of lung cancer metastasis (Cortez-Retamozo *et al.*, 2013). Thus, we originally hypothesized that the anti-tumorigenic effects of cholesterol efflux pathways could possibly be due to their roles in preventing peripheral extramedullary myelopoiesis or modulating local tissue inflammation (Tall and Yvan-Charvet, 2015). However, non-metastatic lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice did not present any sign of enhanced myeloid cells in the periphery or in the spleen, excluding the involvement of extramedullary myelopoiesis. We next tested the contribution of macrophage cholesterol efflux pathways to limit tumor growth. Deficiency of macrophage ABCA1 and ABCG1 did specifically increase alveolar macrophage cholesterol content, which was associated with a remodeling of the myeloid landscape leading to an abnormal hyperplasia in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice but no major impact on tumor growth. These findings contrasted with prior studies showing that defective cholesterol efflux pathways in TAMs converted tumor promoting into anti-tumor macrophages (Sag *et al.*, 2015; Zamanian-Daryoush *et al.*, 2017; Goossens *et al.*, 2019). However, these previous studies were performed in syngeneic and xenogeneic mouse models of cancer metastasis, which do not take into account the diversity of tissue macrophages in their specific tissue environment that could be multifaceted in lung cancer with pro- and anti-tumoral functions (Shalapour and Karin, 2019; Guilbaud *et al.*, 2019). For instance, AMs have a specific metabolic signature to shape lipid and surfactant homeostasis and maintain lung homeostasis (Fessler, 2017; Blériot *et al.*, 2020). Although, we did not find modulation of surfactant composition in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice with defective cholesterol efflux pathways in macrophages, we and others previously found that ABCA1 and ABCG1 deficiency created a pro-oxidative milieu in

the lung, which could explain the loss of AMs in the present study and the expansion of inflamed myeloid cells (Baldán *et al.*, 2008; Wojcik *et al.*, 2008; Yvan-Charvet *et al.*, 2010). While beyond the scope of the present study, future studies should help to clarify how cholesterol efflux in AMs could limit lung hyperplasia in NSCLC mouse model and whether this may be related to the foamy TREM2<sup>+</sup> macrophage subset that has been previously shown to promote chronic lung diseases (Wu *et al.*, 2015).

In the present study, we found that the tumor-driven immune signature (Lavin *et al.*, 2017) was directly impacted by defective cholesterol efflux pathways in epithelial tumor progenitor cells. Indeed, defective cholesterol efflux in epithelial tumor progenitor cells limited the inflammatory myeloid cell infiltrate favoring tumor to escape from immune surveillance in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice. A cholesterol steal mechanism by ovarian cancer cells through secretion of hyaluronic acid has recently been proposed (Goossens *et al.*, 2019). However, cholesterol accumulated in both epithelial cells and macrophages isolated from the lung of mice bearing the KRAS<sup>G12D</sup> oncogene. The unlikelihood of this scenario in NSCLC mouse model was also illustrated by the barely detectable expression of hyaluronan synthase 2 (*Has2*), the rate-limiting enzyme in hyaluronic acid synthesis, in epithelial cells from our single cell dataset and the absence of changes in pulmonary hyaluronic acid levels between the different genotypes (data not shown). One explanation could be the diversity of tumor origin, oncogenic mutations and tissue context that can differently affect tumor metabolic reprogramming and cellular cholesterol routes (Zhu and Thompson, 2019; Hirschey *et al.*, 2015; DeBerardinis and Chandel, 2016). Single-cell transcriptomic analysis rather identified an alternative scenario by which defective cholesterol efflux pathways in KRAS-driven epithelial tumor progenitor cells could divert the immune response. Indeed, while the upregulation of genes involved in generation of energy, carbohydrates and OXPHOS in CC-LR<sup>DKO</sup> epithelial tumor progenitor cells could reflect a glucose steal mechanism (Chang *et al.*, 2015), the downregulation of genes involved in cytoskeleton organization and cell projection may also indicate reduced interaction with AMs (Westphalen *et al.*, 2014), which altogether could limit their activation. Consistently, the inflammatory transcriptomic signature of AMs was downregulated in CC-LR<sup>DKO</sup> mice most likely dampening the recruitment of inflammatory myeloid cells and favoring tumor to evade immune response.

The classical hallmarks of cancer are intimately intertwined with an assortment of metabolic processes that a tumor cell effectively hijacks to facilitate malignant transformation (Zhu and Thompson, 2019; Hirschey *et al.*, 2015; DeBerardinis and Chandel, 2016). Oncogenic transformation in mutant KRAS cells increases the demand for cholesterol most likely to provide the essential building blocks required to maintain their aberrant survival and growth or to amplify growth-factor receptor signaling such as the EGFR-dependent survival pathway (Gabitova *et al.*, 2014; Mollinedo and Gajate, 2020). However, most of these observations are made from *in vitro* studies using lung cancer lines that are heterogenous. In the present study, single-cell transcriptomic analysis identified in an unbiased manner cholesterol efflux-dependent gene signatures of tumor BASC-rich Epi cells that included an upregulation of genes involved in 'intracellular protein dynamic' including 'EGF signaling'. Despite these signatures and the enhanced tumor growth in CC-LR<sup>DKO</sup> mice, we did not observe significant modulation of transcription factors Nkx2.1 or Runx2 or target genes associated with ECM components suggesting that NSCLC mouse model with defective cholesterol efflux did not transit to a pre-metastatic state (LaFave *et al.*, 2020; Marjanovic *et al.*, 2020). Additionally, we unraveled that overexpression of apoA-I *in vivo* reversed the expansion of tumor BASC-rich Epi cells and their cell cycling, opposing findings observed in CC-LR<sup>DKO</sup> BASC-rich Epi cells. We also show a cell intrinsic role of membrane cholesterol removal in limiting the proliferation and expansion of epithelial progenitor cells of tumor origin, in part by overcoming KRAS<sup>G12D</sup>-dependent EGFR autocrine loop and reducing the LC3 autophagy marker, which is known to facilitate protein recycling and the survival of cancer cells in tumors (Rao *et al.*, 2014). Consistently, the prevention of epithelial tumor progenitor expansion by HDL *in vitro* and *in vivo* paralleled a decrease in phosphor-ERK, a culprit signaling pathway in epithelial tumor cell proliferation.

Our findings aimed at identifying the best therapeutic option to modulate cholesterol efflux pathways are surprising, as they do not support an intuitive model whereby transcriptional activation of cholesterol efflux pathways with a LXR agonist limits the progression of established tumors (Bovenga *et al.*, 2015; Lin and Gustafsson, 2015). Notably, LXR activation had no effect on the expansion of epithelial tumor progenitor cells despite having a role in reducing myeloid infiltrate. Future studies will be required to evaluate the pleiotropic roles of LXR in lung tumor cells and whether the lack of anti-proliferative effect could be attributed to its repression or its ability to promote cell survival depending on the disease context (Bovenga *et al.*, 2015; Lin and Gustafsson, 2015). In strong contrast, removal of plasma membrane cholesterol after M $\beta$ CD inhalation reduced tumor growth after 4 weeks treatment in post-tumor-onset CC-LR mice and revealed some signs of regression after 6 weeks. This effect was dominated by a decrease in the expansion of tumor BASC-rich Epi cells. Our pharmacological data using M $\beta$ CD treatment indicated that cholesterol removal therapy may be a strong candidate in preventing progression of established tumor in the mouse model of NSCLC. While working on this manuscript, Liu *et al.*, showed that inhibition of PCSK9, a new class of cholesterol-lowering drug, cell intrinsically reprogrammed tumor cells to reeducate cytotoxic T cell-mediated killing activity, which consequently potentiated immune checkpoint therapy in syngeneic tumor models (Liu *et al.*, 2020). This offers an elegant alternative therapeutic strategy that will need to be tested in a mouse model of NSCLC. These findings and our data warrant thorough clinical assessment as results on checkpoint blockade therapy in lung cancer patients with KRAS mutation has been questioned (Adderley *et al.*, 2019; Jeanson *et al.*, 2019).

In the clinic, conventional chemotherapy remains the major option to treat patients with KRAS-mutant NSCLC, although chemotherapy plus immune checkpoint blockade or novel oncogenic KRAS inhibition (Skoulidis *et al.*, 2021) has been recently approved as the first-line regimen for NSCLC (Paz-Ares *et al.*, 2018; Socinski *et al.*, 2018). The metabolic fingerprint of mouse and human lung adenocarcinoma now indicates that defective cholesterol efflux is exquisitely intertwined to the metabolic rewiring of epithelial tumor progenitor cells to meet the unique cholesterol requirements for proliferation and expansion. Our preclinical findings also unveil that plasma membrane cholesterol removal with HDL-raising therapies or M $\beta$ CD can overcome this defect to limit tumor growth. Because M $\beta$ CD treatment in humans is safe and can also be nebulized, it may therefore be used clinically as a novel mechanism-based therapy beyond alternative horizons for treating KRAS-mutant lung cancer such KRAS, MEK or autophagy inhibitors.

**Acknowledgments.**

We thank Dr. Frédéric Labret for assistance with flow cytometry, Dr. Véronique Corcelle and her staffs for assistance in animal facilities and Dr. Marie Irondele for assistance with confocal microscopy. GIS-IBISA multi-sites platform Microscopie Imagerie Côte d'Azur (MICA), and particularly the imaging site of C3M (INSERM U1065) is supported by Conseil Régional, Conseil Départemental, and IBISA. The UCAGenomiX platform, a partner of the National Infrastructure France Génomique, is supported by Commissariat aux Grands Investissements (ANR-10-INBS-09-03, ANR-10-INBS-09-02), Conseil Départemental des Alpes Maritimes (2016-294DGADSH-CV), and Canceropôle PACA. This manuscript is in tribute to Franck Yvan.

**Author contributions.**

L.Y.C. conceived the project, designed the experiments. L.Y.C and E.G. wrote the manuscript. E.G. performed most of the molecular, histological, and in vivo experiments. M.I. and P.H. performed most of the histological data analyses and supervised the human related studies. S.I., V.S., N.V., M.A., A.C., and G.R., helped with the experimental design and assisted with data analyses. P.B., K.Z., K.L., V.M., C.B., S.M., E.L.G., B.M., and P.B. provided scientific advised and helped with the experimental design. V.B., I.G. T.H., M.W., and E.L.G. provided supporting materials. L.Y.C. also designed and supervised the study and obtained funding. All of the authors read, edited, and approved the manuscript.

**Declaration of interests.**

The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Sources of funding.**

This work was supported by the Inserm Atip-Avenir program, the European Marie Curie Career Integration Grant (CIG-630926), the Fondation ARC (ARC-R14027AA-RAC14007AAA) and the European Research Council (ERC) consolidator program (ERC2016COG724838) to L.Y.C. M.W. is supported by VIDI grant 917.15.350 and an Aspasia grant from the Netherlands Organization of Sciences (NWO) and a Rosalind Franklin Fellowship from the University of Groningen.



## Material and Methods

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESSOURCE AVAILIBILITY
  - Lead Contact
  - Materials Availability
  - Data and Code Availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Human Samples
  - Mice
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Integrated Network Analyses
  - Laboratory Measurements
  - Plasma HDL Preparation
  - Isotopic Cholesterol Efflux Assay
  - Adenovirus Inhalation
  - Tamoxifen Induction
  - Bone Marrow (BM) Transplantation
  - Spirometry
  - In Vivo Treatment Studies
  - In Vivo [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-Cholesterol Tracing Experiment
  - White Blood Cell Counts
  - Blood Parameters
  - Bronchoalveolar Lavage (BAL)
  - ELISA and Colorimetric Measurements
  - Adipose Tissue Cellularity
  - Histopathology and Tumors Quantification
  - Immunostainings
  - Tissue Clearing and 3D-Recontrusction Microscopy
  - Single-Cell RNA-Seq Data Analysis
  - In Vivo Flow Cytometry Analysis
  - Antibodies
  - Colony-Forming Assay
  - InCuCyte Proliferation Assay
  - Real Time qPCR
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

### KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit	ThermoFisher	A21206 RRID:AB_2535792
Alexa Fluor 594 chicken anti-goat	ThermoFisher	A21468 RRID:AB_141859
Alexa Fluor 594 donkey anti-chicken	Jackson ImmunoResearch	703-586-155 RRID:AB_2340378
Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse	Jackson ImmunoResearch	715-586-150 RRID:AB_2340857
Alexa Fluor 594 donkey anti-rat	Jackson ImmunoResearch	712-586-150 RRID:AB_2340690
Anti-CCSP (Clone S-20)	Santa Cruz	sc9773 RRID:AB_2183391

Anti-E-cadherin (Clone 24E10)	Cell signaling	3195 RRID:AB_2291471
Anti-fibronectin	BD Biosciences	610077 RRID:AB_2105706
Anti-Ki-67 (Clone SolA15)	ThermoFisher	14-5698-82 RRID:AB_10854564
Anti-LC3A/B (Clone D3U4C)	Cell signaling	12741 RRID:AB_2617131
Anti-mouse PD-1 (Clone RMP1-14)	BioXCell	BE0146 RRID:AB_10949053
Anti-SP-C	Abcam	ab40879 RRID:AB_777473
Anti-vimentin	Novus Biologicals	NB300-223 RRID:AB_10003206
B220 Fitc (Clone RA3-6B2)	eBioscience	11-0452-85 RRID:AB_465055
CD115 PE (Clone AFS98)	eBioscience	12-1152-82 RRID:AB_465808
CD11b BV510 (Clone M1/70)	BioLegend	101263 RRID:AB_2629529
CD11c PE/Cy7 (Clone N418)	BioLegend	117317 RRID:AB_493569
CD206 PerCP/Cy5.5 (clone C068C2)	BioLegend	141715 RRID:AB_2561991
CD24 PB (Clone M1/69)	BioLegend	101819 RRID:AB_572010
CD31 PerCP/Cy5.5 (Clone 390)	BioLegend	102420 RRID:AB_10613644
CD36 PE/Cy7 (Clone HM36)	BioLegend	102615 RRID:AB_2566121
CD44 PE/Cy7 (Clone IM7)	BioLegend	103029 RRID:AB_830786
CD45 APC/Cy7 (Clone 30-F11)	BD Biosciences	557659 RRID:AB_396774
CD62L APC (Clone MEL-14)	eBioscience	17-0621-82 RRID:AB_469410
CD64 BV421 (Clone X54-5/7.1)	BD Biosciences	139309 RRID:AB_2562694
CD8a BV510 (Clone 53-6.7)	BioLegend	100751 RRID:AB_2561389
CTLA-4 CD152 PerCP/Cy5.5 (Clone UC10-4B6)	BioLegend	106315 RRID:AB_2564473
EpCAM PE (Clone G8.8)	BioLegend	118206 RRID:AB_1134172
Gr-1 PerCP/Cy5.5 (Clone RB6-8C5)	BD Biosciences	552093 RRID:AB_394334
Ly6C APC (Clone HK1.4)	BioLegend	128015 RRID:AB_1732087
NK1.1 Fitc (Clone PK136)	BioLegend	108706 RRID:AB_313393
PD-1 PE (Clone RPM1-30)	BioLegend	109103 RRID:AB_313420
rat IgG2a isotype control (Clone 2A3)	BioXCell	BE0089 RRID:AB_1107769
Siglec-F BV510 (Clone E50-2440)	BD Biosciences	740158 RRID:AB_2739911
Siglec-F PE (Clone E50-2440)	BD Biosciences	552126 RRID:AB_394341
TCRb PB (Clone H57-597)	BioLegend	109226

		RRID:AB_1027649
<b>Bacterial and Virus Strains</b>		
Adenovirus Cre	Genecust	N/A
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
[1,2- <sup>3</sup> H(N)]-Cholesterol	PerkinElmer	NET13005MC
Bodipy-cholesterol probe	ThermoFisher	D3922
Bovine serum Albumin (BSA)	Sigma	A7030
Collagenase D	Sigma	11088882001
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	ThermoFisher	D1306
DMEM, high glucose, GlutaMAX™	ThermoFisher	31966-021
EGF	PeptoTech	AF-100-15-100ug
Eosin	DiaPath	C0363
Fetal bovine serum	Fisher Scientific	12350273
Formaldehyde 4%	VWR International	9713.1000
Insuline-Transferrine-Sélénium	Fisher Scientific	12097549
Hematoxylin Solution	Sigma	HHS32
High-Capacity cDNA reverse transcription kit	Applied Biosystems	4368814
Ketamine	Virbac	N.A.
LXR agonist T0901317	Cayman Chemical	71810
Lysing buffer	BD Biosciences	555899
Matrigel™ matrix	Corning Life-Science	354234
Methyl Salicylate	Fisher Scientific	O3695-500
Methyl-β-cyclodextrin	Sigma	C4555
PBS	ThermoFisher	14190-094
Peg	Sigma	P-2139
Penicillin-Streptomycin	Fisher Scientific	15140130
Phorbol myristate acetate	Sigma	P8139
RNeasy Micro Kit	QIAGEN	74004
RPMI 1640, GlutaMAX™	ThermoFisher	61870-010
Sodium Pyruvate	ThermoFisher	11360070
Tamoxifen	Sigma	T5648
Triton X-100	Sigma	9002-93-1
Xylazine	Virbac	N.A.
<b>Critical Commercial Assays</b>		
Mouse SP-D Quantikine ELISA	R&D	MSFPD0
Human Angiotensin II	Abcam	ab108796
Human Apolipoprotein AI ELISA Kit	Abcam	ab108803

Human Fibrinogen	Abcam	ab108841
Human SP-B	Abbexa	abx251167
Human SP-D	Abbexa	abx153150
Human TNF $\alpha$	Abcam	ab181421
Mouse Angiotensin II	Enzolifesciences	ADI-900-204
Mouse G-CSF ELISA	RayBiotech	ELM-GCSF-5
Mouse IL-17A ELISA	RayBiotech	ELM-IL17-2
Phosphatidylcholine Assay Kit	Sigma Aldrich	MAK049
Total Cholesterol colorimetric kits	Wako Chemicals	999-02601
<b>Deposited Data</b>		
10X Genomics, RNA sequencing processed data files	this manuscript	N.A.
LPCE's Study of LUAD	Leon et al., 2019	GSE117049
TCGA's Study of LUAD	TCGA	<a href="https://www.cancer.gov/tcga">https://www.cancer.gov/tcga</a>
<b>Experimental Models: Cell lines</b>		
Kras-driven tumor-derived cell line KP	Pr. Eileen White	(Guo et al., 2013)
THP-1 monocytes	ATCC	TIB-202 RRID:CVCL_0006
<b>Experimental Models: Organisms/Strains</b>		
Mouse: Abca1 <sup>fl/fl</sup> Abcg1 <sup>fl/fl</sup>	Jackson Laboratory	SN021067 RRID:IMSR_JAX:021067
Mouse: CCSP-CreER <sup>TM/+</sup>	Jackson Laboratory	SN016225 RRID:IMSR_JAX:016225
Mouse: LSL-Kras <sup>G12D/+</sup>	Jackson Laboratory	SN008179 RRID:IMSR_JAX:008179
Mouse: LyzM-Cre; Abca1 <sup>fl/fl</sup> Abcg1 <sup>fl/fl</sup>	Pr. Marit Westerterp's lab	N.A.
Mouse: LyzM-Cre; CD36 <sup>fl/fl</sup>	Pr. Ira Goldberg's lab	N.A.
Mouse: LyzM-Cre; SR-BI <sup>fl/fl</sup>	Pr. Thierry Huby's lab	N.A.
Mouse: R26R-EYFP	Jackson Laboratory	SN006148 RRID:IMSR_JAX:006148
Mouse: Tg Hu ApoA1	Jackson Laboratory	SN001927 RRID:IMSR_JAX:001927
<b>Oligonucleotides</b>		
Abca1 qPCR F - GGGAAGGACATTCGCTCGG	Thermofisher	N.A.
Abca1 qPCR R - TTGCTTTTCAGCTTGCTCGG	Thermofisher	N.A.
Abcg1 qPCR F - GGGATCTCTGGGAAATTCAACAGTG	Thermofisher	N.A.
Abcg1 qPCR R - GTGAGCAGAGCTTCTGGTAGCAAAC	Thermofisher	N.A.
ApoE qPCR F - GCAGGCGGAGATCTTCCA	Thermofisher	N.A.

ApoE qPCR R - CCACTGGCGATGCATGTC	Thermofisher	N.A.
Glut1 qPCR F - GAATCGTCGTTGGCATCCTTA	Thermofisher	N.A.
Glut1 qPCR R - CCCGGTTCTCGTTACG	Thermofisher	N.A.
HmgcR qPCR F - GATTCTGGCAGTCAGTGGGAA	Thermofisher	N.A.
HmgcR qPCR R - GTTGTAGCCGCCTATGCTCC	Thermofisher	N.A.
Ldlr qPCR F - GAGGAACTGGCGGCTGAA	Thermofisher	N.A.
Ldlr qPCR R - GTGCTGGATGGGGAGGTCT	Thermofisher	N.A.
Pltp qPCR F - CGCACGAAGTTGATACCCTCA	Thermofisher	N.A.
Pltp qPCR R - GGAAGGCCGTCTCAGTGCTA	Thermofisher	N.A.
<b>Software and Algorithms</b>		
FlowJo	Tree Star	RRID:SCR_008520
ImageJ	NIH	RRID:SCR_003070
LabChart	ADinstrument	RRID:SCR_001620
Phantassus	Jha et al., 2015	
Prism8	GraphPad	RRID:SCR_002798
Spirometer	Adinstrument	
StepOne Software v.2.2.2	Applied Biosystem	RRID:SCR_014281

## RESSOURCE AVAILABILITY

### Lead Contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Dr. Laurent Yvan-Charvet ([yvancharvet@unice.fr](mailto:yvancharvet@unice.fr)).

### Materials Availability

We are glad to share repository with reasonable compensation by requestor for its processing and shipping.

### Data and Code Availability

The datasets supporting the current study have not been deposited in a public repository because of a pending patent at the time of submission but are available from the corresponding author on request.

## EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

**Human samples.** Human samples were provided by the Laboratory of Clinical and Experimental Pathology (LPCE) and the Hospital-related biobank (BB-0033-00025), which are accredited according to the ISO 15189 since 2012 for clinical and molecular biology and certified with the S96-900 since 2010 for management of human bioresource. This biobank is IBISA certified since 2014 and belongs to the BBMRI consortium in Europe. Informed signed consent was obtained from all patients.

**Human blood samples** (n=32) were divided in 4 groups: 5 normal patients, 5 patients with chronic non-cancerous lung disease (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), 14 patients with early-stage lung adenocarcinoma (LUAD) (stage I/II) and 8 with late-stage LUAD (stage III/IV).

**Biospies** from human LUAD (stage I/II) and adjacent normal tissues (n=68) were collected from patients undergoing surgical resection of primary tumors and transcriptomic analyses were performed at the genomics platform of the Institute Molecular and Cellular Pharmacology (IPMC) as previously described (Leon *et al.*, 2019). Briefly, data were normalized using the quantile method. A linear modeling approach was used to calculate log ratios, moderated *t*-statistics, and *P*-values for each comparison of interest. *P*-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini–Hochberg method that controls the false discovery rate. RNA sequencing has been deposited in the GEO database: GSE117049.

**Mice.** LSL-Kras<sup>G12D/+</sup> (B6.129S4-Kras<sup>tm4Tyj/J</sup>), R26R-EYFP (B6.129X1-Gt(ROSA)26So<sup>tm1(EYFP)Cos/J</sup>), Tg Hu apoA-I (C57BL/6-Tg(APOA1)1Rub/J), CCSP-CreER<sup>TM/+</sup> (B6N.129S6(Cg)-Scgb1a1<sup>tm1(cre/ERT)Blh/J</sup>) and Abca1<sup>fl/fl</sup>Abcg1<sup>fl/fl</sup> (B6.Cg-Abca1<sup>tm1Jp</sup>Abcg1<sup>tm1Tall/J</sup>) were obtained from the Jackson Laboratory. Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> mice carry a Lox-Stop-Lox (LSL) termination sequence with the K-ras G12D point mutation. The stop codon can be excised by Cre-mediated recombination. First, Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> mice were crossed to Rosa26<sup>LSL-EYFP</sup> reporter mice (LR<sup>EYFP</sup>). Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> mice were also crossed to apoAI transgenic mice (LR/apoAI-Tg). We then used mice containing an inducible Cre recombinase inserted into the Clara cell secretory protein (CCSP) locus, CCSP-CreER<sup>TM/+</sup> mice, and crossed them to Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> mice, to generate the CC-LR mice. CC-LR mice were then crossed with Abca1; Abcg1 floxed mice (CC-LR<sup>DKO</sup>). For each experiment, co-housed littermate controls were used. Animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the French Ministry of Higher Education and Research and the Mediterranean Center of Molecular Medicine (Inserm U1065) and were undertaken in accordance with the European Guidelines for Care and Use of Experimental Animals. Mouse survival was closely monitored during the entire experimental period. Animals had free access to food and water and were housed in a controlled environment with a 12h light-dark cycle and constant room temperature (22°C).

## METHOD DETAILS

**Integrated network analyses.** Network-based integration of gene expression datasets was conducted using Shiny Gam as previously described (Jha *et al.*, 2015). In brief, common up and down regulated metabolic genes were selected from the LPCE gene expression datasets and the publicly available gene expression datasets of the cancer genome atlas (TCGA) cohort containing 442 samples (Stage I and II LUAD). These dysregulated transcripts were mapped into models maintaining all essential KEGG pathway attributes. For cholesterol efflux pathway mapping, a precompiled Gene Ontology (GO) terms list, annotated with the term ‘cholesterol’, was added to the network. We also manually mapped nodes representing reactions that are connected to cholesterol homeostasis to generate a global combined network resulting in a topological description of cholesterol homeostasis pathway.

**Laboratory measurements.** Blood specimens were analyzed for total cholesterol, HDL-cholesterol and HDL-phosphatidylcholine levels. Other plasma parameters were determined using commercial kits (ApoA-I, Fibrinogen, Ang II and TNF $\alpha$  from Abcam and SP-B and SP-D from Abbexa).

**Plasma HDL preparation.** ApoB-containing particles were precipitated from serum by adding 100  $\mu$ L of serum to 40  $\mu$ L of 20% polyethylene glycol (Sigma P-2139 in 200 mmol/L glycine, pH10) solution. This mixture was incubated at room temperature for 15 minutes then was centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes. The supernatant, containing HDL fractions, was removed and used for experiments.

**Isotopic cholesterol efflux assay.** The functionality of the HDL to mediate cholesterol efflux was assessed on macrophages. THP-1 monocytes were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Cells were treated with 100nM PMA (Phorbol myristate acetate) for 24 h to facilitate differentiation into macrophages. Then, adherent macrophages were incubated in complete media with 2 $\mu$ Ci/mL of [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-cholesterol for 24 hours before cholesterol efflux studies. Cholesterol efflux was performed for 6h in 0.2% BSA RPMI containing different concentrations or volumes of HDL as acceptors. The cholesterol efflux was expressed as the percentage of the radioactivity in cells plus medium.

**Adenovirus inhalation.** Lightly anesthetized mice were infected intranasally with adenoviruses containing gene for cre recombinase (Genecust, Luxembourg) at 5x10<sup>8</sup> PFU per mouse to induce *Kras*-driven lung tumorigenesis.

**Tamoxifen induction.** Mice were i.p. injected with 200 $\mu$ l corn oil Tamoxifen solution [10 mg/ml] (Sigma Aldrich) at 6-8 weeks of age to induce *Kras*-driven lung tumorigenesis.

**Bone marrow (BM) transplantation.** Recipient CC-LR or CC-LR<sup>DKO</sup> mice were lethally irradiated the day before transplantation as previously described (Yvan-Charvet *et al.*, 2010). Femurs and tibiae of donor LyzM-Cre Abca1<sup>fl/fl</sup> Abcg1<sup>fl/fl</sup> mice, LyzM-Cre CD36<sup>fl/fl</sup> mice and LyzM-Cre SR-BI<sup>fl/fl</sup> mice were kindly provided by Pr. Marit Westerterp, Pr. Ira Goldberg and Pr. Thierry Huby, respectively. Briefly, femurs and tibia were flushed with ice-cold RPMI 1640 and centrifugated at 1,400 rpm for 5 minutes to extract BM cells. Red blood cells were lysed, and each recipient mouse was injected with 5x10<sup>6</sup> BM cells through the vein. After 5 weeks of reconstitution, mice were *i.p* injected with tamoxifen to induce lung cancer development.

**Spirometry.** Lung capacity was measured using a spirometer (Adinstrument, Oxford, UK). Inspiratory and expiratory volumes and debit were measured and plot using LabChart (ADinstrument). Briefly, mice were lightly anesthetized with 6,3 mg/kg xylazine and 125 mg/kg ketamine (Virbac, Carros, France). Spirometer mask was attached to mice head and lung capacity was measured during 5 min. Debit by volume was plotted to represent lung capacity.

**In vivo treatment studies.** Tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice (6weeks after tamoxifen administration) were treated by inhalation with either 50 $\mu$ l of PBS or the LXR agonist T0901317 (Cayman Chemical) (50mg/kg of mouse) twice a week for 4weeks. In independent set of experiments, mice were treated by inhalation with 50 $\mu$ l of PBS or the  $\beta$ -methyl-cyclodextrin (Sigma) (4g/kg of mouse) once a week for 4weeks. For the anti-PD-1 treatment, mice were *i.p* injected with either the IgG2a isotype control antibody (Clone 2A3, BioXCell) (200 $\mu$ g/mouse) or with the anti-mouse PD-1 antibody (Clone RPM1-14, BioXCell) (200 $\mu$ g/mouse) twice a week. Animals were sacrificed at the indicated time point after treatments.

**In vivo [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-Cholesterol tracing experiment.** We analyzed the retention and distribution of [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-Cholesterol in the lung and peripheral tissues, respectively. In brief, tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice (6weeks after tamoxifen administration) received 4 $\mu$ Ci of [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-Cholesterol

(PerkinElmer) by inhalation and organs were collected 24h later. The amount of [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-cholesterol was determined by standard procedures using a liquid scintillation counter. The relative cholesterol retention in the lung or distribution in peripheral tissues was calculated by dividing the amount of deposited dose and expressed as percentage. Imaging for [1,2-<sup>3</sup>H(N)]-Cholesterol was performed on Typhoon<sup>TM</sup> Biomolecular Imager (Amersham).

**White blood cell counts.** Leukocytes, differential blood counts, platelets and red blood cells were quantified from whole blood using a hematology cell counter (HEMAVET 950).

**Blood parameters.** Plasma angiotensin II, G-CSF and IL-17 levels were determined using commercial kits (all from Raybioteck, Inc).

**Bronchoalveolar lavage (BAL).** After sacrifice, the trachea was exposed with pincers and a catheter 24G x 0.75po. (BD Biosciences) was inserted. The catheter was stabilized with cotton thread and we injected gently 750mL of sterile ice-cold PBS. Fluid was centrifuged at 400g for 10 minutes to separate cells from supernatant.

**ELISA and colorimetric measurements.** Cholesterol, SP-D and phosphatidylcholine from plasma, BAL and lung homogenates were measured using colorimetric kits LabAssay<sup>TM</sup> Cholesterol (*Wako Chemicals*), Mouse SP-D Elisa (R&D) and Phosphatidylcholine Assay Kit (*Sigma Aldrich*) respectively, according to the manufacturer's instructions.

**Adipose tissue cellularity.** Cellularity of epididymal adipose tissue was determined from images of isolated adipocytes. The measurement of ~400 cell diameters was performed using Image J software, allowing calculation of a mean fat cell weight.

**Histopathology and tumors quantification.** Mice were euthanized and tissues were harvested and fixed in 4% paraformaldehyde. Lung was serially paraffin sectioned (6- $\mu$ m sections) using a Microm HM340E microtome (Microm Microtech, Francheville France) and stained with H&E for morphological analysis. Images were captured with a Nikon BrightField Color. Anatomopathological examination was made by an expert of the LPCE to determine and quantify the lesion type and the stage of lung cancer. Lesion represents the sum of hyperplasia, atypical adenomatous hyperplasia (AAH) and adenoma subtypes, whereas tumor represents the sum of AAH, adenoma and adenocarcinoma subtypes. We quantified the lesion sizes by blindly analysis with FIJI software and all the nodule numbers have been normalized per cm<sup>2</sup> of lung tissue.

**Immunostainings.** Paraffin sections were deparaffinized and antigen retrieval was carried out in citrate buffer. Sections were further permeabilized in 0.3% Triton X-100 for 10 minutes and then blocked with in 10% BSA for 1 hour. The following primary antibodies were used for incubation during 2 hours at RT: anti-E-cadherin (clone 24E10, Cell Signaling), anti-fibronectin (BDBiosciences), anti-vimentin (polyclonal, Novus Biologicals), anti-CCSP (clone S-20, Santa Cruz), anti-SP-C (polyclonal, Abcam), anti-Ki-67 (Clone SolA15, ThermoFisher), anti-LC3A/B (Clone D3U4C, Cell Signaling). Alexa Fluor 594 donkey anti-chicken (703-586-155), Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse (715-586-150), Alexa Fluor 594 donkey anti-rat (712-586-150) antibodies from Jackson ImmunoResearch and Alexa Fluor 594 chicken anti-goat (A21468), Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit (A21206) antibodies from Thermo Fisher were used as secondary antibodies for 2 hours at RT. Images were captured with a Leica video-TIRF epifluorescence microscope.

**Tissue clearing and 3D-reconstruction microscopy.** After sacrifice, lungs were fixed with 4% paraformaldehyde and then, permeabilized for several days with 0.2% Triton X-100. For staining procedures, lungs were incubated with anti-CCSP (clone S-20, Santa Cruz) overnight at 4°C. Alexa Fluor 594 chicken anti-goat (A21468) antibody from Thermo Fisher was used as secondary antibody for 2 hours at RT. Lung were then dehydrated with different ethanol baths

(from 70% to 100%) and directly immersed in Methyl Salicylate for 15 minutes at RT. Z-stack images of cleared tissue were captured with a Nikon confocal microscope.

**Single-cell RNA-seq data analysis.** Whole lungs were dissociated with fine scissors and then proteolytic digestion was performed with DMEM containing 2,5mg/mL collagenase D (Roche) at 37°C for 30min. Single-cell suspension was submitted to red blood cell lysis. Single-cells were encapsulated in droplets using 10X Genomics GemCode Technology and processed following manufacturer's specifications. Briefly, every cell and every transcript are uniquely barcoded using a unique molecular identifier (UMI) and cDNA ready for sequencing on Illumina platforms is generated using the Single Cell 3' Reagent Kits v2 (10X Genomics). Libraries were sequenced across a Nextseq 500 (Illumina) in paired-end to reach approximately 50,000 reads per single-cell. Alignment, barcode assignment and UMI counting with Cell Ranger v4.0.0 was used to perform sample demultiplexing, barcode processing and single-cell 3' counting. Cell Ranger's mkfastq function was used to demultiplex raw base call files from the HiSeq4000 sequencer into sample specific FASTQ files. Barcodes in both samples that were considered to represent noise and low-quality cells were filtered out using knee-inflection strategy available in DropletUtils package (version 1.4.3). For analysis, Seurat package (version 3.1.0) was used, genes which express in less than 2 cells and cells which have non-zero counts in less than 200 genes were additionally filtered from both barcode expression matrices, and the result matrices were used as analysis inputs. Low quality cells, doublets and potentially dead cells were removed according the percentage of mitochondrial genes and number of genes and UMIs expressed in each cell. The fraction of mitochondrial genes was calculated for every cell, and cells with a mitochondrial fraction >2% were filtered out. After all filtering procedures, 3,193 cells were left in the scRNA-seq data of control sample, 1,785 cells were left in scRNA-seq of CC-LR sample and 2,269 cells were left in scRNA-seq of CC-LR<sup>DKO</sup> sample. All samples were normalized using *SCTransform* function with mitochondrial percentage as variable to regress out in a second non-regularized linear regression. For integration purpose, variable features across the samples were selected by *SelectIntegrationFeatures* function with the number of features equal to 2000. Then the object was prepared for integration (*PrepSCTIntegration* function), the anchors were found (*FindIntegrationAnchors* function) and the samples were integrated into the whole object (*IntegrateData* function). The dimensionality of the object was reduced by principal component analysis (PCA), and the first 20 principal components (PCs) were used further to generate uniform manifold approximation and projection (UMAP) dimensionality reduction by *RunUMAP* function. Graph-based clustering was run using *FindNeighbors* and *FindClusters* with a resolution of 1.0 and the first 20 PCs as input, and the 18 clusters were identified. In order to exclude the technical bias across the samples, both the counts slot from *SCTransform* assay and the data slot from integrated assay were used as input for trajectory inference. For visualization purposes, the custom labels were assigned to several clusters by merging multiple clusters for simplification. Violin plots were drawn using the *data* slot of *SCT* assay. To generate pathway enrichment plots we took expression of genes from the pathway from the *data* slot of *SCT* counts assay, used standard normalization (z-score) for these vectors and then calculated the average vector. The gene signature heatmap was drawn using the scaled *data* slot of the *integrated* assay.

**In vivo flow cytometry analysis.** Cells were collected from peripheral blood or tissues, lysed to remove red blood cells and filtered before use. Whole lungs were dissociated with fine scissors and then proteolytic digestion was performed with DMEM containing 2,5mg/mL collagenase D (Roche) at 37°C for 30min. Splenocytes were extracted by pressing spleens through a stainless-steel grid and after filtration (Cell Strainer 100µM), cells were centrifugated at 1,500 rpm for 5 minutes. Freshly isolated cells were stained with the appropriate antibodies for 30min on ice protected from light. Cells were analyzed by flow cytometry using BDFACSCanto (BD Biosciences). All gating strategies are depicted in the Figures. Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star).

**Antibodies.** For lung epithelial cells, the following antibodies were used: CD45 APC/Cy7 conjugated (clone 30-F11, BD Biosciences), CD31 PerCP/Cy5.5 conjugated (Clone 390, BioLegend), EpCAM PE conjugated (Clone G8.8, BioLegend), CD36 PE/Cy7 conjugated (Clone HM36, BioLegend), CD24 PB conjugated (Clone M1/69, BioLegend) and Siglec-F BV510 conjugated (Clone E50-2440, BD Biosciences) were used to quantify epithelial progenitor cells. Cellular cholesterol content was quantified using the Bodipy-cholesterol probe (Life Technologies). For DNA content analysis, cells were fixed in 1% paraformaldehyde in PBS, washed, and stained with 5µg/mL Hoechst 33342 (Molecular Probes).

For lung myeloid cells, the following antibodies were used: CD45 APC/Cy7 conjugated (clone 30-F11, BD Biosciences), Ly6C APC conjugated (Clone HK1.4), CD206 PerCP/Cy5.5 conjugated (clone C068C2, BioLegend), Siglec-F PE conjugated (Clone E50-2440, BD Biosciences), CD11c PE/Cy7 conjugated (Clone N418, BioLegend), CD64 BV421 conjugated (Clone X54-5/7.1, BD Biosciences), CD11b BV510 conjugated (Clone M1/70, BioLegend). Cellular cholesterol content was quantified using the Bodipy-cholesterol probe (Life Technologies).

For lung T-cells, the following antibodies were used: CD45 APC/Cy7 conjugated (clone 30-F11, BD Biosciences), CD62L APC conjugated (Clone MEL-14, eBioscience), CTLA-4 CD152 PerCP/Cy5.5 conjugated (Clone UC10-4B6, BioLegend), PD-1 PE conjugated (Clone RPM1-30, BioLegend), CD44 PE/Cy7 conjugated (Clone IM7, BioLegend), TCRβ PB conjugated (Clone H57-597, BioLegend), CD8a BV510 conjugated (Clone 53-6.7, BioLegend).

For peripheral blood leukocytes analysis, the following antibodies were used: CD45 APC/Cy7 conjugated (clone 30-F11, BD Biosciences), CD62L APC conjugated (Clone MEL-14, eBioscience), Gr-1 PerCP/Cy5.5 conjugated (Clone RB6-8C5, BD Biosciences), B220 Fitc conjugated (Clone RA3-6B2, eBioscience), CD115 PE conjugated (Clone AFS98, eBioscience), CD44 PE/Cy7 conjugated (Clone IM7, BioLegend), TCRb PB conjugated (Clone H57-597, BioLegend), CD8a BV510 conjugated (Clone 53-6.7, BioLegend).

For splenocytes, the following antibodies were used: CD45 APC/Cy7 conjugated (clone 30-F11, BD Biosciences), CD62L APC conjugated (Clone MEL-14, eBioscience), CTLA-4 CD152 PerCP/Cy5.5 conjugated (Clone UC10-4B6, BioLegend), PD-1 PE conjugated (Clone RPM1-30, BioLegend), TCRb PB conjugated (Clone H57-597, BioLegend), CD8a BV510 conjugated (Clone 53-6.7, BioLegend).

**Colony-Forming Assay.** Whole lungs were dissociated with fine scissors and then proteolytic digestion was performed with DMEM containing 2,5mg/mL collagenase D (Roche) at 37°C for 30min. Single-cell suspension was submitted to red blood cell lysis and were plated in a precoated-Matrigel™ matrix (Corning Life-Science). Cells were grown in DMEM with (10% FBS) or without serum (replaced by 0,2% BSA) containing 1X Gibco™ Insuline-Transferrine-Sélénium (ThermoFisher Scientific) in presence or absence of different treatments as indicated in the figure legends. Briefly, treatments included 3µM of the LXR agonist T0901317 (Cayman Chemical), 5mM of methyl-β-cyclodextrin (Sigma), 5, 10 or 25µg/mL of HDL or EGF 10ng/mL (PrepoTech). The number of epithelial colony forming unit (eCFU) per dish was scored after 8 days of culture using the ImageJ analysis software.

**IncuCyte proliferation assay.** Kras-driven tumor-derived cell line generated from Kras<sup>G12D/+</sup>;p53<sup>-/-</sup> lung tumors were kindly provided by Pr. Eileen White and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with sodium pyruvate (1mM), penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 mg/ml) and 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. KP cells were incubated at the density of 8.10<sup>4</sup> for 24 hours into a 48-well plate in complete medium, then medium was replaced with RPMI 1640 medium supplemented with sodium pyruvate, penicillin/streptomycin containing 2% of FBS in presence or absence of 10µg/µl of HDL. Proliferation was monitored by analysis of the occupied area (% confluence) of cell images over a 72-hours period of time. The graphs from the phase of cell confluence area were recorded every 2 hours according to the IncuCyte (Essen BioScience) manufacturer's instructions.

**Real Time qPCR.** Total RNA was isolated using the RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) and quantified using a Nanodrop (Ozyme). cDNA was prepared using 10 ng/μl total RNA by a RT-PCR using a high-capacity cDNA reverse transcription kit according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Real-time qPCR was performed on cDNA using SYBR Green. qPCRs were performed on the StepOne device (Applied Biosystem). Results were normalized on GAPDH gene expression. All percentage changes are expressed normalized to the untreated control. Primers are listed in the table.

## **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

Data are shown as mean ± SEM. Statistical significance was performed using two-tailed parametric Student's t test or by one-way analysis of variance (ANOVA, 4-group comparisons) with Tukey's post-test analysis according to the dataset (GraphPad software, San Diego, CA). Results were considered as statistically significant when  $p < 0.05$ . All the statistical details of experiment can be found in the figure legends.

## References

- Adderley, H., Blackhall, F. H. and Lindsay, C. R. (2019) 'KRAS-mutant non-small cell lung cancer: Converging small molecules and immune checkpoint inhibition', *EBioMedicine*, 41, pp. 711–716. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.02.049.
- Atger, V. M. *et al.* (1997) 'Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells.', *Journal of Clinical Investigation*, 99(4), pp. 773–780. doi: 10.1172/jci119223.
- Baldán, Á. *et al.* (2008) 'Loss of ABCG1 Results in Chronic Pulmonary Inflammation', *The Journal of Immunology*, 180(5), pp. 3560–3568. doi: 10.4049/jimmunol.180.5.3560.
- Blériot, C., Chakarov, S. and Ginhoux, F. (2020) 'Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function', *Immunity*, 52(6), pp. 957–970. doi: 10.1016/j.immuni.2020.05.014.
- Bovenga, F., Sabbà, C. and Moschetta, A. (2015) 'Uncoupling Nuclear Receptor LXR and Cholesterol Metabolism in Cancer', *Cell Metabolism*, 21(4), pp. 517–526. doi: 10.1016/j.cmet.2015.03.002.
- Casanova-Acebes, M. *et al.* (2021) 'Tissue-resident macrophages provide a pro-tumorigenic niche to early NSCLC cells', *Nature*, ahead of print. doi: 10.1038/s41586-021-03651-8.
- Chang, C.-H. *et al.* (2015) 'Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression', *Cell*, 162(6), pp. 1229–1241. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.016.
- Colegio, O. R. *et al.* (2014) 'Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid', *Nature*, 513(7519), pp. 559–563. doi: 10.1038/nature13490.
- Cortez-Retamozo, V. *et al.* (2013) 'Angiotensin II Drives the Production of Tumor-Promoting Macrophages', *Immunity*, 38(2), pp. 296–308. doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.015.
- Dai, Y. *et al.* (2016) 'Ablation of Liver X receptors  $\alpha$  and  $\beta$  leads to spontaneous peripheral squamous cell lung cancer in mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(27), pp. 7614–7619. doi: 10.1073/pnas.1607590113.
- Davidson, S. M. *et al.* (2016) 'Environment Impacts the Metabolic Dependencies of Ras-Driven Non-Small Cell Lung Cancer', *Cell Metabolism*, 23(3), pp. 517–528. doi: 10.1016/j.cmet.2016.01.007.
- DeBerardinis, R. J. and Chandel, N. S. (2016) 'Fundamentals of cancer metabolism', *Science Advances*, 2(5), p. e1600200. doi: 10.1126/sciadv.1600200.
- Deng, T. *et al.* (2016) 'Obesity, Inflammation, and Cancer', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11(1), pp. 421–449. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044359.
- Desai, T. J., Brownfield, D. G. and Krasnow, M. A. (2014) 'Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer', *Nature*, 507(7491), pp. 190–194. doi: 10.1038/nature12930.
- DuPage, M., Dooley, A. L. and Jacks, T. (2009) 'Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase', *Nature Protocols*, 4(7), pp. 1064–1072. doi: 10.1038/nprot.2009.95.
- Fessler, M. B. (2017) 'A New Frontier in Immunometabolism. Cholesterol in Lung Health and Disease', *Annals of the American Thoracic Society*, 14(Supplement\_5), pp. S399–S405. doi: 10.1513/annalsats.201702-136aw.
- Gabitova, L., Gorin, A. and Astsaturov, I. (2014) 'Molecular Pathways: Sterols and Receptor Signaling in Cancer', *Clinical Cancer Research*, 20(1), pp. 28–34. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-13-0122.
- Galle-Treger, L. *et al.* (2019) 'Targeted invalidation of SR-B1 in macrophages reduces macrophage apoptosis and accelerates atherosclerosis', *Cardiovascular Research*, 116(3), pp. 554–565. doi: 10.1093/cvr/cvz138.
- Goossens, P. *et al.* (2019) 'Membrane Cholesterol Efflux Drives Tumor-Associated Macrophage Reprogramming and Tumor Progression', *Cell Metabolism*, 29(6), pp. 1376–1389.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2019.02.016.

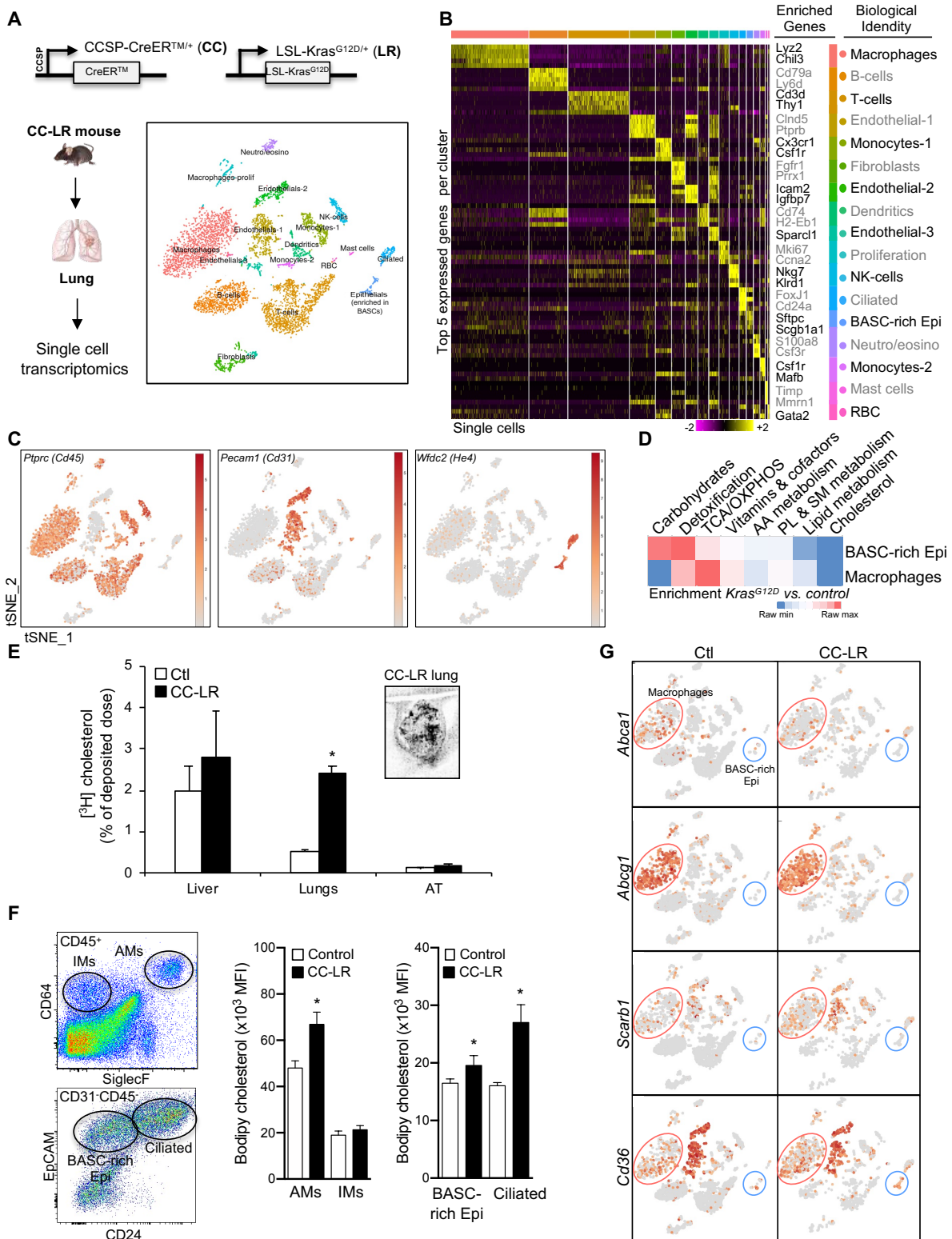
- Guilbaud, E., Gautier, E. L. and Yvan-Charvet, L. (2019) 'Macrophage Origin, Metabolic Reprogramming and IL-1 Signaling: Promises and Pitfalls in Lung Cancer', *Cancers*, 11(3), p. 298. doi: 10.3390/cancers11030298.
- Guo, J.X. *et al.* (2013) 'Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytoomas and maintains lipid homeostasis', *Genes Dev*, 27(13), pp. 1447-1461. doi: 10.1101/gad.219642.113.
- Hensley, C. T. *et al.* (2016) 'Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors', *Cell*, 164(4), pp. 681–694. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.034.
- Hirschey, M. D. *et al.* (2015) 'Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis', *Seminars in Cancer Biology*, 35, pp. S129–S150. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.10.002.
- Jafri, H., Alsheikh-Ali, A. A. and Karas, R. H. (2010) 'Baseline and On-Treatment High-Density Lipoprotein Cholesterol and the Risk of Cancer in Randomized Controlled Trials of Lipid-Altering Therapy', *Journal of the American College of Cardiology*, 55(25), pp. 2846–2854. doi: 10.1016/j.jacc.2009.12.069.
- Jeanson, A. *et al.* (2019) 'Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)', *Journal of Thoracic Oncology*, 14(6), pp. 1095–1101. doi: 10.1016/j.jtho.2019.01.011.
- Jha, A. K. *et al.* (2015) 'Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization', *Immunity*, 42(3), pp. 419–430. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.005.
- Khandekar, M. J., Cohen, P. and Spiegelman, B. M. (2011) 'Molecular mechanisms of cancer development in obesity', *Nature Reviews Cancer*, 11(12), pp. 886–895. doi: 10.1038/nrc3174.
- Kim, C. F. B. *et al.* (2005) 'Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer', *Cell*, 121(6), pp. 823–835. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.032.
- Kuzu, O. F., Noory, M. A. and Robertson, G. P. (2016) 'The Role of Cholesterol in Cancer', *Cancer Research*, 76(8), pp. 2063–2070. doi: 10.1158/0008-5472.can-15-2613.
- LaFave, L. M. *et al.* (2020) 'Epigenomic State Transitions Characterize Tumor Progression in Mouse Lung Adenocarcinoma', *Cancer Cell*, 38(2), pp. 212-228.e13. doi: 10.1016/j.ccell.2020.06.006.
- Lavin, Y. *et al.* (2017) 'Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses', *Cell*, 169(4), pp. 750-765.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.014.
- Leon, L. M. *et al.* (2019) 'The nuclear hypoxia-regulated NLUCAT1 long non-coding RNA contributes to an aggressive phenotype in lung adenocarcinoma through regulation of oxidative stress', *Oncogene*, 38(46), pp. 7146–7165. doi: 10.1038/s41388-019-0935-y.
- Lin, C.-Y. and Gustafsson, J.-Å. (2015) 'Targeting liver X receptors in cancer therapeutics', *Nature Reviews Cancer*, 15(4), pp. 216–224. doi: 10.1038/nrc3912.
- Lin, X. *et al.* (2017) 'Blood lipids profile and lung cancer risk in a meta-analysis of prospective cohort studies', *Journal of Clinical Lipidology*, 11(4), pp. 1073–1081. doi: 10.1016/j.jacl.2017.05.004.
- Liu, X. *et al.* (2020) 'Inhibition of PCSK9 potentiates immune checkpoint therapy for cancer', *Nature*, 588(7839), pp. 693–698. doi: 10.1038/s41586-020-2911-7.
- Marjanovic, N. D. *et al.* (2020) 'Emergence of a High-Plasticity Cell State during Lung Cancer Evolution', *Cancer Cell*, 38(2), pp. 229-246.e13. doi: 10.1016/j.ccell.2020.06.012.
- McQualter, J.L. *et al.* (2010) 'Evidence of an epithelial stem/progenitor cell hierarchy in the adult mouse lung', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(4):1414-9. doi: 10.1073/pnas.0909207107.
- Mollinedo, F. and Gajate, C. (2020) 'Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy', *Journal of Lipid Research*, 61(5), pp. 611–635. doi: 10.1194/jlr.tr119000439.
- Oda, K. *et al.* (2005) 'A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling',

- Molecular Systems Biology*, 1(1). doi: 10.1038/msb4100014.
- Paz-Ares, L. *et al.* (2018) ‘Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non–Small-Cell Lung Cancer’, *New England Journal of Medicine*, 379(21), pp. 2040–2051. doi: 10.1056/nejmoa1810865.
- Pirro, M. *et al.* (2018) ‘High density lipoprotein cholesterol and cancer: Marker or causative?’, *Progress in Lipid Research*, 71, pp. 54–69. doi: 10.1016/j.plipres.2018.06.001.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E. and Bar-Sagi, D. (2011) ‘RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web’, *Nature Reviews Cancer*, 11(11), pp. 761–774. doi: 10.1038/nrc3106.
- Ramadori, G. *et al.* (2015) ‘Diet-Induced Unresolved ER Stress Hinders KRAS-Driven Lung Tumorigenesis’, *Cell Metabolism*, 21(1), pp. 117–125. doi: 10.1016/j.cmet.2014.11.020.
- Rao, S. *et al.* (2014) ‘A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer’, *Nature Communications*, 5(1), p. 3056. doi: 10.1038/ncomms4056.
- Robertson, T. B. and Burnett, T. C. (1913) ‘THE INFLUENCE OF LECITHIN AND CHOLESTERIN UPON THE GROWTH OF TUMORS’, *The Journal of Experimental Medicine*, 17(3), pp. 344–352. doi: 10.1084/jem.17.3.344.
- Rosenson, R. S. *et al.* (2012) ‘Cholesterol Efflux and Atheroprotection’, *Circulation*, 125(15), pp. 1905–1919. doi: 10.1161/circulationaha.111.066589.
- Sag, D. *et al.* (2015) ‘The cholesterol transporter ABCG1 links cholesterol homeostasis and tumour immunity’, *Nature Communications*, 6(1), p. 6354. doi: 10.1038/ncomms7354.
- Shalpour, S. and Karin, M. (2019) ‘Pas de Deux: Control of Anti-tumor Immunity by Cancer-Associated Inflammation’, *Immunity*, 51(1), pp. 15–26. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.021.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2018) ‘Cancer statistics, 2018’, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), pp. 7–30. doi: 10.3322/caac.21442.
- Skoulidis, D. *et al.* (2021) ‘Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation’, *N Engl J Med*, ahead of print. doi: 10.1056/NEJMoa2103695
- Smith, B. and Land, H. (2012) ‘Anticancer Activity of the Cholesterol Exporter ABCA1 Gene’, *Cell Reports*, 2(3), pp. 580–590. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.011.
- Socinski, M. A. *et al.* (2018) ‘Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC’, *New England Journal of Medicine*, 378(24), pp. 2288–2301. doi: 10.1056/nejmoa1716948.
- Son, N.-H. *et al.* (2018) ‘Endothelial cell CD36 optimizes tissue fatty acid uptake’, *Journal of Clinical Investigation*, 128(10), pp. 4329–4342. doi: 10.1172/jci99315.
- Su, F. *et al.* (2010) ‘Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46), pp. 19997–20002. doi: 10.1073/pnas.1009010107.
- Su, F. *et al.* (2012) ‘HDL Mimetics Inhibit Tumor Development in Both Induced and Spontaneous Mouse Models of Colon Cancer’, *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(6), pp. 1311–1319. doi: 10.1158/1535-7163.mct-11-0905.
- Tall, A. R. and Yvan-Charvet, L. (2015) ‘Cholesterol, inflammation and innate immunity’, *Nature Reviews Immunology*, 15(2), pp. 104–116. doi: 10.1038/nri3793.
- Treutlein, B. *et al.* (2014) ‘Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq’, *Nature*, 509(7500), pp. 371–375. doi: 10.1038/nature13173.
- Westerterp, M. *et al.* (2013) ‘Deficiency of ATP-Binding Cassette Transporters A1 and G1 in Macrophages Increases Inflammation and Accelerates Atherosclerosis in Mice’, *Circulation Research*, 112(11), pp. 1456–1465. doi: 10.1161/circresaha.113.301086.
- Westphalen, K., *et al.* (2014) ‘Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity’, *Nature*, 506(7489), pp. 503–6. doi: 10.1038/nature12902

- White, E. (2013) 'Exploiting the bad eating habits of Ras-driven cancers', *Genes & Development*, 27(19), pp. 2065–2071. doi: 10.1101/gad.228122.113.
- Wojcik, A. J. *et al.* (2008) 'A Critical Role for ABCG1 in Macrophage Inflammation and Lung Homeostasis', *The Journal of Immunology*, 180(6), pp. 4273–4282. doi: 10.4049/jimmunol.180.6.4273.
- Wu, K. *et al.* (2015) 'TREM-2 promotes macrophage survival and lung disease after respiratory viral infection TREM-2 in macrophage survival and viral disease', *The Journal of Experimental Medicine*, 212(5), pp. 681–697. doi: 10.1084/jem.20141732.
- Yuneva, M. O. *et al.* (2012) 'The Metabolic Profile of Tumors Depends on Both the Responsible Genetic Lesion and Tissue Type', *Cell Metabolism*, 15(2), pp. 157–170. doi: 10.1016/j.cmet.2011.12.015.
- Yvan-Charvet, L., Wang, N. and Tall, A. R. (2010) 'Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 Transporters in Cholesterol Efflux and Immune Responses', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(2), pp. 139–143. doi: 10.1161/atvbaha.108.179283.
- Zamanian-Daryoush, M. *et al.* (2013) 'The Cardioprotective Protein Apolipoprotein A1 Promotes Potent Anti-tumorigenic Effects', *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), pp. 21237–21252. doi: 10.1074/jbc.m113.468967.
- Zamanian-Daryoush, M. *et al.* (2017) 'Myeloid-specific genetic ablation of ATP-binding cassette transporter ABCA1 is protective against Cancer', *Oncotarget*, 5(0), pp. 71965–71980. doi: 10.18632/oncotarget.18666.
- Zhu, J. and Thompson, C. B. (2019) 'Metabolic regulation of cell growth and proliferation', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(7), pp. 436–450. doi: 10.1038/s41580-019-0123-5.

**Figure**

**Figure. 1**

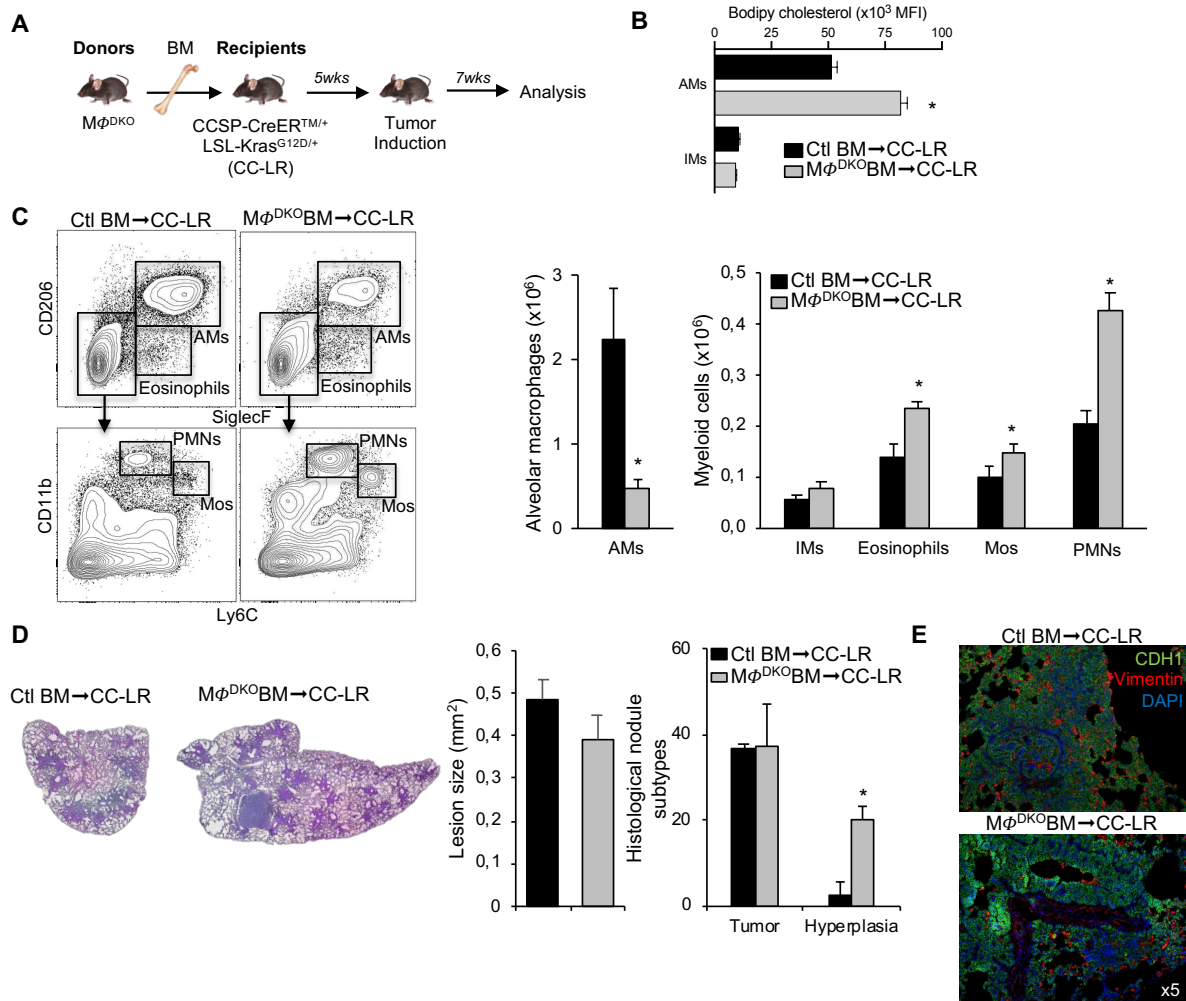


**Figure 1: Cellular and transcriptomic perturbations of cholesterol efflux pathways in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice.**

(A) Upper panel. Experimental lung adenocarcinoma mouse model. CCSP-CreER<sup>TM</sup>/+ mice (CC) contain a lung-specific promoter, club cell secretory protein (CCSP) promoter in the *Scgb1a1* locus to drive the expression of a tamoxifen-inducible Cre-mutated estrogen receptor. LSL-Kras<sup>G12D</sup>/+ mice (LR) contain a

LoxP-flanked stop codon in the mutant *Kras*<sup>G12D</sup> oncogene. The resulting mouse received tamoxifen to initiate lung tumorigenesis. Lower panel. Single-cell transcriptomes of mouse pulmonary and immune cells from control and CC-LR mice 6 weeks after tumor initiation were analyzed with an unsupervised dimensionality reduction algorithm (SEURAT) to identify groups of cells with similar gene expression. t-Stochastic neighbor embedding (tSNE) representing 7,247 cells profiled and extracted from a pool of three samples in each group (each cell was color-coded for the associated cell type). **(B)** Top 5 differentially expressed genes among all detected pulmonary and immune cell clusters. Normalized single cell gene expression is shown. Retrieved clusters were assigned to seventeen lineages and two selected genes are annotated to illustrate biological identification of each cluster. **(C)** Gene expression patterns projected onto t-SNE plots of the leukocyte marker (*Ptprc*), endothelial cell marker (*Pecam1*) and epithelial cell marker (*Wfdc2*). **(D)** Metabolic pathway enrichment analysis of epithelials enriched in BASCs (BASC-rich Epi) and macrophage gene expression from CC-LR mice. **(E)** [<sup>3</sup>H] cholesterol recovery in the liver, lung and adipose tissue (AT) of tamoxifen-induced control (Ctl) and tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> (CC-LR) mice 24h after inhalation of 4μCi of [<sup>3</sup>H] radiolabeled cholesterol. A representative phosphoimage of [<sup>3</sup>H] cholesterol accumulation is shown in lung from CC-LR mice. **(F)** Representative dot plot of CD64<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup> lung alveolar macrophages (AMs) and CD64<sup>+</sup>SiglecF<sup>-</sup> interstitial macrophages (IMs) (upper panel) and in C45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> BASC-rich Epi and C45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> ciliated cells (lower panel). Neutral lipid content, a surrogate of cellular cholesterol, with BODIPY staining was quantified by flow cytometry at the end of the study period (right panel). **(G)** The mean expression of cholesterol flux genes (*Abca1*, *Abcg1*, *Scarb1* and *Cd36*) in the lung from control and CC-LR mice is projected onto t-SNE plots. Macrophage (red) and epithelial/ciliated cell (blue) clusters are circled. All values are mean ± SEM and are representative of at least one experiment (n=5-8 independent animals). \*P<0.05 compared to control.

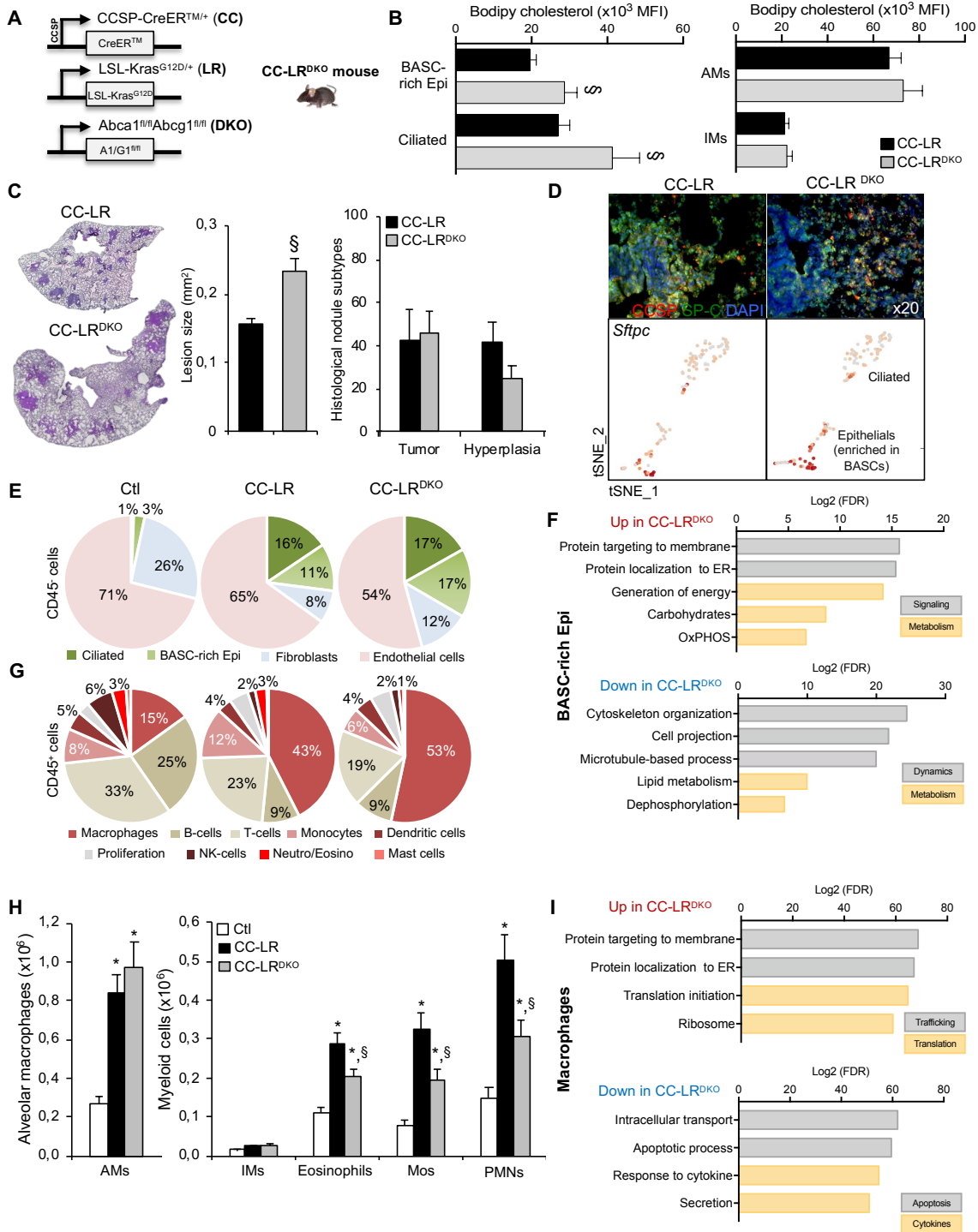
**Figure. 2**



**Figure 2: Defective cholesterol efflux pathways in macrophages promotes a pro-tolerogenic tumor microenvironment.**

**(A)** Experimental outline. Bone marrow (BM) from  $LysM^{Cre-}Abca1/Abcg1^{fl/fl}$  (Ctl BM) or  $LysM^{Cre-}Abca1/Abcg1^{fl/fl}$  ( $M\phi^{DKO}$ BM) mice were transplanted into lethally irradiated tumor-bearing  $Kras^{G12D}$  (CC-LR) recipient mice. After a 5-week recovery period, the mice were injected with tamoxifen to initiate tumorigenesis and analyzed 7 weeks later. **(B)** Neutral lipid content was quantified with BODIPY staining by flow cytometry in lung alveolar macrophages (AMs) and interstitial macrophages (IMs) at the end of the study period. **(C)** Representative dot plot and quantification of SiglecF<sup>+</sup> AMs, SiglecF<sup>-</sup> IMs, SiglecF<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup> eosinophils, CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> monocytes (Mos) and CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup> polymorphonuclear neutrophils (PMNs) determined by flow cytometry in the lung of CC-LR recipient mice transplanted with control or  $M\phi^{DKO}$ BM. **(D)** Representative H&E staining of paraffin-embedded lung sections from CC-LR recipient mice transplanted with control (Ctl) or  $M\phi^{DKO}$ BM (left panel) and quantification of lesion sizes (mm<sup>2</sup>) (middle panel) or nodule subtypes (right panel). Tumor represents the sum of atypical adenomatous hyperplasia (AAH) and adenoma and adenocarcinoma lesions. **(E)** Representative sections of the lung of these mice stained for the mesenchymal marker Vimentin, the epithelial marker E-cadherin and DAPI (original magnification  $\times 5$ ). All values are means  $\pm$  SEM of at least one experiment ( $n=5$  independent animals). \* $p<0.05$  versus Ctl BM→CC-LR.

**Figure. 3**

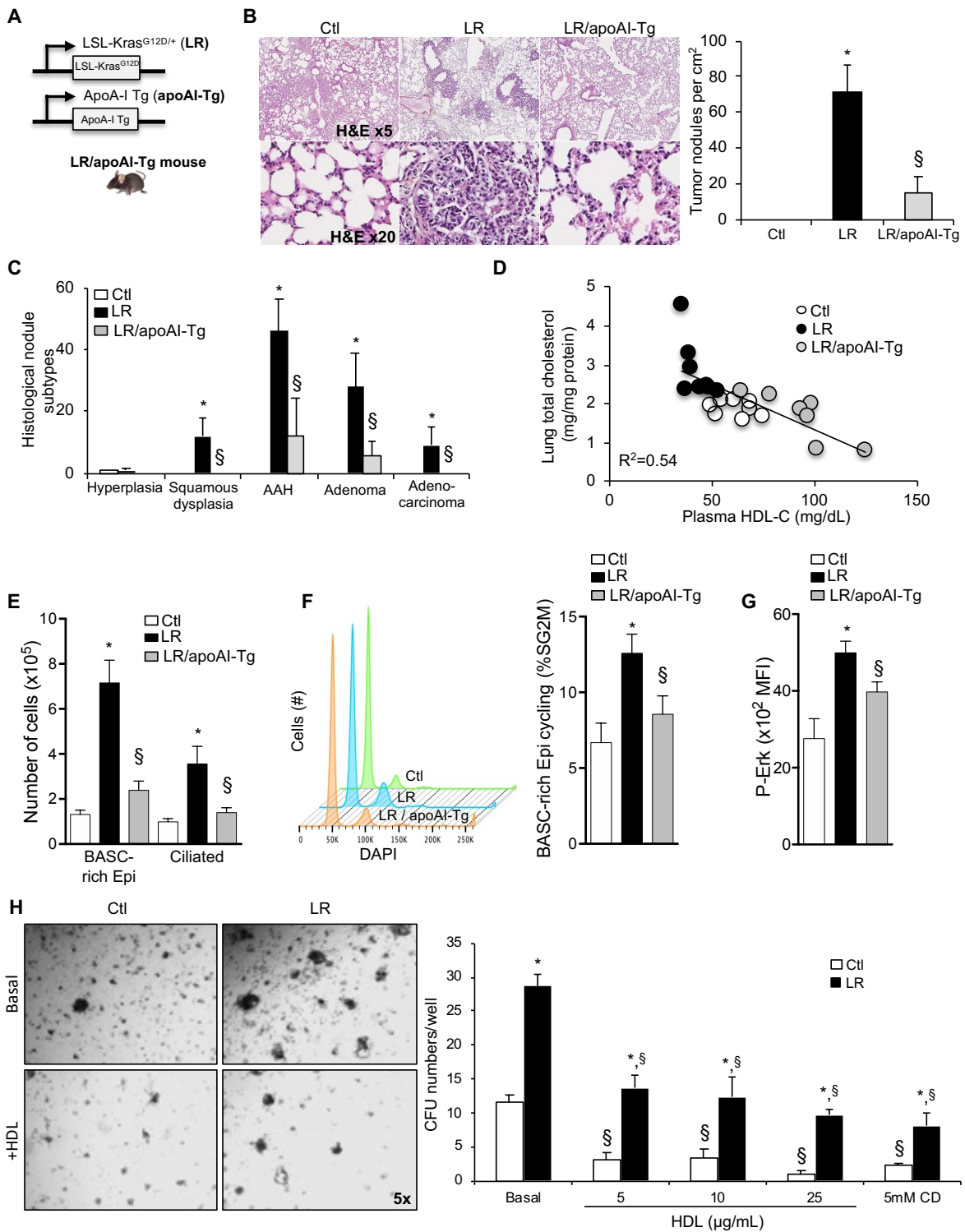


**Figure 3: Defective cholesterol efflux pathways in epithelial tumor progenitor cells exacerbates KRAS-driven tumorigenesis by influencing the transcriptional tumor landscape.**

(A) Experimental breeding outline. Tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> (CC-LR) mice were bred with *Abca1*<sup>fl/fl</sup>*Abcg1*<sup>fl/fl</sup> mice, referred as CC-LR<sup>DKO</sup>. Mice were injected with tamoxifen to initiate tumorigenesis and analyzed 6 weeks later. (B) Quantification of BODIPY neutral lipid content in BASC-rich Epi and ciliated cells or in alveolar macrophages (AMs) and interstitial macrophages (IMs) at the end of the study period. (C) Representative H&E staining of paraffin-embedded lung sections from CC-LR and CC-LR<sup>DKO</sup> mice (left panel) and quantification of lesion sizes (mm<sup>2</sup>) (middle panel) or nodule subtypes (right panel). Tumor represents the sum of atypical adenomatous hyperplasia (AAH) and adenoma and adenocarcinoma lesions. (D) Representative sections of the lung of these mice stained for epithelial

progenitor markers CCSP and SP-C and DAPI (original magnification x 20) (upper panel). Single-cell transcriptomes of mouse pulmonary and immune cells from CC-LR and CC-LR<sup>DKO</sup> mice 6 weeks after tumor initiation were analyzed from a pool of three samples in each group. The mean expression of alveolar type 2 marker (*Stpc*) in the lung from CC-LR and CC-LR<sup>DKO</sup> mice is projected onto t-SNE plots (lower panel). **(E)** Proportions of cell populations within total CD45<sup>-</sup> cells and proportions of each nonimmune cell populations as indicated for each group. Three populations of endothelial cells were combined, and red blood cells (RBC) were excluded from the analysis. **(F)** To identify the regulation of specific pathways between CC-LR and CC-LR<sup>DKO</sup> for the BASC-rich Epi cluster, differentially expressed genes were subjected to Gene set enrichment analysis (GSEA). The top 4 down- and up-regulated pathways are displayed. **(G)** Proportions of cell populations within total CD45<sup>+</sup> cells and proportions of each immune cell populations as indicated for each group. Two populations of monocytes were combined for analysis. **(H)** Quantification of AMs, IMs, eosinophils, monocytes (Mos) and polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in the lung of control (Ctl), CC-LR and CC-LR<sup>DKO</sup> mice by flow cytometry. **(I)** GSEA of the differentially expressed genes in the macrophage cluster. All Values are means  $\pm$  SEMs of four experiments (n=15-20 mice per group). \*p<0.05 versus control. §P<0.05 compared to tumor-bearing Kras<sup>G12D</sup> mice (CC-LR).

**Figure. 4**

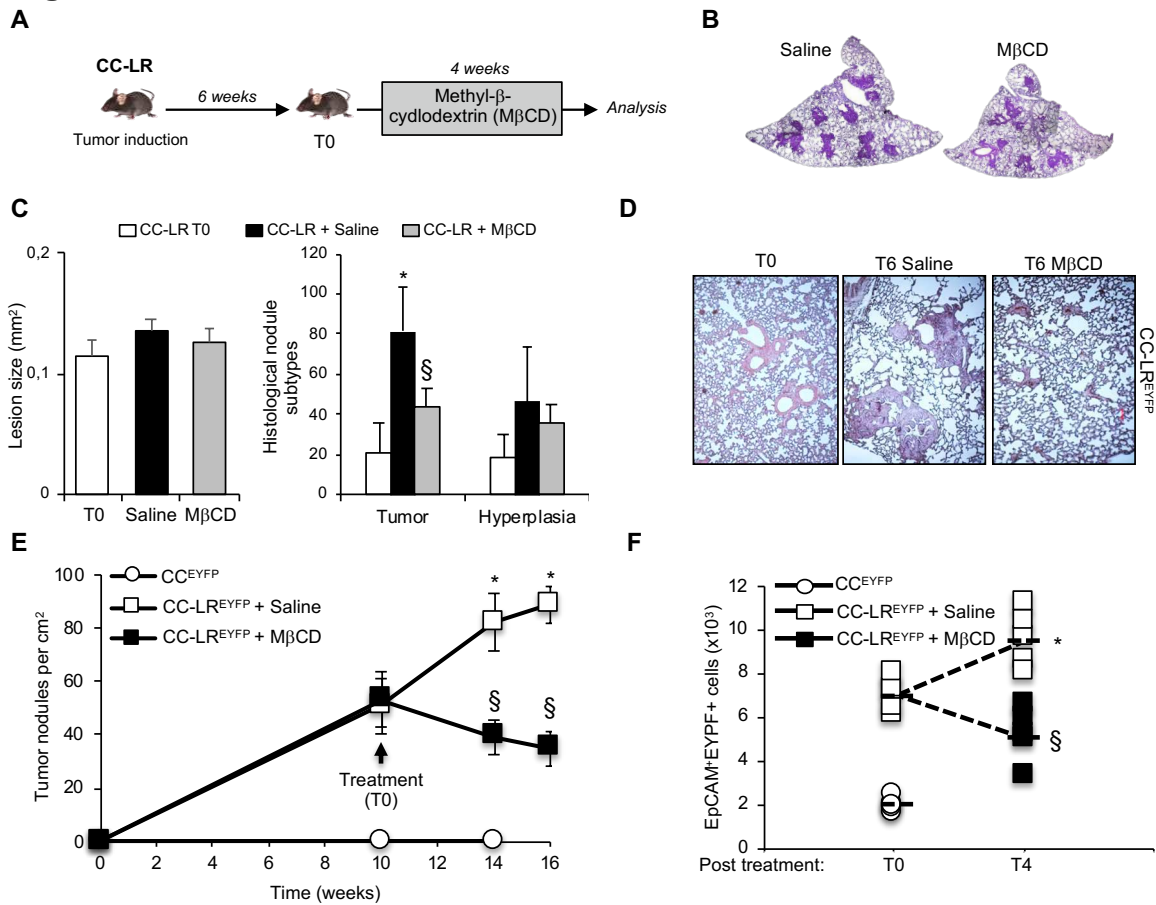


**Figure 4: Raising HDL levels by overexpression of human apoA-I prevents KRAS-driven lung tumorigenesis by limiting epithelial tumor progenitor cell growth.**

(A) Experimental breeding outline. ApoAI-Tg mice contain the human apolipoprotein A-I transgene. Mice were intranasally infected with adenovirus expressing Cre recombinase (AdCre) to initiate tumorigenesis. (B) Representative H&E staining of paraffin-embedded lung sections from control (Ctl) and tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice in absence (LR) or presence of the human apoA-I transgene (LR/apoAI-Tg) (original magnification x 5 and x 20) and quantification of tumor nodules (number per cm<sup>2</sup>) 6 weeks after tumor initiation. (C) Histological analysis of nodule subtypes in each group. AAH, atypical adenomatous

hyperplasia. **(D)** Correlation between plasma HDL-C levels and lung total cholesterol levels in these mice. **(E)** Quantification of C45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> BASC-rich Epi cells and C45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> ciliated cells by flow cytometry in control (Ctl) and tumor-bearing Kras<sup>G12D</sup> (LR) pulmonary cells in absence or presence of the apoAI transgene (LR/apoAI-Tg). **(F)** Representative histograms and quantification of the cell cycle of BASC-rich Epi cells by flow cytometry of DAPI staining and **(G)** expression of phosphoERK in the lung of these mice at the end of the study period. **(H)** Representative eCFUs (left panel) (original magnification x 5) and quantification of colony numbers per well (right panel) from tumor-bearing Kras<sup>G12D</sup> (LR) pulmonary cells after 8 days in culture in presence or absence of the indicated concentrations of HDL or 5mM of methyl- $\beta$ -cyclodextrin (CD). Results are means  $\pm$  SEM of cultures from at least three independent mice. \*p<0.05 versus Ctl. §P<0.05 compared to tumor-bearing Kras<sup>G12D</sup> pulmonary cell cultures without treatment.

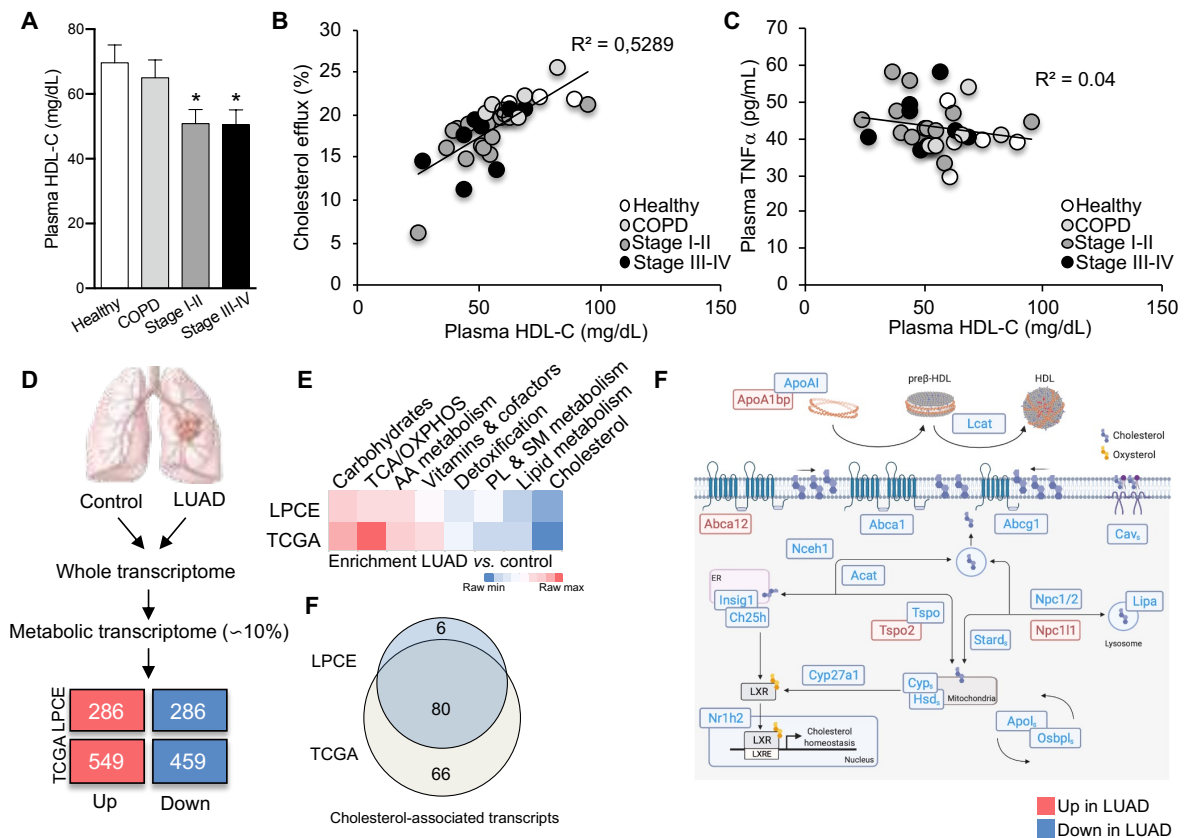
**Figure. 5**



**Figure 5: Cholesterol removal therapy with cyclodextrin reduces tumor burden in progressing tumor *in vivo*.**

(A) Experimental outline. Six weeks after tumor initiation (T0 group), tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> (CC-LR) mice were exposed once a week to saline and methyl-β-cyclodextrin (MβCD, 4g/kg of mouse) inhalation to follow tumor regression over a 4-week period. (B) Representative H&E staining of paraffin-embedded lung sections from these mice and (C) quantification of lesion sizes (mm<sup>2</sup>) (left panel) or nodule subtypes (right panel) of CC-LR treated with saline or MβCD. Tumor represents the sum of atypical adenomatous hyperplasia (AAH), adenoma and adenocarcinoma lesions. Ten weeks after tumor initiation (T0 group), reporter control (CC<sup>EYFP</sup>) or tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> (CC-LR<sup>EYFP</sup>) mice were exposed once a week to saline and methyl-β-cyclodextrin (MβCD, 4g/kg of mouse) inhalation to follow tumor regression over a 4/6-week period. (D) Representative H&E staining of paraffin-embedded lung sections from these mice. (E) Quantification of tumor nodules (number per cm<sup>2</sup>) throughout the study period. (F) Quantification of C45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>EYFP<sup>+</sup> cells determined by flow cytometry in the lung of CC-LR<sup>EYFP</sup> treated with saline or MβCD. All values are mean ± SEM and are representative of at least one experiment (n=4-5 independent animals). \*P<0.05 compared to T0 CC-LR. §P<0.05 compared to CC-LR control mice or CC-LR<sup>EYFP</sup> control mice.

**Figure. 6**



**Figure 6: Dysregulated local and systemic cholesterol efflux pathways in lung adenocarcinoma patients.**

(A) Quantification of human plasma HDL-cholesterol levels in stage I/II (n=14) or stage III/IV (n=8) LUAD patients and healthy (n=5) or chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (n=5) controls. (B) Correlation between plasma HDL-C levels and HDL-mediated cholesterol efflux capacity in LUAD patients and controls. Cholesterol efflux was quantified with similar volume of polyethylene glycol (PEG)-HDL (5%) for 6 h in THP-1 macrophages preloaded for 24h with 2  $\mu$ Ci/ml [ $^3$ H]-cholesterol. (C) Correlation between plasma HDL-C levels and plasma tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) levels in LUAD patients and controls. All values are mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05 compared to control. (D) An outline of the transcriptomic approach used to highlight significant dysregulated metabolic transcripts in human lung adenocarcinoma (LUAD). LUAD and adjacent normal tissue (control) were collected from patients undergoing surgical resection of primary tumors. Samples were processed and the output data were used for gene expression analyses. Two cohorts were analyzed: the publicly available cancer genome atlas (TCGA) gene expression dataset with 442 samples (n=399 stage I/II, n=43 controls) and the other one from the Laboratory of Clinical and Experimental Pathology (LPCE) biobank of Nice with 68 samples (n=57 stage I/II, n=11 controls). The number of significant up- and down-regulated transcripts in LUAD is indicated. (E) Metabolic pathway enrichment analysis of TCGA and LPCE gene expression datasets (upper panel) and Venn diagram highlighting the common regulated cholesterol metabolism genes between the two independent cohorts (lower panel). (F) Schematic representation of up-(red) and down-(blue) regulated cholesterol transcripts in LUAD patients highlighting perturbed cellular cholesterol efflux pathways.

**Supplemental material**

**Cholesterol efflux pathways hinder *KRAS*-driven non-small cell lung cancer**

6weeks post-tamoxifen	Ctl <sup>SRBI</sup> BM → CC-LR	M $\phi$ <sup>SRBI</sup> KOBM → CC-LR	Ctl <sup>CD36</sup> BM → CC-LR	M $\phi$ <sup>CD36</sup> KOBM → CC-LR
<b>Metabolic parameters</b>				
Plasma HDL-C (mg/dL)	45.3±1.4	50.4±2.6	77.1±5	60±3.6*
<b>Hematologic parameters</b>				
Spleen (mg)	71.2±5	70.3±4.5	72.2±6.2	90.4±7.4
WBC(x10 <sup>6</sup> /mL)	7.52±0.33	6.88±0.55	7.44±1.12	7.49±0.64
Neutrophils (%)	4.3±0.7	3.1±0.5	3.1±0.7	13.8±3*
Monocytes (%)	2.7±0.7	3.1±0.5	4±0.2	5.5±1.1
T-lymphocytes (%)	33.4±2.7	37.5±2.4	23.1±1.9	23.5±1.5
<b>Lung phenotype</b>				
Lung cholesterol (ng/mg tissue)	164.8±26.7	143.8±23.4	205.1±9.03	119.4±24.4**
Lung SP-D (ng/mg tissue)	12±1.9	7.8±1.1	9.5±1.7	6.1±0.6 <sup>s</sup>
<b>BAL phenotype</b>				
BAL cholesterol (μg/mL)	44.1±0.9	45.4±2.4	48.7±0.9	58.8±4.6*
BAL SP-D (μg/mL)	2.1±0.4	3±0.4	3.3±0.5	3.1±0.5
BAL PC (μg/mL)	287±16.1	288±22.7	303.6±12.2	340.8±9.3*

**Table S1: Effects of defective macrophage cholesterol flux on metabolic and inflammatory status in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice.**

Data are means ± SEM (n= 5 per group). Ctl, control; CD36, cluster of differentiation 36; SRBI, scavenger receptor class B type 1; M $\phi$ , macrophage; CC-LR, CCSP-CreER<sup>TM/+</sup> *Kras*<sup>LSL-G12D</sup> mice; HDL, high-density lipoprotein; SP-D, surfactant protein D; PC, phosphatidylcholine. \*P<0.05 versus Ctl<sup>CD36</sup>BM→CC-LR.

6weeks post-tamoxifen	Ctl BM → CC-LR	M $\phi$ <sup>DKO</sup> BM → CC-LR
<b>Metabolic parameters</b>		
Plasma HDL-C (mg/dL)	41.3±2	38.8±2.7
Plasma SP-D (ng/mL)	87.4±9	90.4±13.3
<b>Hematologic parameters</b>		
Spleen (mg)	81.4±9.6	110.3±1.5
WBC(x10 <sup>6</sup> /mL)	6.5±0.7	6.3±0.4
Neutrophils (%)	9±1.7	6.1±1.9
Monocytes (%)	5.9±0.6	6.2±0.7
T-lymphocytes (%)	22.5±0.9	19.6±1.8
<b>Lung phenotype</b>		
Lung cholesterol (ng/mg tissue)	340.5±32.2	361.3±146.3
Lung SP-D (ng/mg tissue)	2.8±0.4	3.8±0.9
Lung PC ( $\mu$ g/mg tissue)	17.9±4	14±1.5
<b>BAL phenotype</b>		
BAL cholesterol ( $\mu$ g/mL)	46±2.4	48.3±3.9
BAL SP-D ( $\mu$ g/mL)	2±0.2	1.8±0.4
BAL PC ( $\mu$ g/mL)	319.9±6.8	353.5±23

**Table S2: Effects of defective macrophage cholesterol efflux on metabolic and inflammatory status in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice.**

Data are means  $\pm$  SEM (n= 5 per group). Ctl, control; DKO, *Abca1 Abcg1* double knockout; M $\phi$ , macrophage; CC-LR, CCSP-CreER<sup>TM/+</sup> *Kras*<sup>LSL-G12D</sup> mice; HDL, high-density lipoprotein; SP-D, surfactant protein D; PC, phosphatidylcholine. \*P<0.05 versus Ctl<sup>DKO</sup>BM →CC-LR.

8weeks Ad <sup>Cre</sup> inhalation	Ctl	LR	LR/apoAI-Tg
<b>Metabolic parameters</b>			
Plasma human ApoAI (mg/dL)	ND	ND	203±21
Plasma HDL-C (mg/dL)	61.4±3.6	44.1±2.9*	92.2±8.9 <sup>§</sup>
Plasma AngII (pg/mL)	6.7±0.4	6.4±0.5	6.1±0.8
<b>Hematologic parameters</b>			
WBC(x10 <sup>6</sup> /mL)	11.6±1.0	13.6±2.6	12.5±0.7
Neutrophils (%)	3.6±0.4	4.0±1.2	2.9±0.5
Monocytes (%)	3.2±0.5	3.4±0.7	2.9±0.4
T-lymphocytes (%)	24.0±2.0	24.6±2.1	25.8±1.1
B-lymphocytes (%)	61.5±2.8	60.2±1.3	61.2±0.9
Platelets (x10 <sup>6</sup> /mL)	925±22	902±14	871±18
Red blood cells (x10 <sup>9</sup> /mL)	9.1±0.2	9.5±0.2	9.2±0.2
Plasma G-CSF (ng/mL)	1.4±0.6	0.9±0.1	1.2±0.2
Plasma IL-17 (pg/mL)	35.7±12.9	35.3±7.0	30.0±1.3
<b>Spleen phenotype</b>			
Spleen (mg)	80±5	79±5	84±5
Myeloid cells (% CD11b <sup>+</sup> Grl <sup>+</sup> )	8.3±0.4	9.4±0.4	8.8±0.3
<b>Lung phenotype</b>			
Lung cholesterol (mg/mg protein)	1.92±0.07	2.77±0.3*	1,68±0.24 <sup>§</sup>
Lung IL-17 (pg/mg tissue)	0.43±0.05	0.56±0.05	0.53±0.06

**Table S3: Effects of apoA-I transgene on metabolic and inflammatory status in lung-tumor bearing *Kras*<sup>G12D</sup> mice.**

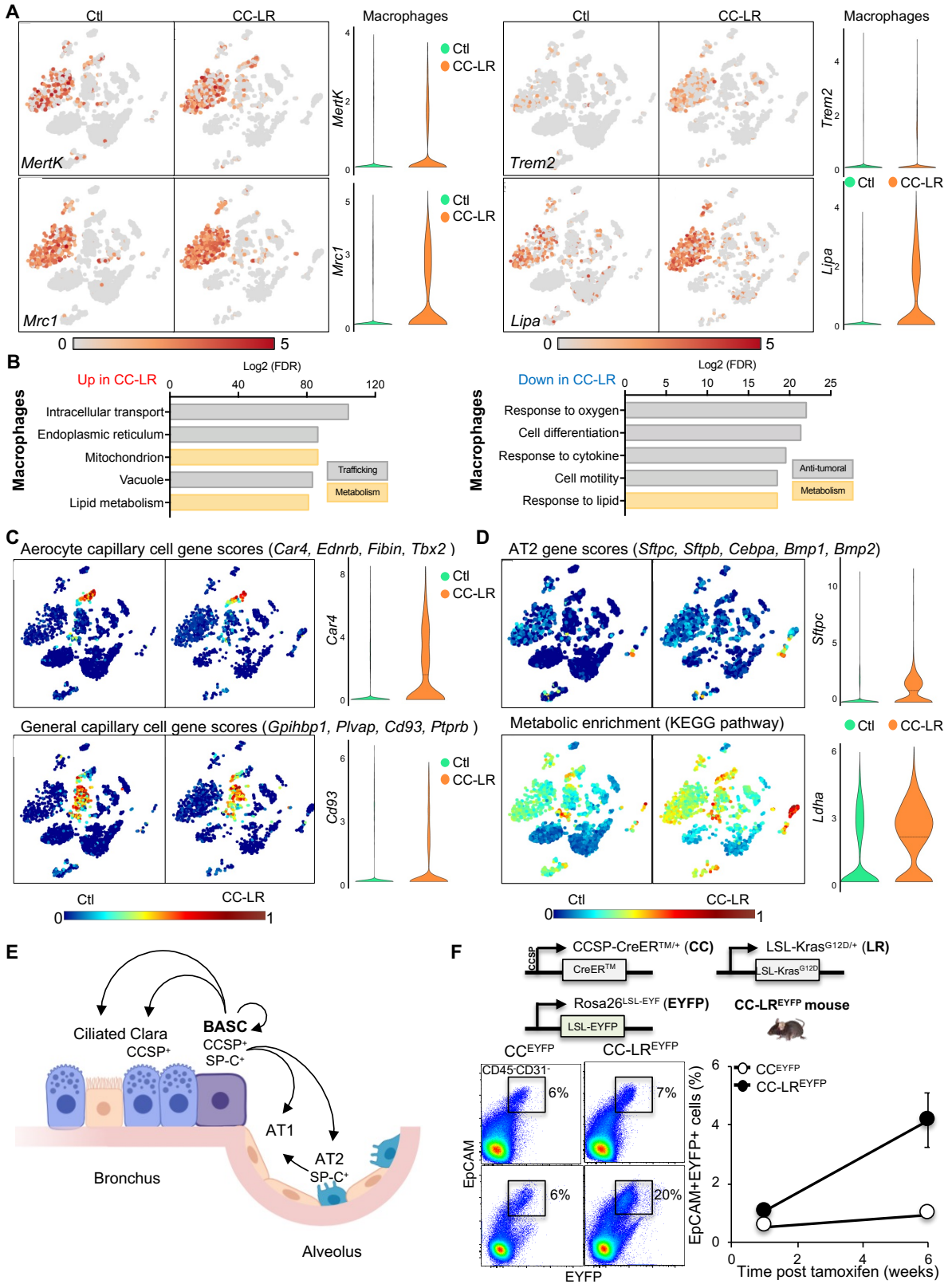
Data are means ± SEM (n= 5-8 per group). Ad<sup>Cre</sup>, adenovirus Cre; Ctl, control mice; LR, *Kras*<sup>LSL-G12D</sup> mice; HDL, high-density lipoprotein; ApoAI, apolipoprotein AI; AngII, angiotensin II; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; IL-17, interleukin 17. \*P<0.05 versus Ctl. <sup>§</sup>P<0.05 versus LR.

Subjects	Without lung adenocarcinoma			With lung adenocarcinoma			P value
	Healthy	COPD	Total	Stage I-II	Stage III-IV	Total	
Statut							
N, (all men)	5	5	<b>10</b>	14	8	<b>22</b>	
Current Smokers, n (%)	4 (80%)	5 (100%)	<b>9 (90%)</b>	5 (36%)	6 (75%)	<b>11 (50%)</b>	
Cholesterol, (mg/dL)							
Total	201.36±5.29	231.75±16.82	<b>216.55±9.73</b>	198.17±15.88	209.90±15.47	<b>202.44±11.4</b>	<b>0.17</b>
HDL	69.75±5.60	65.03±5.43	<b>67.39±3.76</b>	50.89±4.36	50.43±4.57	<b>50.72±3.16</b>	<b>&lt;0.001</b>
Cholesterol efflux, (%)							
matched by volume (25µL/500µL media)	20.71±0.57	21.74±1.05	<b>21.28±0.60</b>	16.97±0.96	17.07±1.25	<b>17.00±0.74</b>	<b>&lt;0.0001</b>
matched by concentration (25µg/mL)	21.63±0.79	19.97±2.05	<b>20.71±1.11</b>	18.48±1.20	19.02±0.57	<b>18.68±0.78</b>	<b>0.083</b>
Plasma HDL-phosphatidylcholine (mM)	1.70±0.23	1.30±0.09	<b>1.50±0.12</b>	1.15±0.04	1.15±0.13	<b>1.15±0.08</b>	<b>&lt;0.01</b>
Plasma ApoAI, (mg/dL)	139.6±23.0	127.0±22.8	<b>133.3±14.3</b>	63.8±7.0	83.7±8.2	<b>70.7±5.7</b>	<b>&lt;0.005</b>
Plasma SP-B, (ng/mL)	52.44±2.30	53.23±1.80	<b>52.83±1.38</b>	52.57±1.12	49.43±2.384	<b>51.41±113</b>	<b>0.32</b>
Plasma SP-D, (ng/mL)	90.3±33.0	110.8±20.2	<b>100.6±18.6</b>	99.7±23.7	87.8±25.0	<b>95.4±17.3</b>	<b>0.42</b>
Plasma Fibrinogen, (mg/dL)	268.9±40.5	244.1±30.7	<b>256.5±24.3</b>	263.0±30.0	284.6±23.1	<b>270.8±20.6</b>	<b>0.45</b>
Plasma AngII, (pg/mL)	2.60±0.94	3.34±0.54	<b>2.97±0.75</b>	3.02±0.32	2.71±0.53	<b>2.89±0.38</b>	<b>0.45</b>
Plasma TNFα, (pg/mL)	35.15±3.48	42.41±2.97	<b>38.18±2.52</b>	44.25±1.75	44.27±2.54	<b>44.26±1.41</b>	<b>&lt;0.05</b>

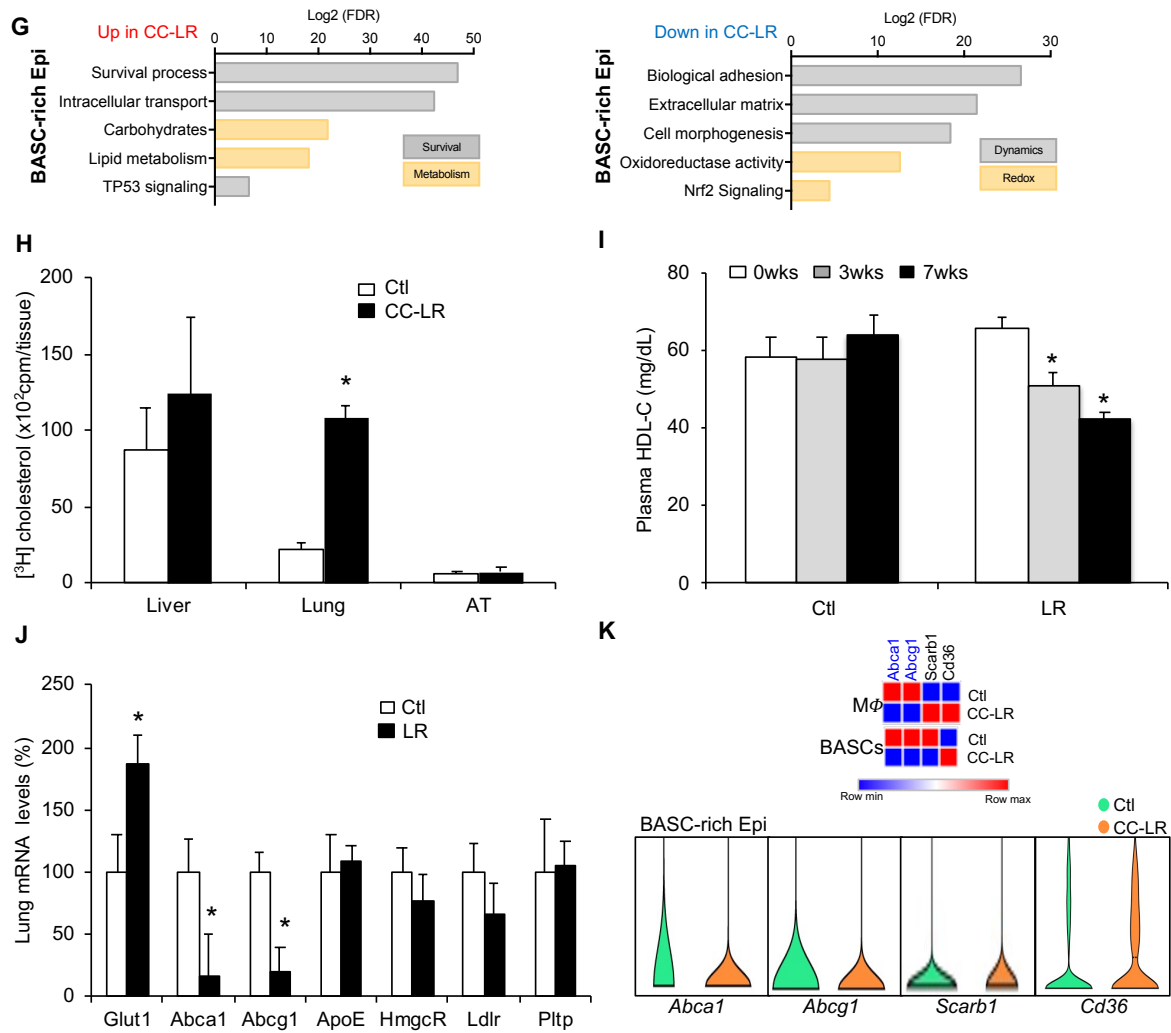
**Table S4: Participant characteristics, metabolic and inflammatory profiles for lung adenocarcinoma (LUAD) by case and control status.**

Data are presented as mean ± SEM. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; HDL, high-density lipoprotein; ApoAI, apolipoprotein AI; SP-B, surfactant protein B; SP-D, surfactant protein D; AngII, angiotensin II; TNFα, tumor necrosis factor α. Number (N) of subject, smoker status and P value are indicated.

**Figure. S1**



**Figure. S1**

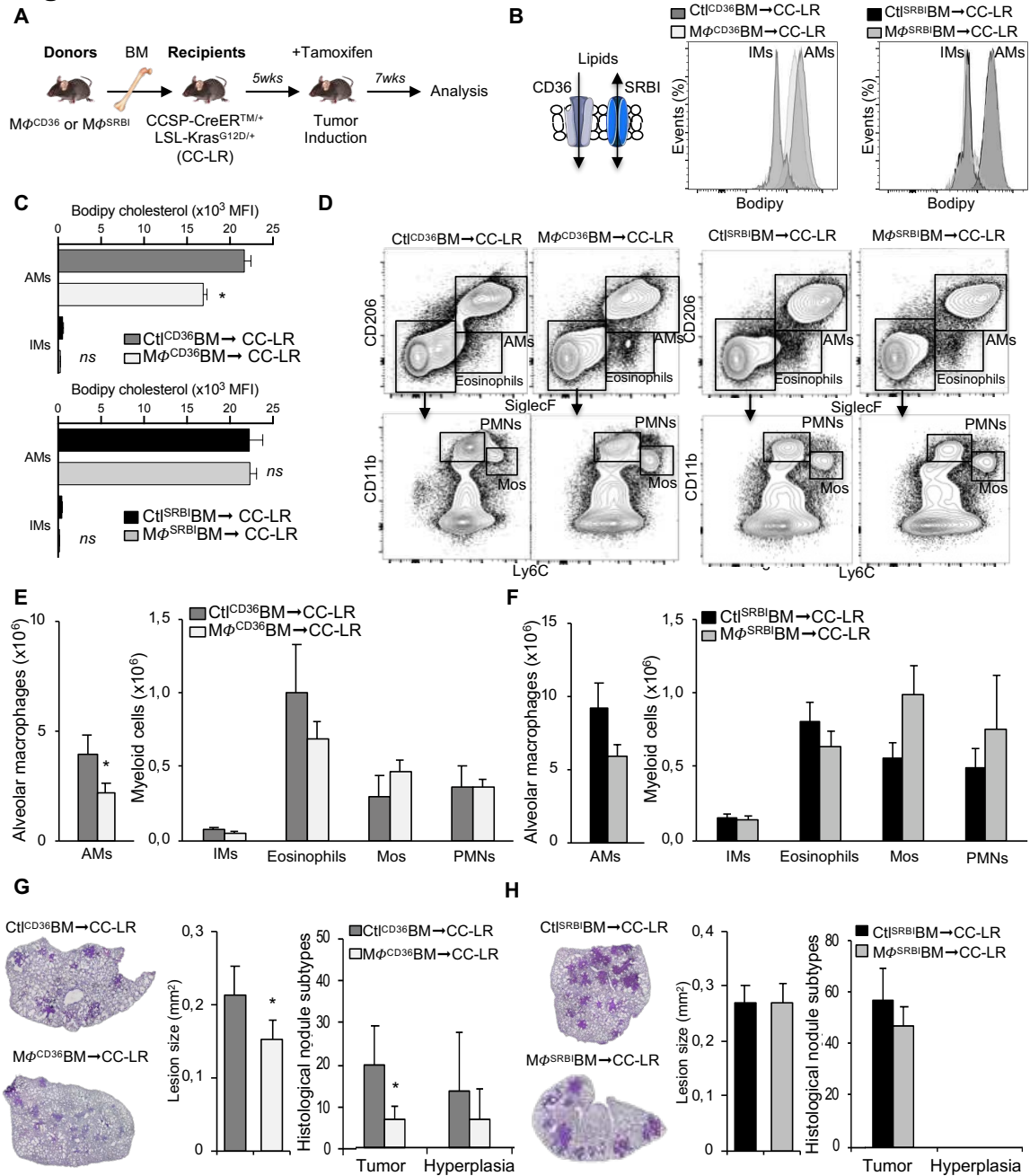


**Figure S1: Perturbed cholesterol efflux pathway in Kras-driven lung tumorigenesis.**

(A) The mean expression of macrophage markers (*MerK*, *Mrc1*, *Trem2* and *Lipa*) is projected onto t-SNE plots or presented as violin plots. (B) To identify the regulation of specific pathways between controls and CC-LR for the macrophage cluster, differentially expressed genes were subjected to GSEA. The top 5 up-(left) and down-(right) regulated pathways are displayed. (C) The expression of genes contributing to aerocyte capillary cell signature (*Car4*, *Ednrb*, *Fibin* and *Tbx2*, upper left graph) and general capillary cell signature (*Gpihbp1*, *Plvap*, *Cd93* and *Ptprb*, lower left graph) was retrieved and summarized as gene set score per cell. Gene set scores were overlaid on single cells on a tSNE plot to identify endothelial clusters with an enrichment of the indicated gene sets. The mean expression of some key genes in the specified gene sets (*Car4* and *Cd93*) is presented as violin plots of log-transformed gene expression (right panel). (D) The same analysis was performed for AT2 signature (*Sftpc*, *Sftpb*, *Cebpa*, *Bmp1* and *Bmp2*, left upper graph) and metabolism (KEGG pathway, left lower graph). Gene set scores were overlaid on single cells on a tSNE plot to identify epithelial clusters with an enrichment of the indicated gene sets. The mean expression of some key genes in the specified gene sets (*Sftpc* and *Ldha*) is presented as violin plots of log-transformed gene expression (right panel). (E) Illustration of the bronchoalveolar stem cells (BASCs) present at the bronchoalveolar duct junction and the fate and markers of these cell types. (F) Experimental lung adenocarcinoma reporter mouse. Rosa26<sup>LSL-EYFP</sup> mouse has a *loxP*-flanked STOP (LSL) sequence, followed by the enhanced yellow fluorescent protein gene (EYFP). When crossed with CCSP-CreER<sup>TM/+</sup> mice and after tamoxifen administration, the EYFP is expressed in epithelial cells (CC<sup>EYFP</sup>). Representative dot plot and

quantification of CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>EYFP<sup>+</sup> BASC-rich Epi cells determined by flow cytometry in the lung of controls (CC<sup>EYFP</sup>) and CC-LR<sup>EYFP</sup> mice. **(G)** To identify the regulation of specific pathways between controls and CC-LR for the BASC-rich Epi cluster, differentially expressed genes were subjected to GSEA. The top 5 up-(left) and down-(right) regulated pathways are displayed. **(H)** [<sup>3</sup>H] cholesterol quantification in the liver, lung and adipose tissue (AT) from control (Ctl) and tumor-bearing Kras<sup>G12D</sup> (CC-LR) mice 24h after inhalation of 4μCi of [<sup>3</sup>H] radiolabeled cholesterol. **(I)** Quantification of plasma HDL-cholesterol levels from control (Ctl) and tumor-bearing Kras<sup>G12D</sup> mice (LR) at 0, 4 and 9weeks after intranasal infection with adenovirus expressing Cre recombinase (AdCre) to initiate tumorigenesis. **(J)** mRNA expression of *Glut1*, *Abca1*, *Abcg1*, *ApoE*, *Hmgcr*, *Ldlr* and *Pltp* from pulmonary cells isolated at the end of the study period in these animals. Values were normalized to m36B4 and expressed as percentage over control (Ctl). **(K)** The mean expression of cholesterol flux genes (*Abca1*, *Abcg1*, *Scarb1* and *Cd36*) from control (Ctl) or tumor-bearing Kras<sup>G12D</sup> (CC-LR) cells is presented as heatmap or violin plots. Data are means ± SEM of at least one experiment (n=5-8 independent animals). \*P<0.05 compared to control.

**Figure. S2**

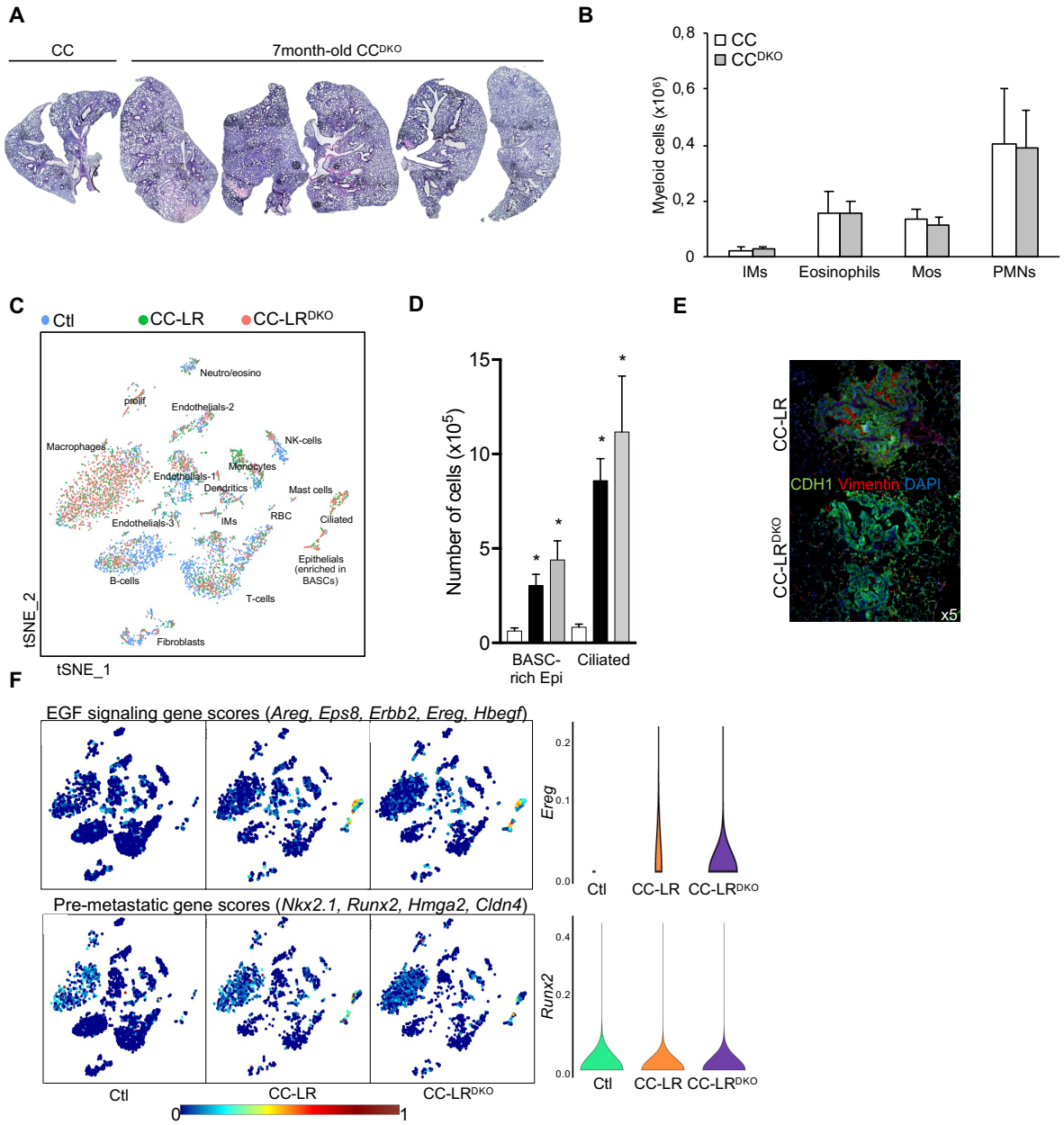


**Figure S2: Characteristics of macrophage CD36 and SRBI deficiency on lung tumor and tumor microenvironment in Kras-driven lung tumorigenesis.**

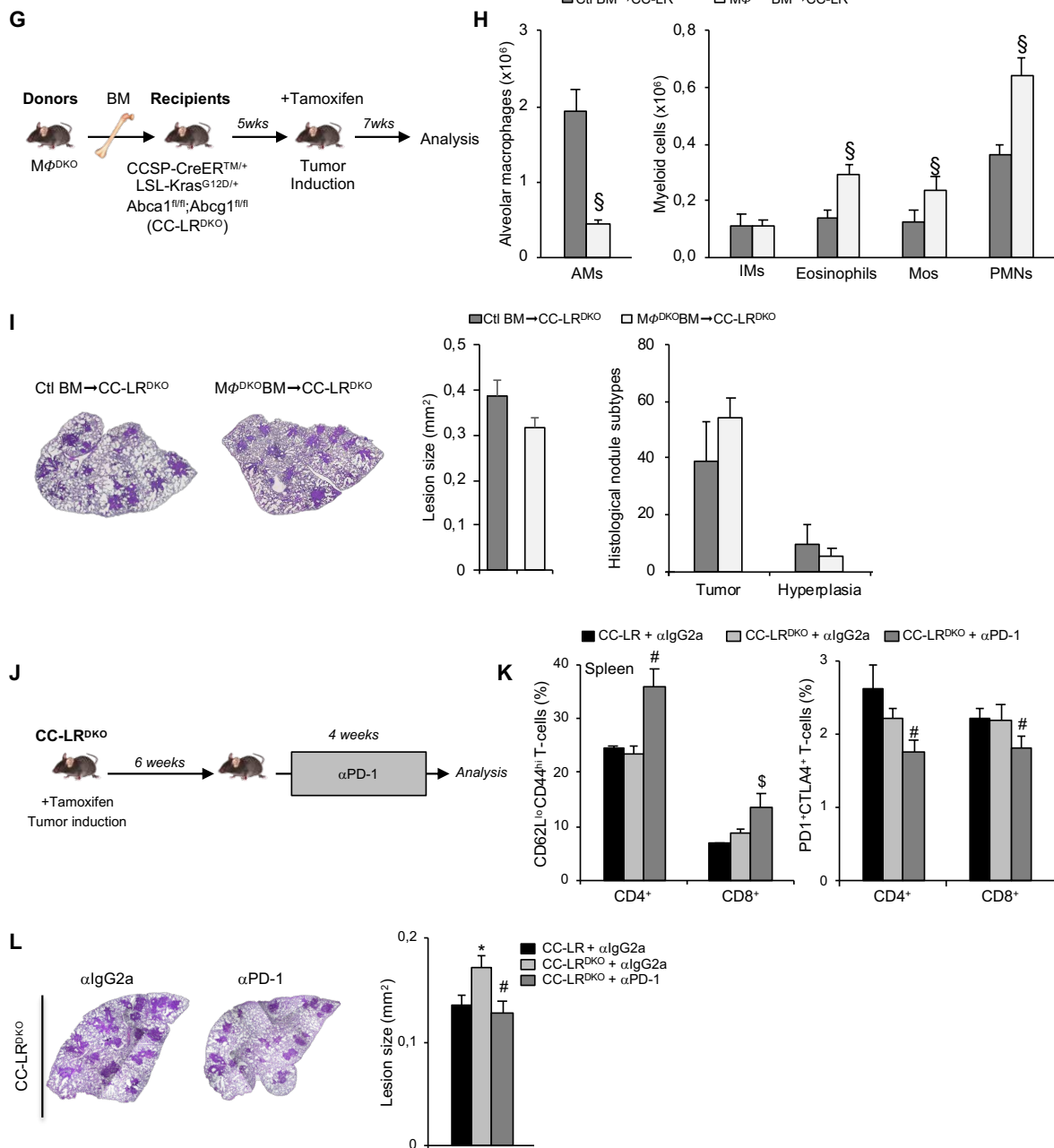
**(A)** Experimental outline. Bone marrow (BM) from  $LysM^{Cre-}CD36^{fl/fl}$  ( $Ct^{CD36}BM$ ) or  $LysM^{Cre+}CD36^{fl/fl}$  ( $M\phi^{CD36}BM$ ), or bone marrow (BM) from  $LysM^{Cre-}Scarb1^{fl/fl}$  ( $Ct^{SRBI}BM$ ) or  $LysM^{Cre+}Scarb1^{fl/fl}$  ( $M\phi^{SRBI}BM$ ) mice were transplanted into lethally irradiated tumor-bearing  $Kras^{G12D}$  (CC-LR) recipient mice. After a 5-week recovery period, the mice were injected with tamoxifen to initiate tumorigenesis and analyzed 7 weeks later. **(B)** Representative flux of the lipids through CD36 and SRBI (left panel) and histograms of neutral lipid content, a surrogate of cellular cholesterol, using the BODIPY probe by flow cytometry in lung alveolar macrophages (AMs) and interstitial macrophages (IMs) at the end of the study period (right panel) and **(C)** the quantification associated. **(D)** Representative dot plots of gating for AMs, IMs, eosinophils, monocytes (Mos) and polymorphonuclear neutrophils (PMNs) in the lung of CC-LR recipient mice transplanted with  $M\phi^{CD36}BM$ ,  $M\phi^{SRBI}BM$  or their respective controls. **(E and F)** Quantification of the number of each cell type in the lung of these mice. **(G)** Representative H&E staining

of paraffin-embedded lung sections from CC-LR recipient mice transplanted with control (Ctl) or  $M\phi^{CD36}$ BM (left panel) and quantification of lesion sizes ( $\text{mm}^2$ ) (middle panel) or nodule subtypes (right panel). Tumor represents the sum of atypical adenomatous hyperplasia (AAH) and adenoma and adenocarcinoma lesions. **(H)** Similar analysis was performed in CC-LR recipient mice transplanted with control (Ctl) or  $M\phi^{SRBI}$ BM. All values are means  $\pm$  SEM of at least one experiment (n=5 independent animals). \* $p < 0.05$  versus Ctl $^{CD36}$ BM $\rightarrow$ CC-LR.

**Figure. S3**



**Figure. S3**

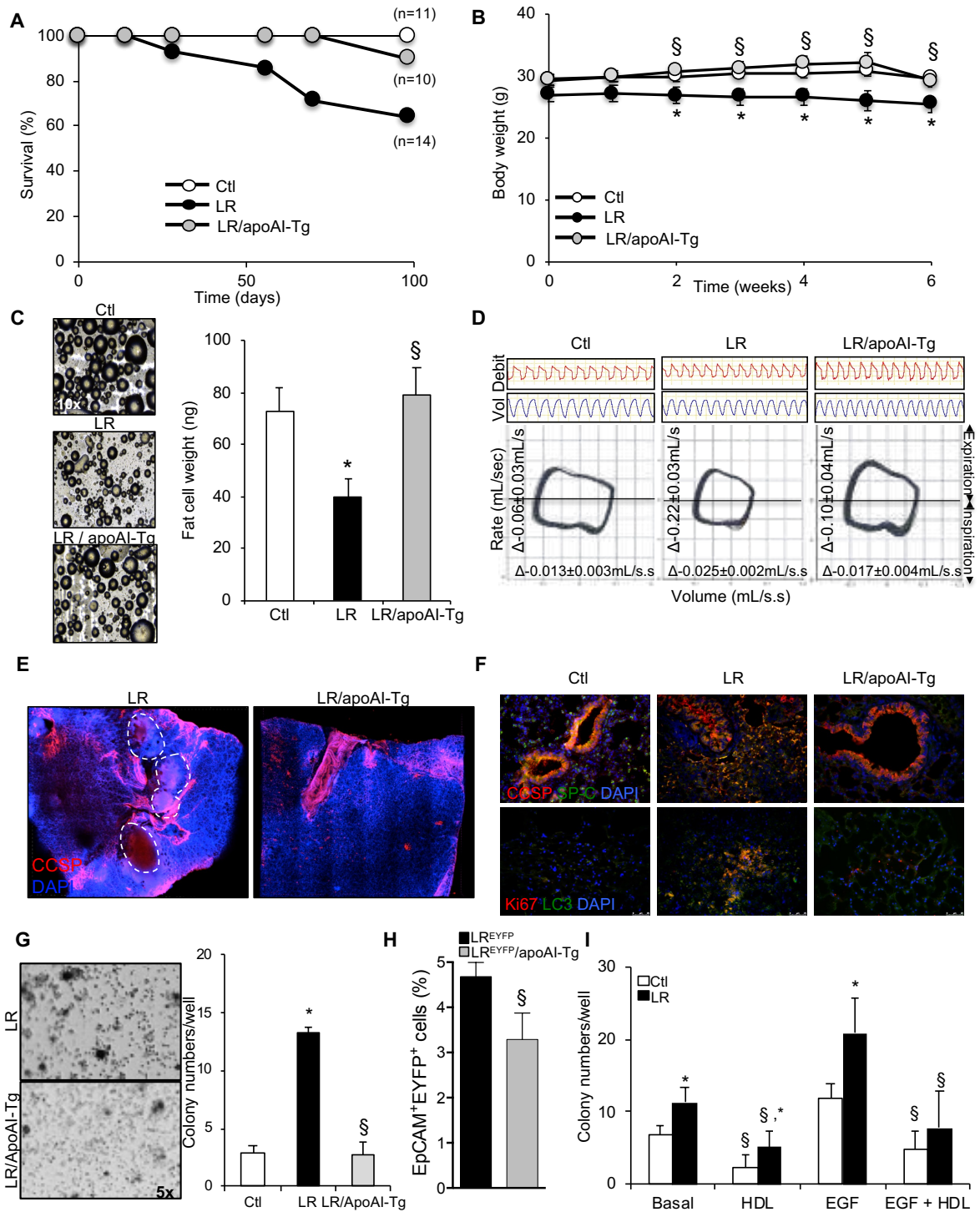


**Figure S3: Defective cholesterol efflux pathways in epithelial tumor progenitor cells dominates tumor growth in Kras-Driven tumorigenesis.**

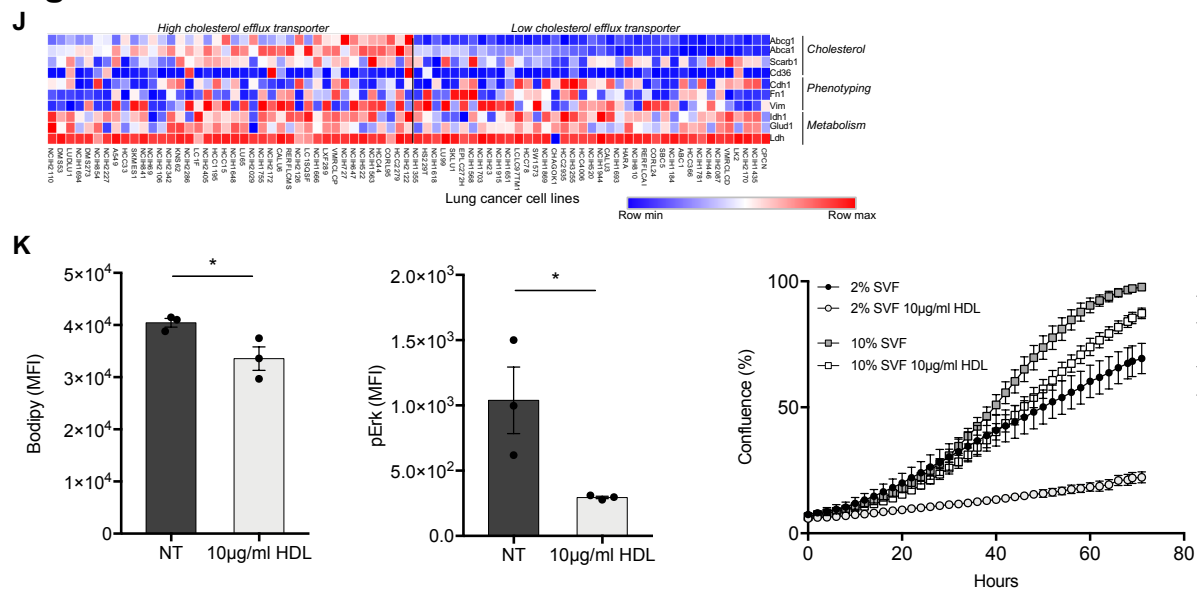
(A) Representative H&E staining of paraffin-embedded lung sections from 7month-old control (CC) and epithelial-specific *Abca1 Abcg1* deficient animals (CC<sup>DKO</sup>). (B) Quantification of the number of myeloid cells (IMs, eosinophils, monocytes (Mos) and polymorphonuclear neutrophils (PMNs)) in the lung of these mice at the end of the study period. (C) t-Stochastic neighbor embedding (tSNE) representing 7,247 cells profiled and extracted from control (Ctl) and tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> (CC-LR) without or with defective cholesterol efflux (CC-LR<sup>DKO</sup>) 6 weeks after tumor initiation (each cell was color-coded for its sample type of origin, left panel). (D) Quantification of C45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> BASC-rich Epi cells and C45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> ciliated cells by flow cytometry in the lung of control, CC-LR and CC-LR<sup>DKO</sup> mice. (E) Representative sections of the lung of these mice stained for the mesenchymal marker Vimentin, the epithelial marker E-cadherin and DAPI (original magnification x 5). (F) Gene expression patterns projected onto t-SNE plots of EGF signaling signature (*Areg*, *Eps8*, *ErbB2*, *Ereg* and *Hbergf*) and pre-metastatic gene signature (*Nkx2.1*, *Runx2*, *Hmga2* and *Cldn4*) (left panel). Violin plots of *Freg*

and *Runx2* gene expression in epithelial cells are depicted (right panel). **(G)** Experimental outline. Bone marrow (BM) from *LysM<sup>Cre</sup>-Abca1/Abcga<sup>fl/fl</sup>* (Ctl BM) or *LysM<sup>Cre+</sup>-Abca1/Abcga<sup>fl/fl</sup>* (*M $\phi$ <sup>DKO</sup>*BM) mice were transplanted into lethally irradiated tumor-bearing *Kras<sup>G12D</sup>* with defective cholesterol efflux pathways (*CC-LR<sup>DKO</sup>*) recipient mice. After a 5-week recovery period, the mice were injected with tamoxifen to initiate tumorigenesis and analyzed 7 weeks later. **(H)** Quantification of AMs, IMs, eosinophils, Mos and PMNs in the lung of *CC-LR<sup>DKO</sup>* recipient mice transplanted with control (Ctl) or *M $\phi$ <sup>DKO</sup>*BM. **(I)** Representative H&E staining of paraffin-embedded lung sections from these mice (left panel) and quantification of lesion sizes ( $\text{mm}^2$ ) (middle panel) or nodule subtypes (right panel). Tumor represents the sum of atypical adenomatous hyperplasia (AAH) and adenoma and adenocarcinoma lesions. **(J)** Experimental outline. Six weeks after tumor initiation, *CC-LR<sup>DKO</sup>* mice were exposed to anti-mouse PD-1 RPM1-14 antibody (200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) twice a week for 4 weeks. The control *CC-LR* and *CC-LR<sup>DKO</sup>* mice received an IgG2a isotype control 2A3 antibody (200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) twice a week. **(K)** Percentage of  $\text{CD62L}^{\text{lo}}\text{CD44}^{\text{hi}}$  of  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  T-cell subsets in the spleen (left panel) and  $\text{CTLA-4}^+\text{PD-1}^+$  of  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  T-cell subsets in the lung (right panel) was quantified by flow cytometry in these animals. **(L)** Representative H&E staining of paraffin-embedded lung sections from these mice and quantification of lesion sizes ( $\text{mm}^2$ ). Data are means  $\pm$  SEM of at least one experiment (n=4-5 independent animals). \* $P < 0.05$  compared to control.  $\S p < 0.05$  versus Ctl BM  $\rightarrow$  *CC-LR<sup>DKO</sup>*. # $P < 0.05$  compared to *CC-LR<sup>DKO</sup>* mice treated with vehicle.

**Figure. S4**



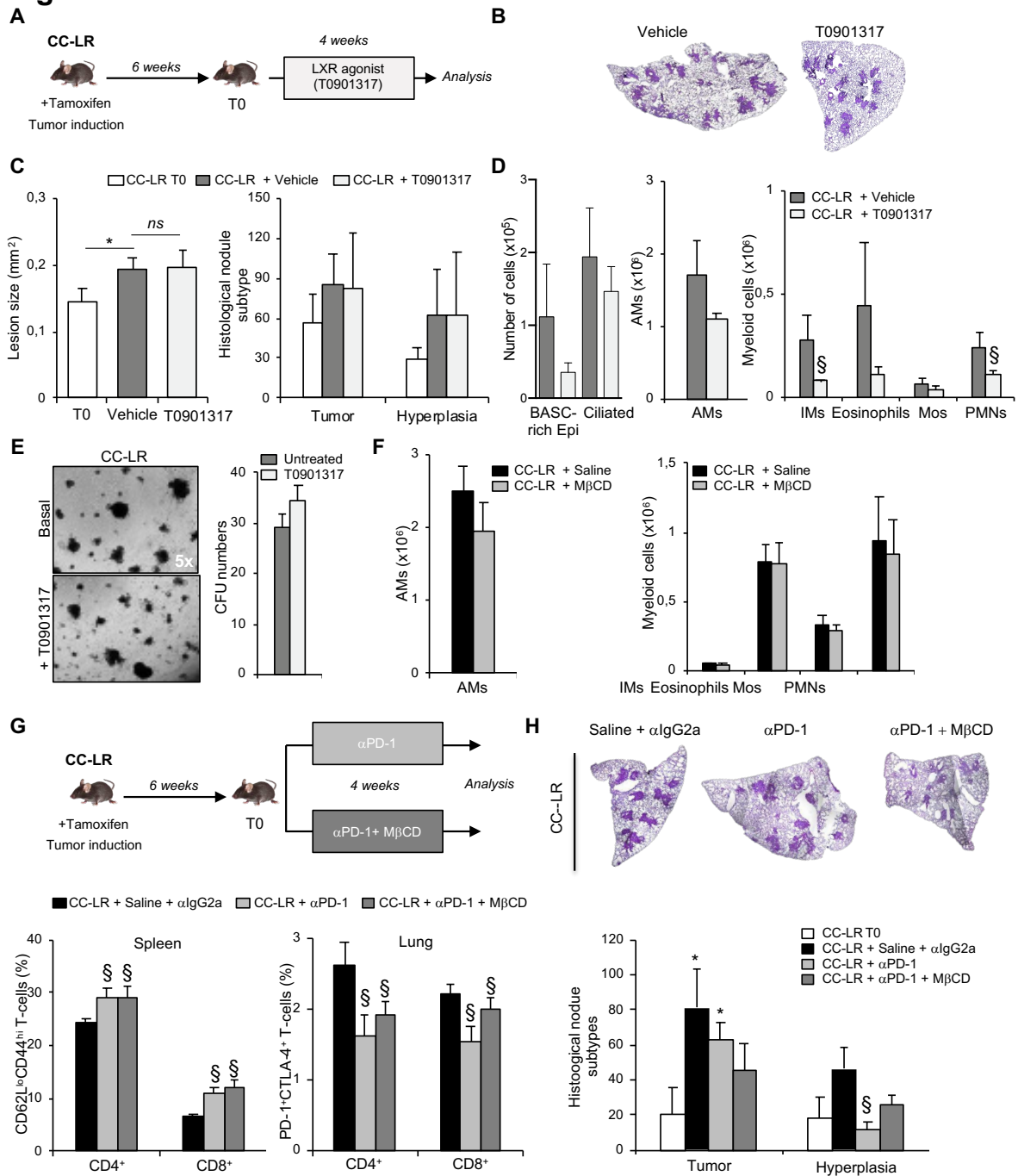
**Figure. S4**



**Figure S4: ApoA-I transgene overcomes the pathological consequences of the perturbed cholesterol efflux pathway in Kras-driven lung tumorigenesis by controlling the proliferation and expansion of Kras-driven epithelial tumor progenitor cells.**

(A) Overall survival curves of for control (white symbols), LR (black symbols) and LR/apoAI-Tg mice (grey symbols) after lung cancer induction and expressed as the percent of live mice on the days indicated. (B) Body weight curve of control (white symbols), LR (black symbols) and LR/apoAI-Tg mice (grey symbols) over the weeks after lung cancer induction. (C) Micrographs of isolated epididymal adipose cells of these animals at the end of the study period and fat cell weight expressed as ng. (D) Pneumotachographs generated by spirometry indicating breathing rate (i.e, amount of volume and debit of air that can inhaled and exhaled) in each group. (E) Representative 3-dimensional reconstruction of Z-stack confocal images of lung of these mice stained for CCSP and DAPI. (F) Representative sections of the lung of these mice stained for epithelial progenitor markers CCSP and SP-C (original magnification x 5, upper panel) and the proliferative marker Ki67, the autophagic marker LC3 (original magnification x 5, upper panel). (G) Representative epithelial colony-forming assay cultures (eCFUs) (left panel) (original magnification x 5) and quantification of colony numbers per well (right panel) from control (Ctl) and tumor-bearing  $Kras^{G12D}$  (LR) pulmonary cells in absence or presence of the apoAI transgene after 8 days in culture. (H) Quantification of CD45<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>EYFP<sup>+</sup> BASC-rich Epi cells determined by flow cytometry in the lung of LR<sup>EYFP</sup> and LR<sup>EYFP</sup>/apoAI-Tg mice 6weeks after lung cancer induction. (I) Quantification of colony numbers per well in eCFU cultures from tumor-bearing  $Kras^{G12D}$  (LR) pulmonary cells after 8 days in culture in presence or absence of 25µg/mL HDL and 10ng/mL of EGF. Data are means ± SEM of at least one experiment (n=5-8 independent animals). \*P<0.05 compared to control. §P<0.05 compared to tumor-bearing  $Kras^{G12D}$  mice. (J) Heatmap of the cholesterol-associated transcripts (*Abca1*, *Abcg1*, *Scarb1* and *Cd36*), phenotyping-associated transcripts (*Cdh1*,  *and *Vim*) and metabolism-associated transcripts (*ldh1*, *Glud1* and *Ldh*) from 79 different lung cancer cell lines (human and mouse) showed the up-(red) and down-(blue) regulated transcripts. (K) Quantification of BODIPY and pErk staining by flow cytometry, and cell proliferation assay of tumor-derived cell line from  $Kras^{G12D}$  mice untreated (NT) or treated with 10µg/ml of HDL.*

## Figure. S5

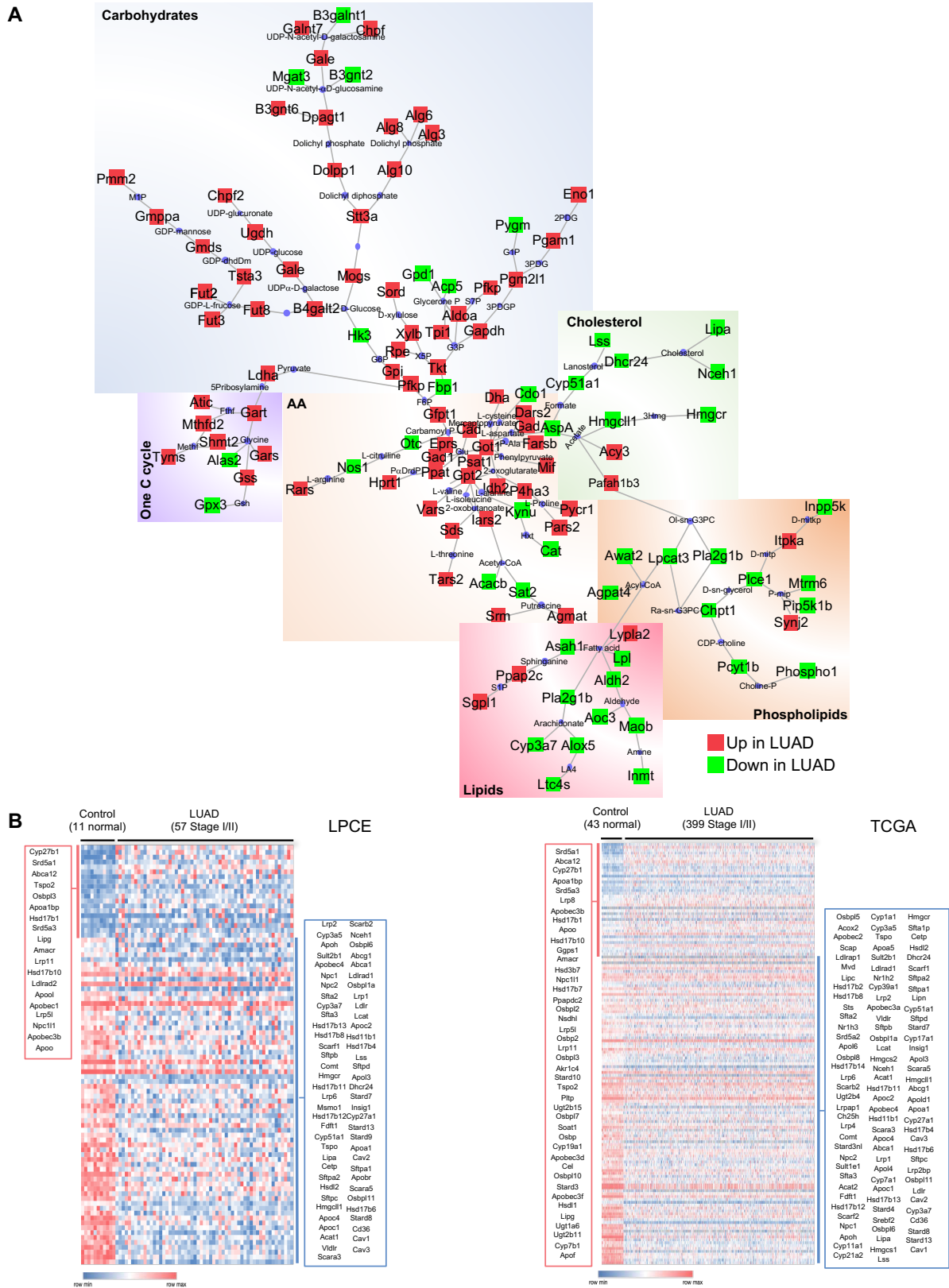


**Figure S5: Cholesterol removal, but not LXR activator treatment, reduces tumor burden *in vivo*.**

(A) Experimental outline. Six weeks after tumor initiation (T0 group), tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> (CC-LR) mice were exposed twice a week to vehicle and LXR agonist (T0901317, 50mg/kg of mouse) inhalation to follow tumor regression over a 4-week period. (B) Representative H&E staining of paraffin-embedded lung sections from these mice and (C) quantification of lesion sizes (mm<sup>2</sup>) (left panel) or nodule subtypes (right panel) of CC-LR treated with vehicle or T0901317. Tumor represents the sum of atypical adenomatous hyperplasia (AAH) and adenoma and adenocarcinoma lesions. (D) Quantification of CD31-CD45<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> epithelial progenitors, AMs, IMs, eosinophils, monocytes (Mos) and polymorphonuclear neutrophils (PMNs) by flow cytometry in the lung of CC-LR mice treated with vehicle or T0901317. (E) Representative eCFUs (left panel) (original magnification x 5) and quantification of colony numbers per well (right panel) from tumor-bearing *Kras*<sup>G12D</sup> (LR) pulmonary cells after 8 days in culture in presence or absence of 3μM LXR agonist (T0901317). Results are means ± SEM of cultures from at least three independent mice. (F) Quantification of alveolar macrophages (AMs), interstitial

macrophages (IMs), eosinophils, monocytes (Mos) and polymorphonuclear neutrophils (PMNs) by flow cytometry in the lung of CC-LR mice treated with saline or M $\beta$ CD. **(G) Upper panel.** Experimental outline. Six weeks after tumor initiation (T0 group), tumor-bearing Kras<sup>G12D</sup> (CC-LR) mice were exposed to anti-mouse PD-1 RPM1-14 antibody (200 $\mu$ g/mouse) twice a week with or without methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD, 4g/kg of mouse) once a week for 4 weeks. The control CC-LR mice received an IgG2a isotype control 2A3 antibody (200 $\mu$ g/mouse) twice a week and inhaled a saline solution once a week before sacrifice. *Lower panel.* Percentage of CD62L<sup>lo</sup>CD44<sup>hi</sup> of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell subsets in the spleen (left panel) and CTLA-4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell subsets in the lung (right panel) was quantified by flow cytometry of CC-LR mice treated with  $\alpha$ PD-1 with or without M $\beta$ CD. **(H)** Representative H&E staining of paraffin-embedded lung sections from these mice and quantification of nodule subtypes. Tumor represents the sum of atypical adenomatous hyperplasia (AAH) and adenoma and adenocarcinoma lesions. Data are means  $\pm$  SEM of at least one experiment (n=4-5 independent animals). \*P<0.05 compared to control. §P<0.05 compared to CC-LR mice treated with vehicle.

**Figure. S6**



transcripts from TCGA cohort (left panel) or LPCE cohort (right panel). Up-(red) and down-(blue) regulated cholesterol transcripts in LUAD compared to controls are listed ( $P < 0.05$ ).





**ARTICLE 2 :****« PINK1-dependent mitophagy restrains tumor growth: is it linked to the regulation of immuno-surveillance? »**

La mitochondrie est un élément essentiel du métabolisme énergétique et biosynthétique cellulaire, permettant de fournir l'énergie sous forme d'ATP ainsi que de nombreuses macromolécules nécessaires pour la survie et la croissance des cellules. Un métabolisme oxydatif élevé est responsable d'une forte génération de ROS, causée par la fuite des électrons durant leur transport par la chaîne respiratoire et de ce fait, la mitochondrie est à l'origine du stress oxydatif cellulaire. Ce stress peut engendrer une instabilité du génome mitochondrial et nucléaire, en plus d'endommager et de modifier les lipides et les protéines. Ces dommages sont alors susceptibles de conduire à la mort cellulaire dans laquelle la mitochondrie est un des acteurs principaux, dont la mort cellulaire programmée. Ainsi, la mitochondrie est à la fois une plateforme dans le processus de l'apoptose, mais elle peut également en être le déclencheur à la suite de différentes dysfonctions, telles que le stress oxydatif. Par conséquent, la mitochondrie joue un rôle central dans le devenir des cellules et est à l'intersection de la vie et de la mort cellulaire. Avant d'engager le processus le plus drastique conduisant à la mort cellulaire, les systèmes de surveillance mitochondriaux et cellulaires sont mis en place en fonction des dommages présents dans la cellule, permettant de maintenir l'intégrité du réseau mitochondrial, l'homéostasie mitochondrial et par conséquent cellulaire. Ainsi, la dégradation des mitochondries endommagées par la machinerie de l'autophagie est une des étapes clefs du contrôle qualité des mitochondries, assurée par la mitophagie.

Étant donné le rôle central de la mitochondrie dans les processus contrôlant la survie et la mort cellulaire, le dysfonctionnement de l'homéostasie mitochondrial dépendant de la mitophagie contribue au développement de cancer. Un faible niveau d'expression de PINK1, une sérine/thréonine kinase participant à l'induction de la mitophagie, a été montré dans les biopsies d'adénocarcinomes pulmonaires, comparé aux tissus sains adjacents (Lin et al., 2021), et son expression a été associée à un mauvais pronostic de survie des patients (Zhu et al., 2020). Une diminution de la mitophagie, dépendante de PINK1 serait alors envisageable dans les cancers de poumon, ce qui participerait à l'augmentation des mitochondries dysfonctionnelles au sein des cellules cancéreuses. Il a été démontré que l'altération des mitochondries était responsable, du moins en partie, du processus de métastase des adénocarcinomes pulmonaires vers les tissus périphériques ce qui diminue alors l'état général des patients et leur taux de survie (Chuang et al., 2020). Ainsi, la diminution de la mitophagie et l'augmentation des mitochondries dysfonctionnelles sembleraient participer au développement et à la progression des adénocarcinomes pulmonaires.

Cependant, le rôle de l'élimination des mitochondries endommagées dans les cellules cancéreuses du poumon a été étudié *in vitro*, mais les acteurs impliqués et l'impact de la mitophagie sur le développement des cancers du poumon *in vivo* restent peu connus. C'est ainsi que je me suis jointe à l'équipe dirigée par le Dr. Jean-Ehrland Ricci, dans laquelle j'ai pu être encadrée par le Dr. Sandrine Marchetti, avec qui nous avons étudié le rôle de la mitophagie au cours de la progression des cancers de poumon. Ces travaux sont le fruit d'un an de travail uniquement, au cours de laquelle nous avons généré les différentes lignées cellulaires modifiées et utilisées dans cette étude. Cela ne représente donc que des résultats préliminaires et de nombreuses expériences sont requises afin d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires.

## PRELIMINARY RESULTS

**PINK1-dependent mitophagy restrains tumor growth: is it linked to the regulation of immuno-surveillance?**

**Emma Guilbaud<sup>1,2,3</sup>, Sonia Núñez-Vázquez<sup>1,2</sup>, Pauline Meola<sup>1,2</sup>, Rachel Paul-Bellon<sup>1,2</sup>, Nathalie Vaillant<sup>1,3</sup>, Johanna Chiche<sup>1,2</sup>, Els Verhoeyen<sup>1,2</sup>, Christelle Boscagli<sup>4</sup>, Sandra Lacas-Gervais<sup>4</sup>, Sandrine Marchetti<sup>1,2\*</sup>, Jean-Ehrland Ricci<sup>1,2\*</sup>.**

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1065, Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), 06204 Nice, France (E.G., S.N.V., P.M., R.P.B., N.V., S.M., J.E.R.)

<sup>2</sup> Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, 06204 Nice, France (E.G., S.N.V., P.M., R.P.B., S.M., J.E.R.)

<sup>3</sup> Atip-Avenir, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OncoAge, 06204 Nice, France (E.G., N.V.)

<sup>4</sup> Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA), Microscopie et Imagerie Côte d'Azur (MICA), 06106 Nice, France (C.B., S.L.G.)

\*These authors contributed equally to this work

Address correspondence to S.M and J.E.R:

[Sandrine.Marchetti@unice.fr](mailto:Sandrine.Marchetti@unice.fr), [Jean-Ehrland.Ricci@unice.fr](mailto:Jean-Ehrland.Ricci@unice.fr)

## Abstract

The role of damaged mitochondria elimination in lung cancer cells has been studied *in vitro*, but how mitophagy impacts lung tumor development *in vivo* remains sparse. A low level of PINK1 was associated to poor prognosis and was correlated to immune infiltration. In the present study, we demonstrated *in vitro* the ability of two murine lung cancer cell lines, LLC-1 and KP cells, to remove damaged mitochondria by mitophagy following mitochondrial damages. This process relies on PINK1 activity, but not PARKIN which is not expressed in those cells. Using immunocompetent mice, we identified that disruption of PINK1-dependent mitophagy, alongside of ATG7 loss as a complete autophagy/mitophagy inhibition, significantly increased LLC-1 tumor growth *in vivo*. PINK1-deficient tumors accumulated aberrant mitochondria and reduced inflammatory cytokines production, correlating with reduction of neutrophil infiltration. Those preliminary data suggest that PINK1-dependent PARKIN-independent mitophagy in lung cancer cells contributes to the control of lung tumor growth. We hypothesize that it may be based, at least in part, on the induction of an effective anti-cancer immune surveillance. We will formally test this hypothesis and investigate the underlying molecular mechanism.

## Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide, with non-small cell lung cancer (NSCLC) accounting for up to 85% of all cases (Sung et al., 2021). Most of patients are diagnosed with late-stage lung cancer and the average 5-year survival rate is around 20% and drops to 6% for metastatic lung cancers (Howlander et al., 2021). Considerable progress has been made in the development of targeted therapies and immunotherapies, however, patients harboring V-KI-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) mutations, which occur in 30% of NSCLC cases, have limited treatment options (Yang et al., 2019). Thus, a better biological insights of cancer cells to exploit cancer vulnerabilities are essential.

Mitochondria play fundamental role in cells by regulating cellular energetic and biosynthetic metabolism, reactive oxygen species (ROS) production, innate immune response, cell signaling and cell death (Javadov et al., 2020). Given those essential roles of mitochondria, pathways regulating mitochondrial functions are crucial to enable cellular adaptation in response to various stresses. For example, the control of mitochondrial activity relies, at least in part, on the selective elimination of mitochondria by the machinery of autophagy (Pickles et al., 2018; Vara-Perez et al., 2019). Autophagy is a catabolic process that deliver cytoplasmic material enclosed in vesicles, termed autophagosomes, to lysosomes for degradation. This process can act in a non-selective manner to promote cell survival during energy crisis by recycling biomolecules, or by eliminating selectively targeted organelles (Galluzzi et al., 2017). Thus, autophagy can eliminate damaged, dysfunctional, or superfluous mitochondria, a process called mitophagy. The most-characterized mitophagy pathway relies on PTEN-induced kinase 1 (PINK1) and the ubiquitin E3 ligase PARKIN, that belongs to the RING-between-RING (RBR) family. Outer mitochondrial membrane proteins, polyubiquitinated by PARKIN, are recognized by Ub- and LC3-binding autophagic receptors, leading to the removal of the damaged mitochondria. The observation that PARKIN is not expressed in many cancer cell types, and especially in lung cancer, implies the existence of others molecular actors (Bernardini et al., 2017; Villa et al., 2017). Indeed, we previously demonstrated that ARIH1, another RBR ubiquitin E3 ligase was inducing mitophagy in a PINK1-dependent manner in human lung cancer cell types (Villa et al., 2017).

Mitophagy in cancer cells maintains healthy mitochondria which, at least in part, reduces cytosolic double-stranded mitochondrial DNA (mtDNA) that usually triggers type I IFN response and inflammatory cytokines secretion, thus preventing anti-tumoral response (Li et al., 2016; Decout et al., 2021). Mitophagy also promotes tumor cell resistance to chemotherapy, as we and others previously demonstrated *in vitro* that deletion of key mitophagic or autophagic regulators sensitized cancer cells to chemotherapy-induced death (Abdrakhmanov et al., 2019; Villa et al., 2017). In contrast, it has also been demonstrated that inhibition of the mitophagy receptor BNIP3-, or PINK1-mediated mitophagy increased dysfunctional mitochondria, ROS production and stabilization of HIF-1 $\alpha$ . This cellular response leads to cancer cell metabolic reprogramming toward aerobic glycolysis, the so-called Warburg effect and subsequently tumor progression in a mouse model of mammary carcinoma or proliferation of glioblastoma cells, respectively (Agnihotri et al., 2016; Chourasia et al., 2015). In line with these results, overexpression of PINK1 was sufficient to abolish the HIF-1 $\alpha$ -induced Warburg effect, therefore suppressing colorectal tumor growth (Yin et al., 2021). Furthermore, while lower PINK1 expression is associated with poor prognostic in lung cancer (Lin et al., 2021), mitochondrial dysfunction has been observed during the process of lung adenocarcinoma metastasis *in vivo* (Chuang et al., 2020), highlighting the alteration of the mitochondrial degradation during lung cancer progression and metastasis.

In the present study, we explored the role of PINK1-mediated mitophagy during lung cancer development using immunocompetent mice models.

## Results

**Mitochondrial uncoupling agents promote mitophagy in lung cancer cells in an ATG7-dependent manner.** We previously demonstrated the importance of mitophagy in cell survival of human lung cancer cell lines in response to chemotherapies *in vitro* (Villa et al., 2017), however the impact of mitophagy during lung cancer development *in vivo* in an immunocompetent environment remains unclear. To address this question, we first determined the ability of two murine lung cancer cell lines to remove damaged mitochondria upon treatment with mitochondrial uncoupling agents. Lewis Lung Carcinoma (LLC-1) cells and tumor-derived cell line from *Kras*<sup>G12D/+</sup>; *p53*<sup>-/-</sup> mouse (KP) were treated with Oligomycin and Antimycin A (O/A), a well-known combination of mitophagy-inducing agents targeting ETC complex V and complex III, respectively. O/A treatment promoted the reduction in a time-dependent manner of MTCO1, SDHB and COX IV, three mitochondrial proteins known to be degraded during mitophagy (Villa et al., 2017) (Fig. 1A and 1B). Because reduction in protein expression could reflect a decrease in transcription and translation machineries following uncoupling treatments rather than removal of mitochondria, we then quantified mitochondrial DNA (mtDNA) using quantitative PCR to analyze the mitochondrial mass in cells (Gonzalez-Hunt et al., 2016). The mitochondrial-to-nuclear DNA ratio was lower following O/A treatment in both LLC-1 and KP cell lines (Fig. 1C). Consistently, the mitochondrial network of KP cells was fragmented after 24 hours of O/A treatment, as demonstrated by COX IV immunostaining, with a greater loss of the COX IV protein at 48h of treatment (Fig. S1A).

We next sought to determine the contribution of autophagic structures during the process of mitochondria removal by analyzing the conversion of LC3-I to LC3-II (lipidated LC3), which is associated to the autophagosomal membrane. We observed an increase in the LC3-II/LC3-I ratio in cells treated with mitophagy-inducing agents compared to control cells. Inhibition of the autophagy flow by the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor, bafilomycin A1 (BAF), further increased this ratio (Fig. S1B and S1C). To unravel the implication of the LC3-II conversion in mitochondrial degradation following uncoupling treatments, we studied the co-localization of LC3 with the inner mitochondrial membrane protein, prohibitin-2 (PHB2). First, PHB2 immunostaining upon O/A treatment was reduced (Fig. 1D, top), which is consistent with the observation of COX IV loss (Fig. S1A). Then, co-localization of LC3 and PHB2 was higher in KP cells treated with the combination of O/A and BAF in comparison to cells treated with BAF alone (Fig. 1D, bottom and 1E). Indeed, in these settings, images of transmission electron microscopy (TEM) revealed the presence of mitochondria (M) in autophagosomes (AP) following O/A treatment (Fig. 1F, right), whereas non-specific cytoplasmic material was observed in autophagosomes in untreated cells (Fig. 1F, left).

Because uncoupling agents promoted both the removal of mitochondria and LC3 conversion accompanied with autophagosome-sequestered mitochondria, mitochondrial degradation appeared to rely on the autophagy machinery. Thus, while mitochondrial mass was lower upon O/A treatment as showed with reduced mtDNA (Fig. 1C), BAF treatment prevented this loss for each time of treatment (Fig. S1D), suggesting a lysosomal degradation of mitochondria. We next took advantage of this last observation to stably express the mitochondria-targeted Keima protein (mito-Keima) in LLC-1 and KP cells (Katayama et al., 2011). Indeed, mitophagy could be monitored using mito-Keima, a biosensor of mitochondrial degradation by the lysosomes. Mito-Keima is a pH sensitive fluorophore targeted to the mitochondrial matrix, allowing the discrimination of cytosolic mitochondria, with a green fluorescence excitation (488 nm), from mitochondria engaged to lysosomes for degradation, converted to red (561nm). Since mito-Keima is resistant to degradation within lysosomes, we observed mitophagy during treatment with uncoupling agents using both confocal imaging, as showed by the red mito-Keima puncta (Fig. S1E), or fluorescence-activated cell sorting (FACS) (Lazarou et al., 2015). The percentage of cells with a spectral shift from green to red of the mito-Keima (Fig. 1G) or the ratio of the mean intensity fluorescence (MFI) of 561nm to 488 nm, representing the mitophagy index (Fig. S1F), demonstrated the ability of the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP), O/A and the ionophore valinomycin to induce mitophagy in LLC-1 and KP cells, in a time-dependent manner.

Importantly, the mito-Keima spectral shift was completely reduced by treatment with BAF, which by inhibiting the acidification of lysosome abrogates subsequently the mito-Keima fluorescence shift (**Fig. S1G**).

To further investigate the role of autophagy-mediated mitochondrial degradation, we generated *Atg7*-deficient LLC-1 and KP cells using Nanoblades, a protein-delivery vector that allows the transfer of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins (RNPs) to cell lines ([Mangeot et al., 2019](#)). Isolated and individual clones with undetectable levels of ATG7 protein and LC3-II lipidated form, since ATG7 is required for LC3 conversion ([Galluzzi et al., 2017](#)), were then pooled (ATG7#2) (**Fig. S1H**). Control cells were generated and isolated following identical procedures and named Crizi control. Then, after 48h of treatment with uncoupling agents, the loss of ATG7 strongly reduced mitophagy monitored using mito-Keima in both cell lines compared to their respective controls (**Fig. 1H and S1I**), indicating that mitophagy is occurring through conventional autophagy machinery in LLC-1 and KP cells. Altogether, these findings reveal that ATG7-dependent mitophagy is responsible for the degradation of mitochondria in murine lung cancer cell lines upon treatment with mitochondrial damaging agents.

**Mitophagy of lung cancer cells induced by mitochondrial depolarization requires PINK1 activity but not PARKIN.** PARKIN is critical for the canonical mitophagy activation signaling cascade in several cell lines, however, PARKIN protein expression and mRNA were undetectable in LLC-1 and KP cells (**Fig. 2A and 2B**), as described in many others cancer cell lines ([Bernardini et al., 2017](#)). Because mitophagy is still occurring in these cells upon uncoupling treatments, and we previously demonstrated the overexpression of another RBR E3 ligase ARIH1 ([Villa et al., 2017](#)) which fulfill the function of PARKIN in mediating mitophagy in human lung cancer cells, we interrogated the ARIH1 expression in LLC-1 and KP cells. ARIH1 mRNA and protein expressions were detected in both lung cancer cell lines (**Fig. 2A and 2B**). To determine the role of ARIH1 in mediating mitophagy we could not knock the gene out as it is a fitness gene ([Hart et al., 2015](#)). We therefore chose to over-expressed (OE) ARIH1 in LLC-1 cells or to OE PARKIN as control and we determined their impact on mitophagy (**Fig. 2C**). We observed that uncoupling treatments increased the extend of mitophagy compared to controls (pLZRS) regardless of the RBR over-expressed (**Fig. 2D and S2A**). We also noticed that once expressed in cells, PARKIN seems more efficient than ARIH-1 to mediate mitophagy.

As mitophagy-induced by any of these RBR requires the Ser/Thr kinase protein PINK1 ([Villa et al., 2017](#)), we next investigate PINK1 expression upon mitophagy induction. Mitochondrial damaging agents result in loss of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), thus preventing PINK1 importation in the matrix and degradation ([Matsuda et al., 2010](#)). Therefore, a drop in  $\Delta\Psi_m$  results in PINK1 stabilization on the outer mitochondrial membrane. For this reason, we first measured the  $\Delta\Psi_m$  of LLC-1 and KP cells upon O/A treatment using MitoTracker Green and Deep Red, the latest being a  $\Delta\Psi_m$ -dependent fluorescent dye ([Greene et al., 2012](#)). Confocal imaging of live cells demonstrated a strong reduction of the MitoTracker Green fluorescence, reflecting degradation of mitochondria through mitophagy after 24h of O/A treatment (**Fig. 2E**), accompanied with a higher loss of the MitoTracker Deep Red fluorescence (**Fig. 2E and 2F**). Concomitantly, polarization-sensitive dye TMRE-staining was quantified by flow cytometry in LLC-1 and KP cells following CCCP, O/A or Valinomycin short time course treatment, from 30 minutes to 3 hours (**Fig. S2B and S2C**) indicates that these mitophagy-inducing agents were able to depolarize mitochondria to the same extend in both cell lines.

We next sought to determine the impact of a drop of  $\Delta\Psi_m$  on PINK1 stabilization upon O/A treatment. Based on McWilliams study, we decided to analyze the mouse PINK1 protein expression by immunoprecipitation ([McWilliams et al., 2018](#)). Thus, we detected PINK1 following O/A treatment but not in the untreated condition, as expected (**Fig. 2H**). We next focused on the activity of PINK1 since the kinase is known to phosphorylate the conserved serine 65 of an ubiquitin molecule (phospho-Ser<sup>65</sup> ubiquitin) ([Kane et al., 2014](#); [Kazlauskaitė et al., 2014](#)), as well as the Ser<sup>65</sup> of Ub-like domain of PARKIN ([Kondapalli et al., 2012](#)). Because PINK1 activity is among the first step of mitophagy induction, we analyzed the phospho-Ser<sup>65</sup> ubiquitin following an O/A time course treatment from 1 to 12 hours in LLC-1

and KP cells. Phospho-Ser<sup>65</sup> ubiquitin formation was observed in both cell lines following O/A treatments (**Fig. 2G and S2D**).

Next, to investigate the role of PINK1 during mitophagy, we generated *Pink1*-deficient LLC-1 and KP cells using the Nanoblades strategy as previously described. PINK1 protein was not detected anymore upon O/A treatment (**Fig. 2H**), neither the phospho-Ser<sup>65</sup> ubiquitin band reflecting its activity (**Fig. 2I and S2E**) in PINK1 KO cells while they were observed in control cells (Crizi Ctl). Then, we evaluated the mitophagy occurring in cells 24 and 36 hours after treatment with the mitophagy-inducing agent O/A. PINK1-deficient cells displayed more than two-fold decrease in mitophagy monitored by mito-Keima upon O/A treatment compared to their controls (**Fig. 2J**), revealing the role of PINK1 in mitophagy in lung cancer cells. Taken together, these results indicate that mitophagy following specific inhibition of electron transport chain complexes in LLC-1 cells occurs independently of PARKIN E3 ligase, that is not expressed in those cells, but relies on the Ser/Thr kinase PINK1.

**ATG7-mediated autophagy and PINK1-mediated mitophagy control *in vivo* tumor development of lung cancer cells.** Mitophagy cleared damaged lung cancer cell mitochondria in a PINK1-dependent manner upon uncoupling treatments *in vitro* (**Fig. 2J**). However, during tumor development, how dysfunctional mitochondria are removed and how mitophagy may impact on lung tumor growth remain unknown. Number of evidences demonstrated that aberrant mitochondrial activity contributes to immune activation involving inflammasome activation and inflammatory responses ([Decout et al., 2021](#); [Sliter et al., 2018](#); [Zhou et al., 2011](#)). In contrast, low level of PINK1 expression in lung cancer was associated with poor prognostic and its expression correlated with immune infiltration ([Lin et al., 2021](#); [Zhu et al., 2020](#)). Thus, we investigated the role of PINK1-mediated mitophagy in lung cancer development and how this mitophagy pathway could modulate immune responses.

We first examined the ability of immune system to control lung tumor development following subcutaneous inoculation of LLC-1 or KP cells in syngeneic immunocompetent mice treated with or without T cells specific depleting antibody. Mice treated with anti-CD8 antibody displayed an increase in tumor growth compared to vehicle groups for both cell lines (**Fig. S3A and S3B**), indicating that cytotoxic T cells can control and limit lung tumor growth. Then, because loss of ATG7 reduced mitophagy *in vitro* (**Fig. 1H and S1I**), we engrafted ATG7-deficient LLC-1 cells into immunocompetent mice. While it is reported that autophagy-deficient cancer cells had reduced tumor growth in different cancer models ([Arensman et al., 2020](#); [Bhatt et al., 2019](#); [Rao et al., 2014](#)), we on the opposite observed a strong increase in tumor growth and tumor weight in ATG7#2 tumor LLC-1 cells compared to LLC-1 tumor cells with a functional autophagy machinery (**Fig. 3A and 3B**). Importantly, the proliferation rate *in vitro* of these cells was not increased compared to their controls (**Fig. S3C**), and ATG7-deficient LLC-1 cells recapitulated phenotypes already described for their sensitivity to starvation-induced cell death compared to LLC-1 control cells (**Fig. S3D**) ([Guo et al., 2016](#)). Moreover, we confirmed by TEM the inability of ATG7#2 tumor cells to selectively sequester cytoplasm material, as well as mitochondria, since autophagosome-like structures were empty and accumulated within the cytosol (**Fig. 3C**). Despite a splenomegaly observed in mice bearing ATG7 KO LLC-1 cells, fewer CD45<sup>+</sup> leucocytes quantified by flow cytometry were found infiltrating the tumors (**Fig. 3D and 3E**). We next repeated the experiment using ATG7-deficient KP cells. In this preliminary result, we observed a tendency for increased tumor growth in ATG7 KO cells. However, the heterogeneity in tumor size and weight made final interpretation difficult (**Fig. S3E and S3F**).

To functionally investigate the impact of PINK1-mediated mitophagy on immune response during lung cancer development, we first determined the membrane expression of PD-L1, an immune-checkpoint which control the activation of T cells ([Waldman et al., 2020](#)), by flow cytometry in PINK1-deficient LLC-1 cells. For that, we treated cells 48 hours with IFN $\gamma$ , a cytokine known to enhance the basal expression level of PD-L1 ([Garcia-Diaz et al., 2017](#)) and we observed an increase of membrane PD-L1 levels in LLC-1 cells deficient for PINK1 compared to their controls (**Fig. S3G**). According to this result, and in line with ATG7#2 tumor growth (**Fig. 3A and 3B**), PINK1-deficient LLC-1 cells exhibited an increase in tumor growth

and tumor weight compared to LLC-1 control cells (**Fig. 3F and 3G**). Of note, the proliferation rate of PINK1-deficient cells was not increased *in vitro* compared to their controls (**Fig. S3C**). A slightly increased spleen weight, but not statistically significant, was observed in PINK1 4#2-tumor bearing mice compared to their controls, without any change in CD45<sup>+</sup> population infiltrating the tumor (**Fig. 3H and 3I**). Confocal imaging of PINK1-deficient tumors *in vivo* revealed that TOMM 20 immunostaining increased by 2.5-fold (**Fig. S3H and S3I**) and concomitantly, TEM analyses detected abnormal mitochondria (**Fig. 3J**), suggesting an accumulation of damaged mitochondria in PINK KO LLC-1 cells. Upon characterization of the immune population observed within the tumor, we observed no differences in macrophage and monocyte cell populations between both PINK1-deficient and control tumors quantified by flow cytometry, while a massive decrease of neutrophils was observed (**Fig. 3K**). In line with these results, dissociated and isolated cancer cells from PINK1-deficient tumors showed strong reduction of chemokine CXCL1 and granulocyte-colony stimulating factors (G-CSF) mRNA expression compared to their controls, known to recruit and to enhance function of neutrophils (**Fig. 3L**) (Castellani et al., 2019; Sawant et al., 2016). Furthermore, reduction of interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) and IL-1 $\beta$  mRNA expression, and a mild reduction of IL-6 were observed in PINK1-deficient cancer cells (**Fig. 3L**). These results suggest that a reduction in the inflammatory response could reduce the infiltration of neutrophils into tumors and participate in the higher tumor growth of PINK1-deficient cells *in vivo*.

**ATG7-mediated autophagy and PINK1-mediated mitophagy controls the sensitivity to cisplatin-induced death.** Mitophagy in cancer cells maintains a healthy mitochondrial network and, given that various anticancer drugs induce mitochondrial dysfunction leading to cell death, mitophagy may counteract cell death signaling and participates in chemotherapy resistance (Yan and Lin, 2018). To test whether mitophagy inhibition of mitophagy enhances drug sensitivity in lung cancer cell lines, we treated LLC-1 and KP cells with cisplatin, a platinum-based chemotherapeutic drug, used as the standard of care to treat late-stage non-small cell lung cancer (NSCLC) (Rossi and Maio, 2016). We could show that ATG7 and PINK1 participated in the escape from cisplatin-induced death as ATG7- and PINK1-deficient cells displayed greater sensitivity to it (**Fig. 4A**). This effect was prevented using the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh (**Fig. 4B**). We then tested the impact of ATG7 deficiency on the sensitivity to cisplatin *in vivo*. For that matter, ATG7 KO or control cells were injected subcutaneously in syngeneic immunocompetent mice and once tumor size reached 0.1 cm<sup>3</sup>, mice were treated with a suboptimal dose of cisplatin. While this dose did not impact the tumor growth of control cells, it significantly reduced tumor growth of ATG7-deficient tumors (**Fig. 4C and 4D**). This result suggest that ATG7-dependent autophagy limits the cytotoxic effect of chemotherapy in lung cancer cells and the functionality of autophagy machinery could be used to predict cisplatin sensitivity in NSCLC.

In conclusion, damaged mitochondria in murine lung cancer cell lines are eliminated by the conventional autophagy machinery upon specific inhibition of electron transport chain complexes, following stabilization and activation of the Ser/Thr kinase PINK1, but not the PARKIN E3 ligase. Inhibition of PINK1-dependent mitophagy *in vivo* increased tumor growth of lung cancer cells, as did *in vivo* inhibition of ATG7-dependent autophagy. Furthermore, PINK1-deficient cancer cells in tumors displayed a reduced inflammatory response that impacted neutrophil infiltration into tumors. Thus, our preliminary data suggest an anti-tumoral role of PINK1 during lung cancer development *in vivo* in which PINK1-dependent mitophagy restrains tumor growth by controlling immune response. These data will be discussed in more detail in the discussion chapter of this thesis dissertation.

### **Author contribution**

S.M. and J.E.R. conceived the project, designed experiments, supervised the study, and obtained funding. E.G., S.M., and J.E.R. wrote the manuscript. E.G. and S.M. performed most of all the molecular, cellular and in vivo experiments and S.N.V., P.M., and R.P.B performed experiments. J.C. and E.V. provided scientific advised and helped with the experimental design. N.V helped the confocal microscopy analyzes. C.B. and S.L.G. performed the transmission electron microscopy analyzes.

## Material and Methods

**Cell lines and cell culture conditions.** LLC-1 cells were obtained from the European Collection of Cell Culture (ECACC, # 90020104) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with Glutamax-I supplemented with 10% fetal bovine serum, 100U/mL penicillin, and 100ng/mL streptomycin. *Kras*<sup>G12D/+</sup>;*p53*<sup>-/-</sup> tumor-derived cells were a kind gift from Dr Eileen White (Rutgers Cancer Institute of New Jersey, New Brunswick) and were cultured in RPMI1640 medium with Glutamax-I supplemented with 10% fetal bovine serum, 100U/mL penicillin, 100ng/mL streptomycin and 1mM sodium pyruvate. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide. Cell cultures were periodically tested for mycoplasma contamination by PCR. LLC-1 parental cells were infected with pLZRS-emptyp, pLZRS-ARIH1 or pLZRS-Parkin expressing retroviral vector and selected with puromycin (ThermoFischer Scientific) for 2 weeks. Overexpression was analysed by WB.

**Reagents.** Q-VD-OPh was purchased from Cliniscience. Bafilomycin A and Valinomycin were obtained from Bio-technie. CCCP, Oligomycin and Antimycin A were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). DAPI was purchased from Sigma.

**Mice.** All animal experiments were performed according to the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee and the regional ethics committee (approval reference PEA-673). All experiments used age-matched female littermates. Five-week-old WT syngeneic C57BL/6 mice were obtained from JANVIER. WT syngeneic C57BL/6 mice were subcutaneously injected with 0.5 or 1x10<sup>6</sup> of LLC-1 cells, or 2x10<sup>6</sup> of *Kras*<sup>G12D/+</sup>;*p53*<sup>-/-</sup> cell. Mice were inspected daily for tumor development and increase in tumor size was measured with a caliper. Tumor volume was calculated as follows: (Length x width x height)/2. For antibody-mediated depletion experiments *in vivo*, mice were intraperitoneally injected with 100 µg of an anti-CD8-depleting antibody (Bioxcell, clone53-6.7, #BE0004-1) or vehicle (PBS) every second day for seven doses during 2 weeks after tumor cell injection. Cisplatin (Bio-technie, #2251) was intraperitoneally administered in 0.9% NaCl (1mg/Kg) every two days when tumors reached 0.1cm<sup>3</sup>.

**sgRNA sequences, Nanoblades production and Transduction procedure.** Nanoblades were produced from transfected producer 293T cells plated at 2.5 × 10<sup>6</sup> cells/10 cm plate 24 h before transfection with the Calcium Phosphate procedure. Plasmids encoding the GagMLV-CAS9 fusion (1.7 µg), Gag-POLMLV (2.8 µg), gRNA expressing plasmid(s) (4.4 µg), VSV-G (0.4 µg), the Baboon Endogenous retrovirus Rless glycoprotein (BaEVRless) (0.7 µg) were cotransfected, medium was replaced 24 h after transfection by 6 ml of Optimem (Gibco) supplemented with penicillin–streptomycin and Hepes, and supernatants were collected from producer cells after 48 h. Nanoblade-containing medium was clarified by a short centrifugation (500g, 5 min) and filtered through a 0.45 µm pore-size filter before centrifugation (3000g, 18h, 4°C). The sgRNA used were: mouse ATG7: 5'- GAAGTTGAACGAGTACCGCC- 3', and mouse PINK1: 5'- CAAGCGCGTGTCTGACCCAC- 3'. Transductions with Nanoblades were performed in 24-well plate seeded with 20 × 10<sup>4</sup> cells, in 400µl of medium to optimize cell/particles interactions for at least 18h before supplementing with fresh medium. This step was repeated twice to improve editing efficiency. Polybrene was used at a final concentration of 8 µg/ml in the transduction medium. Protein expression of the corresponding targeted gene was evaluated 1 week after the last transduction by Western Blot.

**Cell death and mitochondrial membrane potential analysis.** Cell viability of the treated cells was assessed by looking at the plasma membrane permeabilization using DAPI staining (1µg/ml) and then analyzed by flow cytometry (Miltenyi Biotec). To measure the mitochondrial membrane potential, LLC-1 or *Kras*<sup>G12D/+</sup>;*p53*<sup>-/-</sup> tumor-derived cells treated cells were incubated for 30min at 37°C either with 150nM of TMRE and analysed by flow cytometry using MACSQuant VYB and MACSQuant software (Miltenyi Biotec), or with 150nM Mitotracker

Green and 150nM Mitotracker Deep Red and analysed by Confocal imaging on Nikon A1R microscope.

**Mito-Keima analysis.** LLC1 and *Kras*<sup>G12D/+</sup>; *p53*<sup>-/-</sup> tumor-derived cells were infected with mito-Keima expressing lentiviral vector. The fluorescence profile of this biomarker is pH-dependent, making it a perfect biosensor of mitochondrial degradation by the lysosomes. Excitation at 488 nm and emission at >620 nm was used to detect mito-Keima mitochondria in the cytosol and excitation at 561 nm and emission at >620 nm was used to detect mitochondria in lysosomes. mito-Keima was analyzed by flow cytometry using MACSQuant VYB and MACSQuant software (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) or Nikon A1R confocal microscope (timelapse).

**Immunoprecipitation.** Cells were lysed in ice-cold lysis buffer containing: 50mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM EGTA pH 8.0, 1% Triton X-100, 0.25 M sucrose, 150mM NaCl, 2 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, 10 mM Sodium glycerolphosphate, 1mM DTT, 2mM PMSF, 10µg/ml aprotinin and 10µg/ml leupeptin. After 15 minutes on ice, lysates were clarified by centrifugation at 20000g for 10min at 4°C. Pre-cleared lysates (1mg) were incubated with 5µg of sheep antimouse PINK1 (#S774C, 3rd Bleed, MRC PPU Reagent) with protein A/G plus sepharose beads for 16h at 4°C under end-over-end agitation. Then beads were washed 4 times in ice-cold corresponding lysis buffer. The immunoprecipitated protein complexes were then resuspended in Laemmli buffer and boiled for 5min at 95°C before immunoblot analysis.

**Western blot.** Whole cell protein extracts were obtained by lysing cells with Laemmli buffer. Protein concentration was measured with the BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce). 20-40µg of protein extracts were subjected to reducing conditions, loaded onto a polyacrylamide gel and then transferred to Immobilon-P membranes from Millipore. One hour after blocking the nonspecific binding sites with 5% (w/v) non-fat milk in Tris-buffered saline, membranes were incubated overnight at 4°C with the following specific primary antibodies: β-actin (SC47778, Santa-Cruz biotech), MTCO1 (ab203912, Abcam, Cambridge, UK), PINK1 (Sheep polyclonal anti-mouse PINK1 S086D, MRC PPU Products & Reagents), ARIH1 (PA5-18125, ThermoFischer Scientific), Parkin (2132, Cell signaling), SDHB (ab14714, Abcam), CoxIV (11242-1-AP, Proteintech), Hsp90 (ADI-SPA-836-D, Enzo Life Sciences), Phospho-Ser65 Ubiquitin (ABS1513-I, Merck). Antibody binding was detected using a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase, and the enhanced chemiluminescence detection system (Amersham, Little Chalfont, UK). Quantification of band intensities was conducted using Fiji software. Relative density of each protein and condition was referred to the internal normalization control.

**Flow cytometry analysis of immune cells from tumors.** Immune cell populations were analysed on the single cell suspension obtained from the dissociation of LLC-1 tumors with the mouse Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, #130-096-730) by using the following antibodies: anti-mouse CD45, anti-mouse CD11b, anti-mouse IA/IE, anti-mouse Ly6G, anti-mouse Ly6C (BD bioscience).

**Immunofluorescence of cells and tumor sections.** Cells, grown on coverslips, were treated and then, washed in PBS, fixed with freshly prepared 3.7% PFA at pH 7.2 in 50mM HEPES for 20 minutes, permeabilized with 0.1% TritonX-100 in PBS for 3 minutes, and blocked in 2% BSA in PBS for 30 min. Tumors were rapidly harvested from mice and processed by immersion fixation in freshly prepared 3.7% PFA at pH 7.2 in 200 mM HEPES overnight at 4°C. then, For cryosectioning, tissues were cryoprotected in 30% (w/v) sucrose in PBS at 4°C. Tumors were embedded in OCT (Sakura) and sectioned using a cryostat (Leica). The following primary antibodies were used: anti-TOM20 (sc-11415, Santa Cruz), PHB2 (66424-1-Ig, Proteintech), LC3 (NB100-2220, Novus)- were used at 1:200 overnight at 4°C, followed by secondary antibodies at 1:1000 and DAPI (0.5 µg/ml) for 1 hour at room temperature. Alexa-fluor conjugated secondary antibodies were obtained from Molecular Probes (Invitrogen). Cells and

tumor sections were mounted with Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA). Images were captured with Confocal Nikon. Images were analyzed with Image J Software. Pearson's coefficient was obtained with JACoP plugin.

**Cell confluence analysis.** Cells were seeded in 24-well plates (6000 cells/well) and cell confluence was imaged by phase-contrast using the IncuCyte HD system (IncuCyte™ live-cell). Frames were captured at 2h intervals from 4 separate regions/well using a × 10 objective. Cell confluence curves were constructed by imaging plates using IncuCyte™ Zoom software.

**Mitochondrial and nuclear DNA quantification.** Total DNA was isolated from LLC-1 or *Kras*<sup>G12D/+</sup>; *p53*<sup>-/-</sup> tumor-derived cells using the 'Blood & cell culture DNA mini kit' from QIAGEN (Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The relative DNA expression levels of mouse APP and COX II were obtained by real-time quantitative PCR, using with SYBR green on the StepOne device (Applied Biosystem). APP (F: 5'-CGGAAACGACGCTCTCATG-3', R: 5'-CCAGGCTGAATTCCCCAT-3') and COX II (F: 5'-GAGCAGTCCCCTCCCTAGGA-3, R: 5'-GGTTTGATGTTACTGTTGCTTGATTT-3'). All percentage changes are expressed normalized to the untreated control.

**Real Time qPCR.** LLC-1 tumors were dissociated with the mouse Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, #130-096-730) and tumoral cells were negatively selected using the mouse Tumor cell isolation kit (Miltenyi Biotec, #130-110-187) in an autoMACS Pro device (Miltenyi Biotec). Total RNA was isolated from either isolated tumoral cells or cell lines using the RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) and quantified using a Nanodrop (Ozyme). Reverse transcription was performed using the Omniscript RT Kit (Qiagen, #205113). Quantitative-PCR was performed with SYBR Green (Applied Biosystems, Life Technologies, #4367659) or TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, #4304437) using the Step One real-time PCR systems (Applied Biosystems) following the manufacturers' instructions. The housekeeping gene RPLP0 was used as a control for RNA quality and for normalization. All analyses were performed in duplicate and melting curve analysis was performed for SYBR Green to control product quality and specificity.

**Transmission Electron Microscopy.** For ultrastructural analysis, *Kras*<sup>G12D/+</sup>; *p53*<sup>-/-</sup> tumor-derived cells were fixed in 1.6% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer, rinsed in 0.1M cacodylate buffer. Mouse tumors were quickly dissected, immersed in fixative, 1.6% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer and stored overnight at 4°C. Samples were rinsed in the same buffer, post-fixed for 1h in 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferrocyanide in 0.1M cacodylate buffer to enhance the staining of membranes. Cells were then rinsed in distilled water, dehydrated in acetone at low temperature to preserve lipids and lastly embedded in epoxy resin. Contrasted ultrathin sections (70nm) were analyzed under a JEOL 1400 transmission electron microscope equipped with a Morada Olympus CCD camera. IMOD software was used to analyze images and delineate major cellular structures.

**Statistical Methods.** Data are expressed as the means ± standard error of the mean (SEM). Statistical significance was performed using two-tailed parametric Student's t test or by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-test analysis according to the dataset (GraphPad software, San Diego, CA). Results were considered as statistically significant when  $p < 0.05$ . All the statistical details of experiment can be found in the figure legends.

## References

- Abdrakhmanov, A., Kulikov, A.V., Luchkina, E.A., Zhivotovsky, B., and Gogvadze, V. (2019). Involvement of mitophagy in cisplatin-induced cell death regulation. *Biol. Chem.* *400*, 161–170.
- Agnihotri, S., Golbourn, B., Huang, X., Remke, M., Younger, S., Cairns, R.A., Chalil, A., Smith, C.A., Krumholtz, S.-L., Mackenzie, D., et al. (2016). PINK1 Is a Negative Regulator of Growth and the Warburg Effect in Glioblastoma. *Cancer Res.* *76*, 4708–4719.
- Arensman, M.D., Yang, X.S., Zhong, W., Bisulco, S., Upeslakis, E., Rosfjord, E.C., Deng, S., Abraham, R.T., and Eng, C.H. (2020). Anti-tumor immunity influences cancer cell reliance upon ATG7. *Oncolmmunology* *9*, 1800162.
- Bernardini, J.P., Lazarou, M., and Dewson, G. (2017). Parkin and mitophagy in cancer. *Oncogene* *36*, 1315–1327.
- Bhatt, V., Khayati, K., Hu, Z.S., Lee, A., Kamran, W., Su, X., and Guo, J.Y. (2019). Autophagy modulates lipid metabolism to maintain metabolic flexibility for Lkb1-deficient Kras-driven lung tumorigenesis. *Genes Dev.* *33*, 150–165.
- Castellani, S., D’Oria, S., Diana, A., Polizzi, A.M., Gioia, S.D., Mariggìo, M.A., Guerra, L., Favia, M., Vinella, A., Leonetti, G., et al. (2019). G-CSF and GM-CSF Modify Neutrophil Functions at Concentrations found in Cystic Fibrosis. *Sci. Rep.* *9*, 12937.
- Chourasia, A.H., Tracy, K., Frankenberger, C., Boland, M.L., Sharifi, M.N., Drake, L.E., Sachleben, J.R., Asara, J.M., Locasale, J.W., Karczmar, G.S., et al. (2015). Mitophagy defects arising from BNip3 loss promote mammary tumor progression to metastasis. *EMBO Rep.* *16*, 1145–1163.
- Chuang, C.-H., Dorsch, M., Dujardin, P., Silas, S., Ueffing, K., Hölken, J.M., Yang, D., Winslow, M.M., and Grüner, B.M. (2020). Altered mitochondria functionality defines a metastatic cell state in lung cancer and creates an exploitable vulnerability. *Cancer Res.* canres.1865.2020.
- Decout, A., Katz, J.D., Venkatraman, S., and Ablasser, A. (2021). The cGAS–STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 1–22.
- Galluzzi, L., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., Pedro, J.M.B., Cecconi, F., Choi, A.M., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M.I., et al. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* *36*, 1811–1836.
- Garcia-Diaz, A., Shin, D.S., Moreno, B.H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G.A., Zaretsky, J.M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., et al. (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* *19*, 1189–1201.
- Gonzalez-Hunt, C.P., Rooney, J.P., Ryde, I.T., Anbalagan, C., Joglekar, R., and Meyer, J.N. (2016). PCR-Based Analysis of Mitochondrial DNA Copy Number, Mitochondrial DNA Damage, and Nuclear DNA Damage. *Curr. Protoc. Toxicol.* *67*, 20.11.1-20.11.25.
- Greene, A.W., Grenier, K., Aguilera, M.A., Muise, S., Farazifard, R., Haque, M.E., McBride, H.M., Park, D.S., and Fon, E.A. (2012). Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep.* *13*, 378–385.
- Guo, J.Y., Teng, X., Laddha, S.V., Ma, S., Nostrand, S.C.V., Yang, Y., Khor, S., Chan, C.S., Rabinowitz, J.D., and White, E. (2016). Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. *Genes Dev.* *30*, 1704–1717.
- Hart, T., Chandrashekhar, M., Aregger, M., Steinhart, Z., Brown, K.R., MacLeod, G., Mis, M., Zimmermann, M., Fradet-Turcotte, A., Sun, S., et al. (2015). High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. *Cell* *163*, 1515–1526.
- Javadov, S., Kozlov, A.V., and Camara, A.K.S. (2020). Mitochondria in Health and Diseases.

Cells 9, 1177.

Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2018/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/), based on November 2020 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2021.

Kane, L.A., Lazarou, M., Fogel, A.I., Li, Y., Yamano, K., Sarraf, S.A., Banerjee, S., and Youle, R.J. (2014). PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J. Cell Biol.* 205, 143–153.

Katayama, H., Kogure, T., Mizushima, N., Yoshimori, T., and Miyawaki, A. (2011). A Sensitive and Quantitative Technique for Detecting Autophagic Events Based on Lysosomal Delivery. *Chem. Biol.* 18, 1042–1052.

Kazlauskaitė, A., Kondapalli, C., Gourlay, R., Campbell, D.G., Ritorto, M.S., Hofmann, K., Alessi, D.R., Knebel, A., Trost, M., and Muqit, M.M.K. (2014). Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem. J.* 460, 127–141.

Kondapalli, C., Kazlauskaitė, A., Zhang, N., Woodroof, H.I., Campbell, D.G., Gourlay, R., Burchell, L., Walden, H., Macartney, T.J., Deak, M., et al. (2012). PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol.* 2, 120080.

Lazarou, M., Sliter, D.A., Kane, L.A., Sarraf, S.A., Wang, C., Burman, J.L., Sideris, D.P., Fogel, A.I., and Youle, R.J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524, 309–314.

Li, T., Cheng, H., Yuan, H., Xu, Q., Shu, C., Zhang, Y., Xu, P., Tan, J., Rui, Y., Li, P., et al. (2016). Antitumor Activity of cGAMP via Stimulation of cGAS-cGAMP-STING-IRF3 Mediated Innate Immune Response. *Sci. Rep.* 6, 19049.

Lin, E.P.-Y., Huang, B.-T., Lai, W.-Y., Tseng, Y.-T., Yang, S.-C., Kuo, H.-C., and Yang, P.-C. (2021). PINK1-Mediated Inhibition of EGFR Dimerization and Activation Impedes EGFR-Driven Lung Tumorigenesis. *Cancer Res.* 81, 1745–1757.

Mangeot, P.E., Risson, V., Fusil, F., Marnef, A., Laurent, E., Blin, J., Mournetas, V., Massouridès, E., Sohier, T.J.M., Corbin, A., et al. (2019). Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Nat. Commun.* 10, 45.

Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., et al. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* 189, 211–221.

McWilliams, T.G., Prescott, A.R., Montava-Garriga, L., Ball, G., Singh, F., Barini, E., Muqit, M.M.K., Brooks, S.P., and Ganley, I.G. (2018). Basal Mitophagy Occurs Independently of PINK1 in Mouse Tissues of High Metabolic Demand. *Cell Metab.* 27, 439-449.e5.

Pickles, S., Vigié, P., and Youle, R.J. (2018). Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr. Biol.* 28, R170–R185.

Rao, S., Tortola, L., Perlot, T., Wirnsberger, G., Novatchkova, M., Nitsch, R., Sykacek, P., Frank, L., Schramek, D., Komnenovic, V., et al. (2014). A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nat. Commun.* 5, 3056.

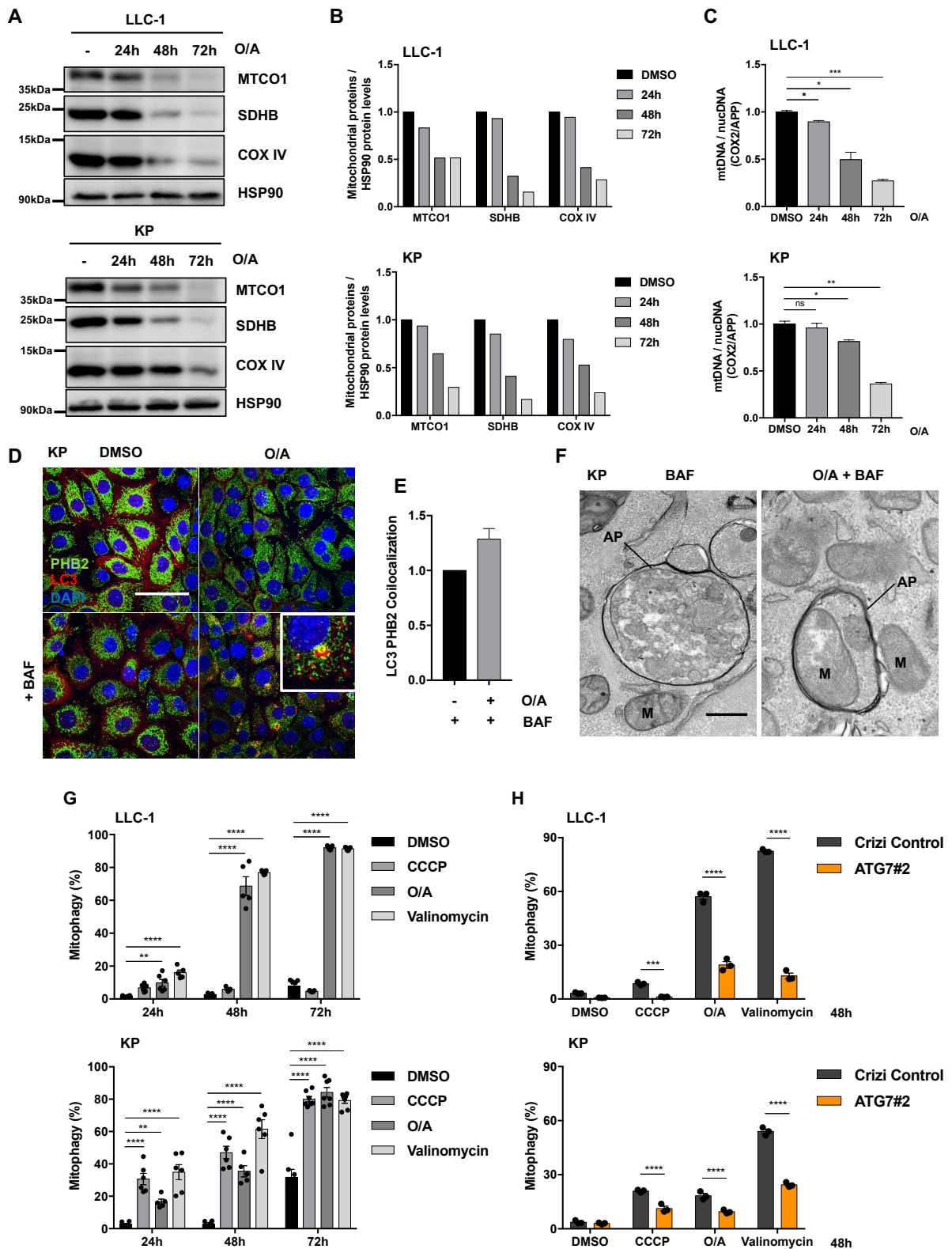
Rossi, A., and Maio, M.D. (2016). Platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: optimal number of treatment cycles. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 16, 1–8.

Sawant, K.V., Poluri, K.M., Dutta, A.K., Sepuru, K.M., Troshkina, A., Garofalo, R.P., and Rajarathnam, K. (2016). Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci. Rep.* 6, 33123.

- Sliter, D.A., Martinez, J., Hao, L., Chen, X., Sun, N., Fischer, T.D., Burman, J.L., Li, Y., Zhang, Z., Narendra, D.P., et al. (2018). Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature* 561, 258–262.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71, 209–249.
- Vara-Perez, M., Felipe-Abrio, B., and Agostinis, P. (2019). Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation. *Cells* 8, 493.
- Villa, E., Proïcs, E., Rubio-Patiño, C., Obba, S., Zunino, B., Bossowski, J.P., Rozier, R.M., Chiche, J., Mondragón, L., Riley, J.S., et al. (2017). Parkin-Independent Mitophagy Controls Chemotherapeutic Response in Cancer Cells. *Cell Rep.* 20, 2846–2859.
- Waldman, A.D., Fritz, J.M., and Lenardo, M.J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 651–668.
- Yan and Lin (2018). Dual Role of Mitophagy in Cancer Drug Resistance. *Anticancer Res.* 38, 617–621.
- Yang, H., Liang, S.-Q., Schmid, R.A., and Peng, R.-W. (2019). New Horizons in KRAS-Mutant Lung Cancer: Dawn After Darkness. *Front. Oncol.* 9, 953.
- Yin, K., Lee, J., Liu, Z., Kim, H., Martin, D.R., Wu, D., Liu, M., and Xue, X. (2021). Mitophagy protein PINK1 suppresses colon tumor growth by metabolic reprogramming via p53 activation and reducing acetyl-CoA production. *Cell Death Differ.* 28, 1–15.
- Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225.
- Zhu, L., Wu, W., Jiang, S., Yu, S., Yan, Y., Wang, K., He, J., Ren, Y., and Wang, B. (2020). Pan-Cancer Analysis of the Mitophagy-Related Protein PINK1 as a Biomarker for the Immunological and Prognostic Role. *Front. Oncol.* 10, 569887.

## Figures

**Figure. 1**

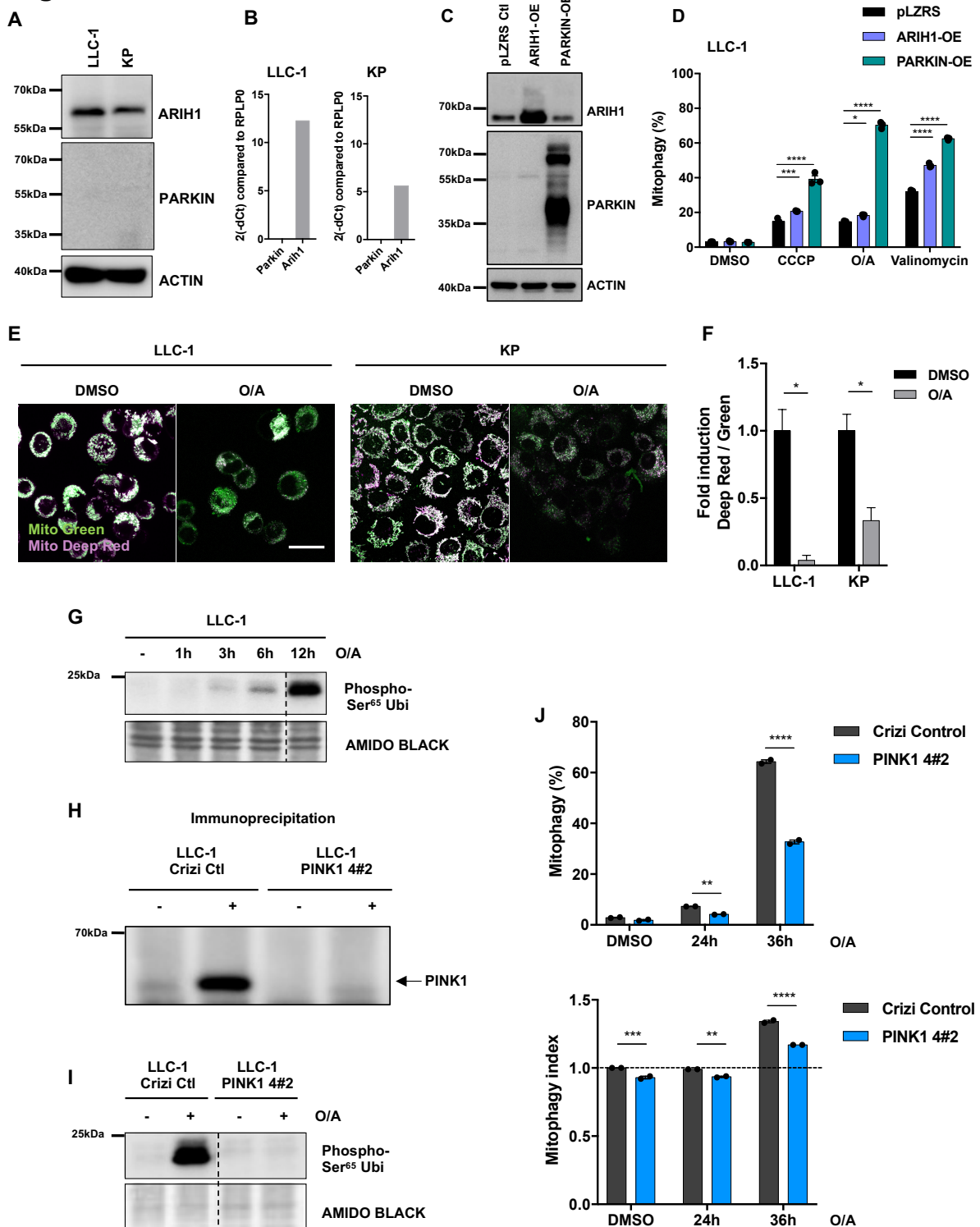


**Figure 1: ATG7-mediated autophagy is required for degradation of lung cancer cell mitochondria upon uncoupling treatments.**

(A-C) LLC-1 and KP cells were treated for the indicated times with mitochondrial uncoupling agents Oligomycin (1 $\mu$ M) and Antimycin A (1 $\mu$ M) (O/A) or with DMSO alone (control). Q-VD-

Oph (20 $\mu$ M), a pan-caspase inhibitor was added in all condition to avoid cell death. **(A)** Whole cell lysates of LLC-1 and KP cells were analyzed for indicated protein expression by immunoblotting and **(B)** quantification of mitochondrial proteins expression normalized to the HSP90 protein expression is showed, representing one of more than 3 experiences performed. **(C)** DNA of treated cells were extracted, quantitative PCR of COX2 for mitochondrial DNA (mtDNA) and APP for nuclear DNA (nucDNA) was performed, and the mitochondrial-to-nuclear DNA ratio is represented. One experiment with duplicates was performed. **(D-F)** KP cells treated with Q-VD-Oph (20 $\mu$ M) with or without 24h of O/A (1 $\mu$ M) and/or the Vacuolar H<sup>+</sup> ATPase inhibitor bafilomycin A1 (BAF, 10nM). **(D)** Representative Z-stack confocal images of treated KP cells immunostained PHB2 (green) and LC3 (red) and **(E)** quantification of measured co-localization between LC3 and PHB2. DNA was stained with DAPI (blue). Bar scale: 50 $\mu$ m. One experiment was performed **(F)** Representative images of transmission electron microscopy (TEM) of treated KP cells. M: mitochondria, AP: autophagosomes. Bar scale: 1 $\mu$ m. One experiment was performed **(G)** LLC-1 and KP cells expressing mito-Keima were treated with Q-VD-Oph (20 $\mu$ M) and with or without carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP, 10 $\mu$ M), O/A (1 $\mu$ M), or Valinomycin (10nM) for the indicated times and analyzed by flow cytometry. The percentage of cells with a spectral shift from green 488 nm to red 561 nm of the mito-Keima is represented. At least 3 experiments were performed in triplicate. **(H)** LLC-1 and KP cells deficient for ATG7 (ATG7#2) and their controls (Crizi Control) were transfected with mito-Keima and treated with Q-VD-Oph (20 $\mu$ M) and with or without CCCP (10 $\mu$ M), O/A (1 $\mu$ M), or Valinomycin (10nM) for the indicated times and analyzed by flow cytometry. At least 3 experiments were performed in triplicate. All values are mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0001 or \*\*\*\*P<0.00001 according to two-way ANOVA.

**Figure. 2**

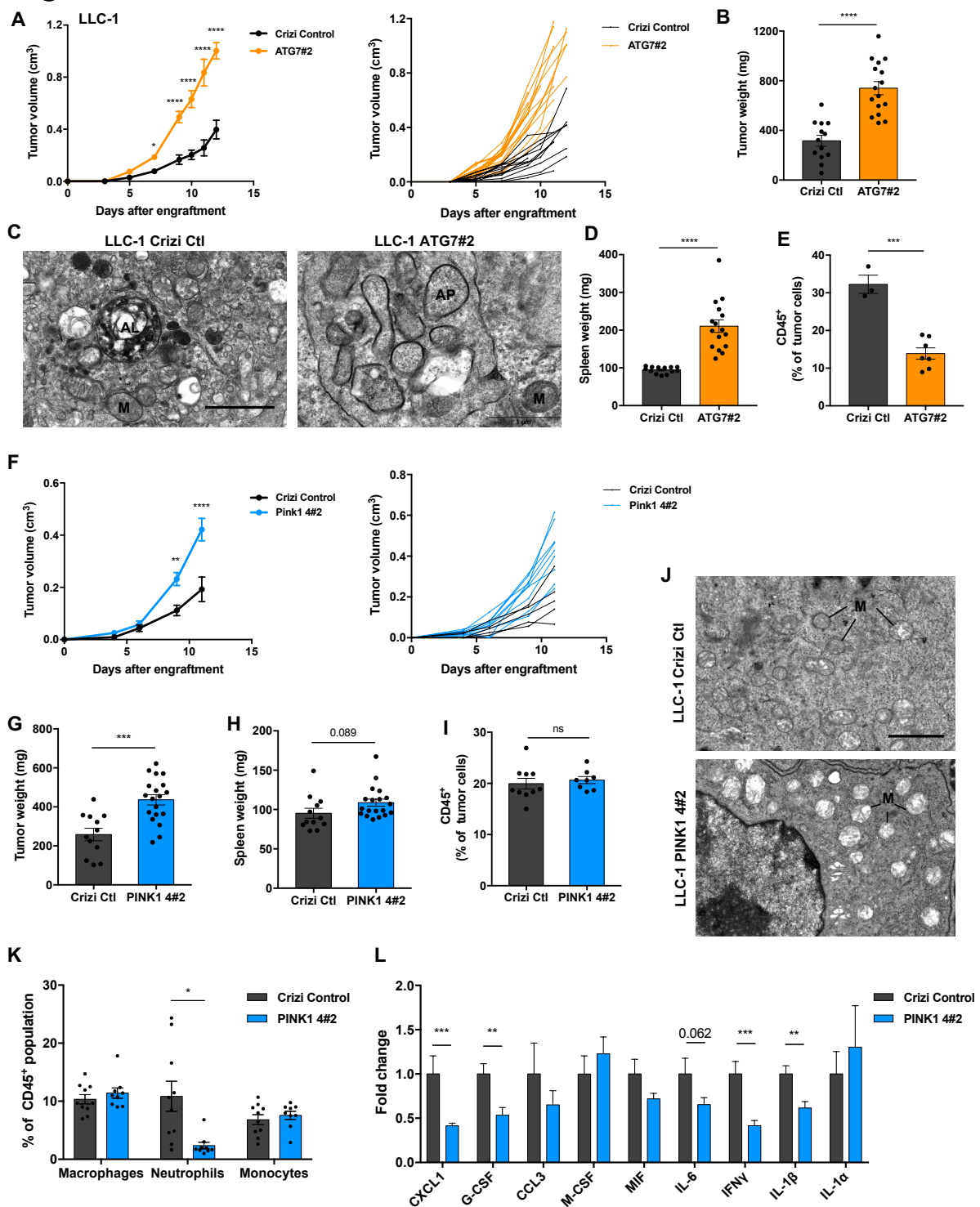


**Figure 2: Uncoupling treatments induce mitochondrial depolarization and promote PINK1-mediated mitophagy.**

(A) ARIH1 and PARKIN protein expression were analyzed in whole cell lysates of LLC-1 and KP cells by immunoblotting and (B) ARIH1 and PARKIN mRNA expression were analyzed by quantitative PCR. (C) ARIH1 and PARKIN protein expression were analyzed in whole cell lysates of LLC-1 overexpressing ARIH1 (ARIH1-OE) or PARKIN (PARKIN-OE). LLC-1 cells

with an empty vector are noted pLZRS. **(D)** ARIH1-OE and PARKIN-OE LLC-1 mito-Keima cells were treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without CCCP (10 $\mu$ M), O/A (1 $\mu$ M), or Valinomycin (10nM) for 24h and analyzed by flow cytometry. 2 experiments were performed in triplicate **(E)** Representative Z-stack confocal images of live LLC-1 and KP cells treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without O/A (1 $\mu$ M) for 24h then stained with both the MitoTracker Green and Deep Red and **(F)** the ratio between MitoTracker Deep Red and MitoTracker Green intensity is showed. Bar scale: 25 $\mu$ m. One experiment was performed **(G)** Whole cell lysates of LLC-1 cells treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without O/A (1 $\mu$ M) for the indicated times were analyzed by immunoblotting for the phosphorylation of the conserved serine 65 of ubiquitin (Phospho-Ser<sup>65</sup> Ub). Immunoblot was reconstituted as showed by the dashed line. The immunoblot was performed at least 3 times **(H)** Immunoblot of PINK1 immunoprecipitated from PINK1-deficient LLC-1 (PINK1 4#2) or control (Crizi Control) cells treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without O/A (1 $\mu$ M) for 24h. **(I)** Whole cell lysates of PINK1-deficient LLC-1 and control cells treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without O/A (1 $\mu$ M) for the indicated times were analyzed by immunoblotting for the Phospho-Ser<sup>65</sup> Ub. Immunoblot was reconstituted as showed by the dashed line. The immunoblot was performed at least 3 times **(J)** PINK1-deficient LLC-1 mito-Keima cells (PINK1 4#2) and their controls (Crizi Control) were treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without, O/A (1 $\mu$ M) for the indicated times and analyzed by flow cytometry. 3 experiments were performed in triplicate. All values are mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0001 or \*\*\*\*P<0.00001 according to two-way ANOVA or T.TEST.

**Figure. 3**



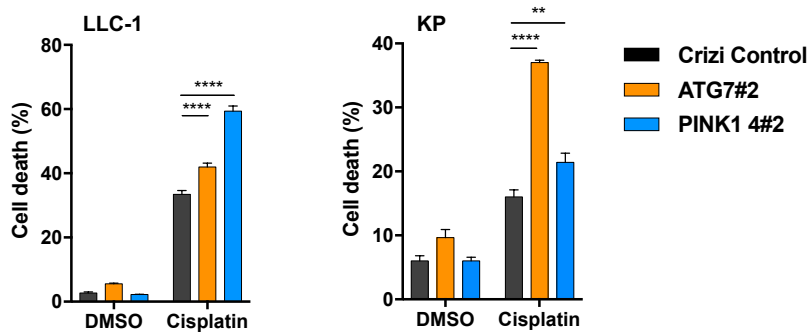
**Figure 3: ATG7-mediated autophagy and PINK1-mediated mitophagy control *in vivo* tumor development of lung cancer cells.**

(A-E) Syngeneic C57BL/6 mice were subcutaneously injected with  $1 \cdot 10^6$  ATG7-deficient LLC-1 (ATG7#2) or control (Crizi Control) cells. Data represent the pool of two independent experiments with 7-8 mice per group (A) Median and individual tumor growth curves are depicted (left and right, respectively). (B) Tumor weight at day 12 is shown. (C) Representative TEM images of tumors. AL: autolysosome. AP: autophagosome. M: Mitochondria.

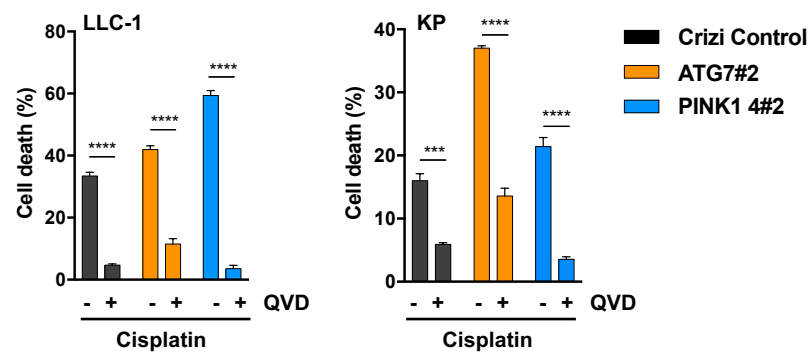
mitochondria. Bar scale: 2 $\mu$ m **(D)** Spleen weight at day 12 is showed. **(E)** Quantification of CD45<sup>+</sup> cell population in tumors by flow cytometry. **(F-L)** Syngeneic C57BL/6 mice were subcutaneously injected with 0.5.10<sup>6</sup> PINK1-deficient LLC-1 (PINK1 4#2) or control (Crizi Control) cells. Data represent the pool of two independent experiments with 7-8 mice per group **(F)** Median and individual tumor growth curves are depicted (left and right, respectively). **(G)** Tumor and **(H)** spleen weight at day 11 is showed. **(I)** Quantification of CD45<sup>+</sup> cell population in tumors by flow cytometry. **(J)** Representative TEM images of tumors. M: mitochondria. Bar scale: 5 $\mu$ m. **(K)** Quantification of CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>IA/IE<sup>+</sup> macrophages, CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>IA/IE<sup>-</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup> neutrophils and CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>IA/IE<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup> monocytes by flow cytometry. **(L)** Quantitative PCR of dissociated and isolated (CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>) tumors cells of the indicated mRNA gene expression. All values are mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0001 or \*\*\*\*P<0.00001 according to two-way ANOVA or T.TEST.

## Figure. 4

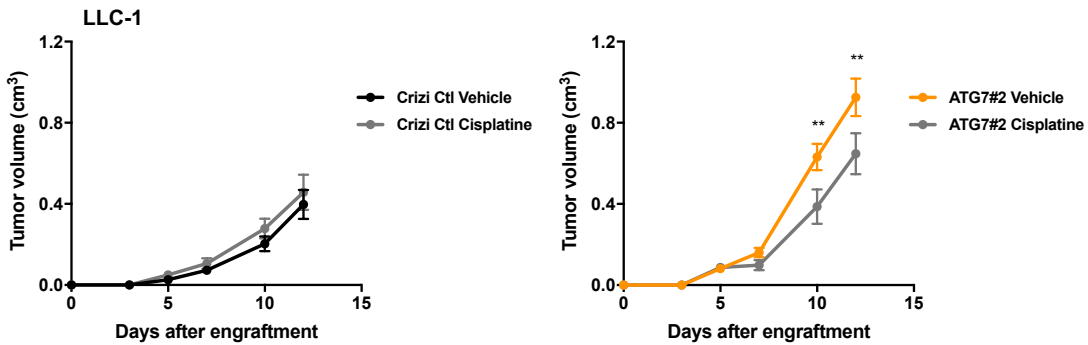
A



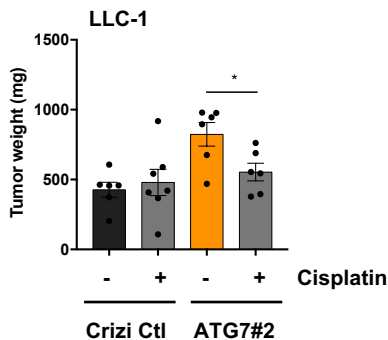
B



C



D



**Figure 4: ATG7-mediated autophagy and PINK1-mediated mitophagy controls the sensitivity to cisplatin-induced death**

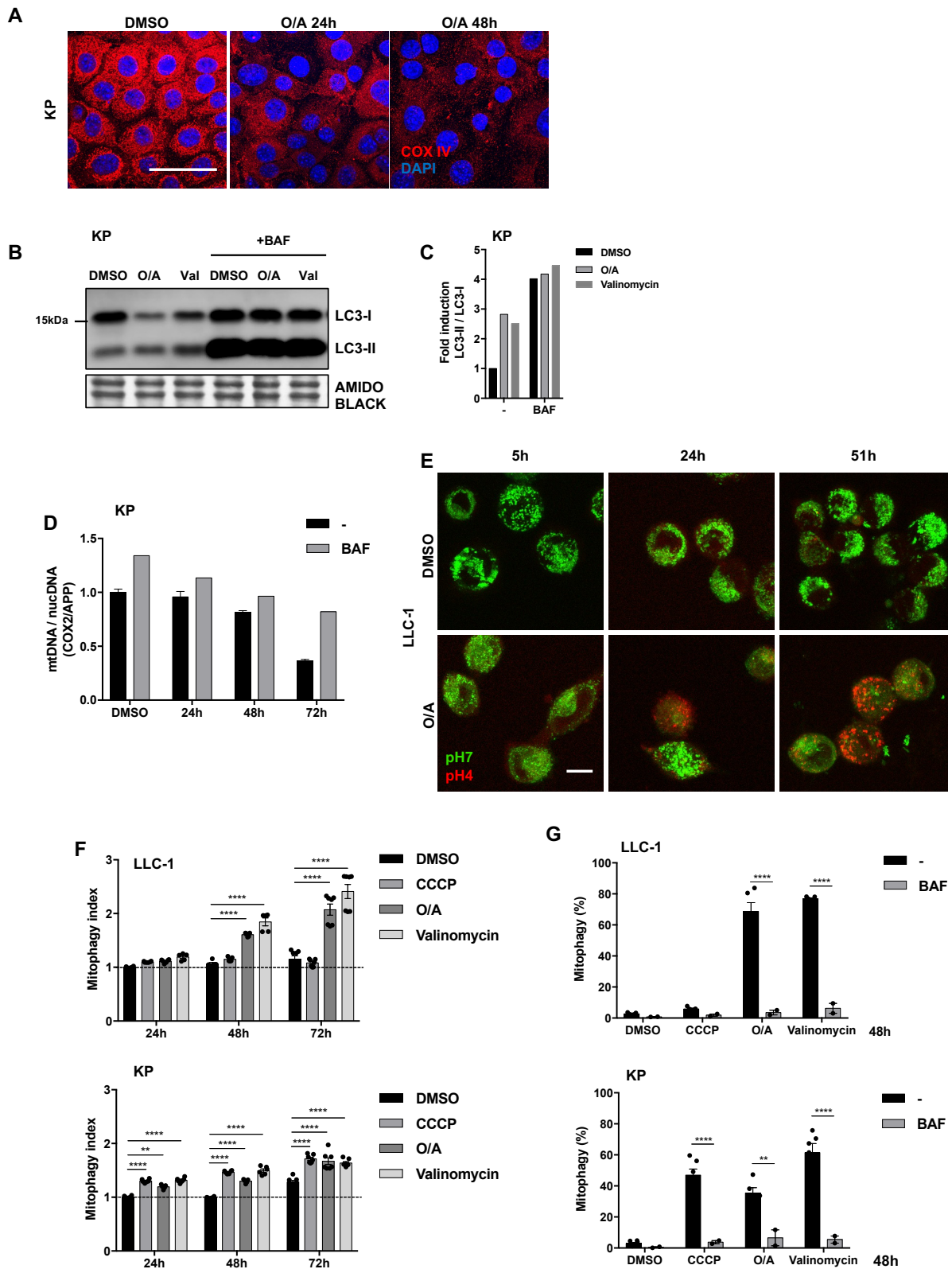
(A) LLC-1 and KP cells treated respectively for 24h and 48h with 5 $\mu$ M of cisplatin (B) and with or without Q-VD-OPh (20 $\mu$ M). Cells were stained extemporarily with DAPI, and cell death was

quantified by the percentage of DAPI<sup>+</sup> cells. At least 3 experiments were performed in triplicate. **(C-D)** Syngeneic C57BL/6 mice were subcutaneously injected with  $1 \cdot 10^6$  ATG7-deficient LLC-1 cells (ATG7#2) or control (Crizi Control) LLC-1 cells and were intraperitoneally injected with cisplatin every two days when tumors reached  $0.1 \text{ cm}^3$  (1mg/per kg of mouse in NaCl 0.9%). One experiment was performed with 6-7 mice per group **(C)** Median tumor growth curves are depicted and **(D)** tumor weight at day 12 is showed. Curves are separated for more clarity. All values are mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0001 or \*\*\*\*P<0.00001 according to two-way ANOVA or T.TEST.

**Supplemental material**

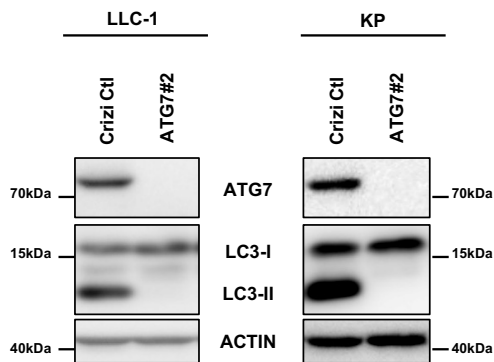
**PINK1-dependent mitophagy restrains tumor growth: is it linked to the regulation of immuno-surveillance?**

**Figure. S1**

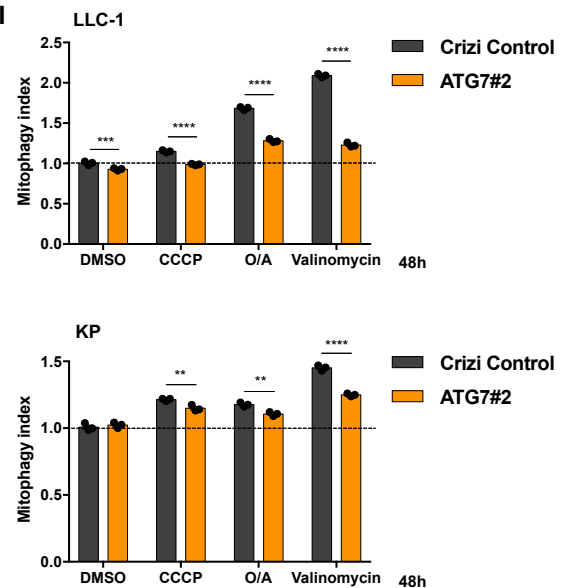


## Figure. S1

H



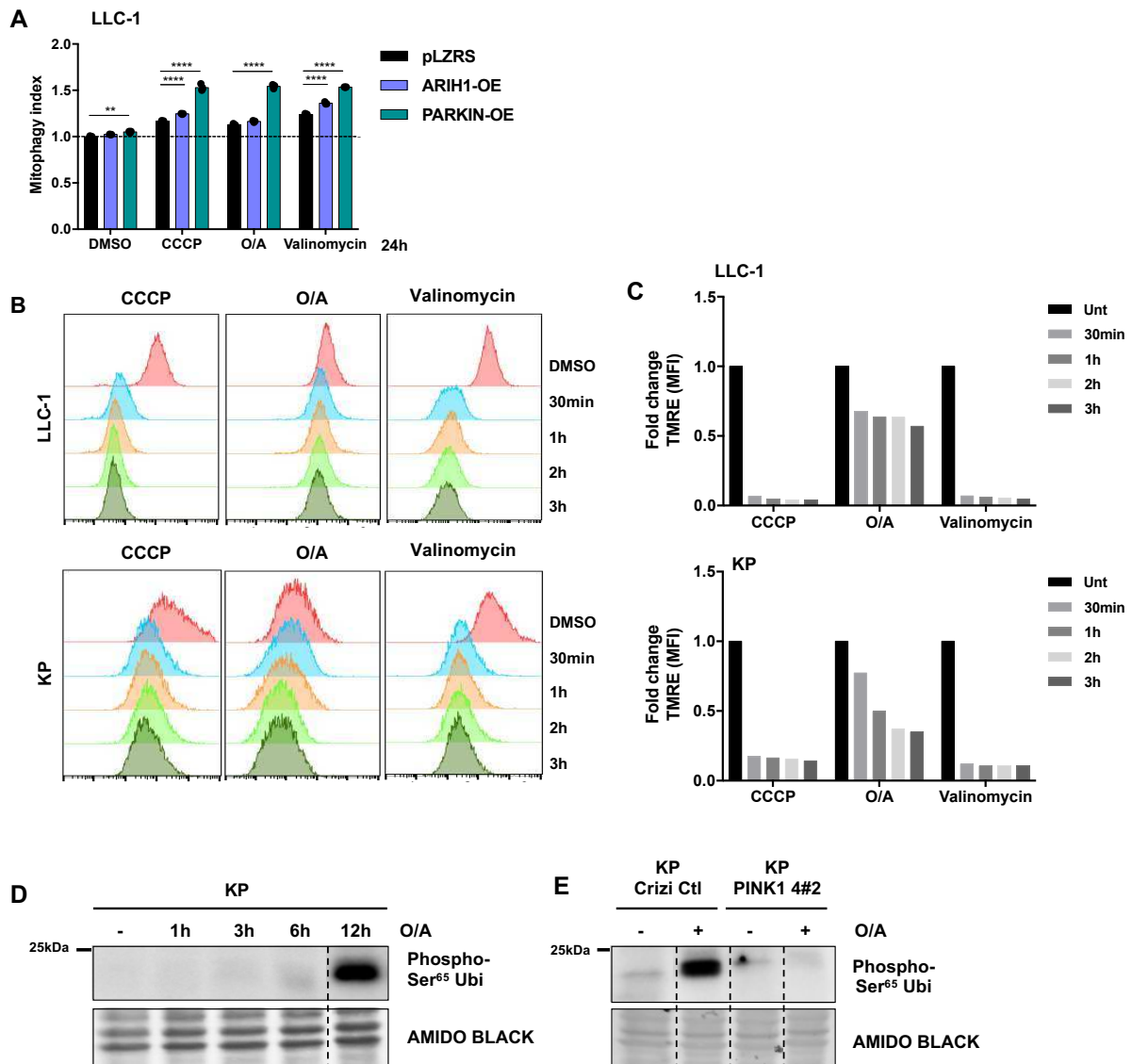
I



### Figure S1: ATG7-mediated autophagy is required for degradation of lung cancer cell mitochondria upon uncoupling treatments.

(A) Representative Z-stack confocal images of KP cells treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without O/A (10 $\mu$ M) for 24h or 48h, and immunostained COX IV (red). DNA was stained with DAPI (blue). Bar scale: 50 $\mu$ m. One experiment was performed. (B) Whole cell lysates of KP cells treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without O/A (1 $\mu$ M), or Valinomycin (10nM) and/or BAF for 12h, were analyzed by immunoblotting for LC3 expression and (C) the quantification of LC3-II/LC3-I ratio is shown, representing one of more than 3 experiences performed. (D) DNA of KP cells treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without O/A (1 $\mu$ M) and/or BAF for the indicated times, were extracted and quantitative PCR of COX 2 for mitochondrial DNA (mtDNA) and APP for nuclear DNA (nucDNA) was performed. The mitochondrial-to-nuclear DNA ratio is represented. One experiment was performed (E) Representative Z-stack confocal images of live LLC-1 mito-Keima cells treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without O/A (1 $\mu$ M) for the indicated times. Bar scale: 10 $\mu$ m. (F) LLC-1 and KP mito-Keima cells were treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without CCCP (10 $\mu$ M), O/A (1 $\mu$ M), or Valinomycin (10nM) for the indicated times and analyzed by flow cytometry. The ratio between the 561nm and 488 nm mean fluorescence intensity (MFI) (mitophagy index) is represented here. At least 3 experiments were performed in triplicate. (G) LLC-1 and KP mito-Keima cells were treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without CCCP (10 $\mu$ M), O/A (1 $\mu$ M), or Valinomycin (10nM) and/or BAF for 48h and analyzed by flow cytometry. At least 3 experiments were performed in triplicate. (H) Whole cell lysates of ATG7-deficient LLC-1 and KP and control cells treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with BAF (10nM) for 24h were analyzed by immunoblotting for ATG7 and LC3 proteins. (I) ATG7-deficient LLC-1 and KP mito-Keima (ATG7#2) and control (Crizi Control) cells were treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without CCCP (10 $\mu$ M), O/A (1 $\mu$ M), or Valinomycin (10nM) for the indicated times and analyzed by flow cytometry. At least 3 experiments were performed in triplicate. All values are mean  $\pm$  SEM. \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.0001 or \*\*\*\* $P$ <0.00001 according to two-way ANOVA.

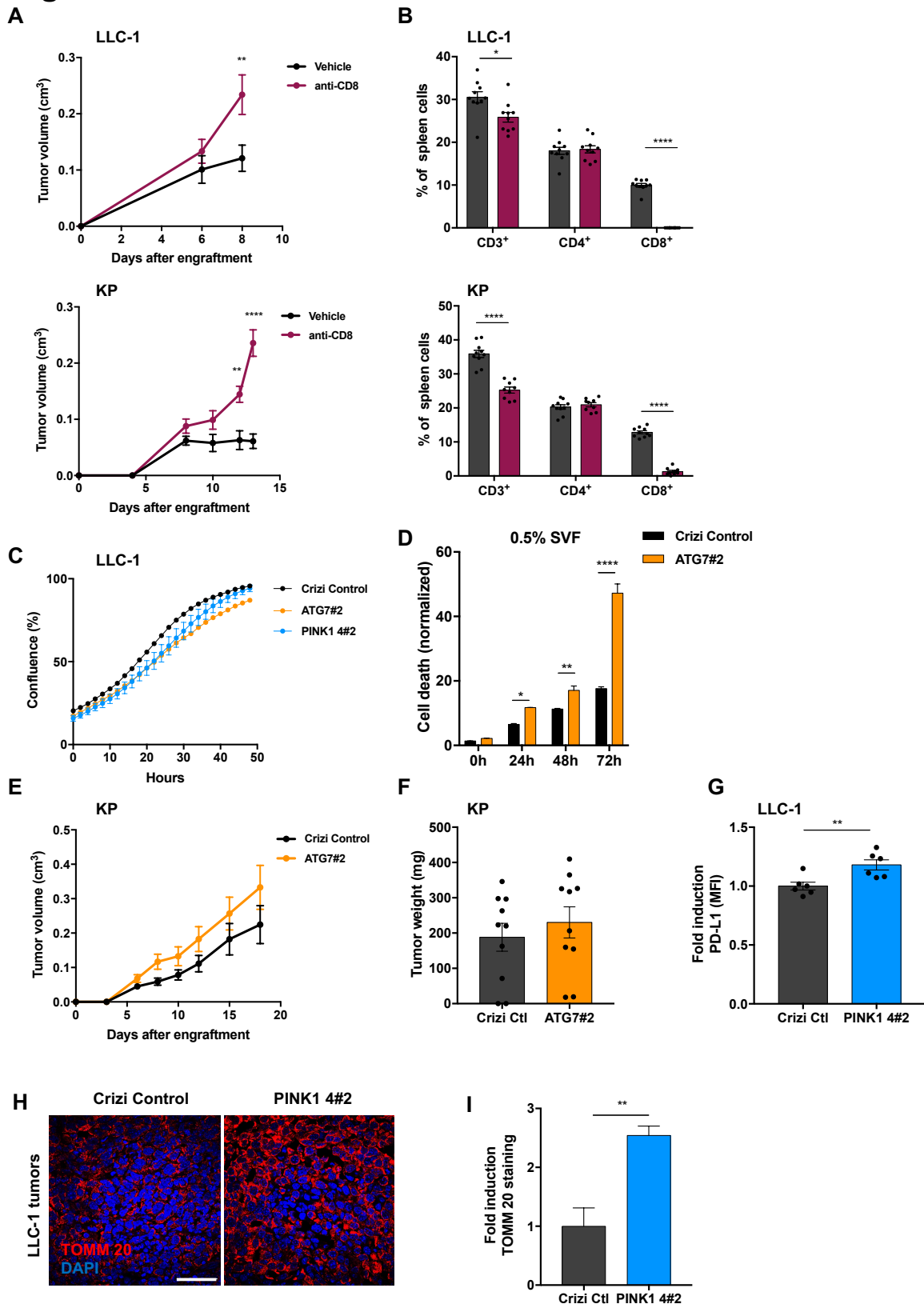
**Figure. S2**



**Figure S2: Uncoupling treatments induce mitochondrial depolarization and promote PINK1-mediated mitophagy.**

(A) LLC-1 overexpressing ARIH1 (ARIH1-OE) or PARKIN (PARKIN-OE) mito-Keima cells were treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without CCCP (10 $\mu$ M), O/A (1 $\mu$ M), or Valinomycin (10nM) for 24h and analyzed by flow cytometry. LLC-1 mito-Keima cells with an empty vector are noted pLZRS. 2 experiments were performed in triplicate. (B) LLC-1 and KP cells were treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without CCCP (10 $\mu$ M), O/A (1 $\mu$ M), or Valinomycin (10nM) for the indicated times, then stained with the polarization-sensitive dye TMRE and (C) quantified by flow cytometry. 2 experiments were performed. (D) Whole cell lysates of KP cells treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without O/A (1 $\mu$ M) for the indicated times were analyzed by immunoblotting for the Phospho-Ser<sup>65</sup> ubiquitin. Immunoblot was reconstituted as showed by the dashed line. The immunoblot was performed at least 3 times. (E) Whole cell lysates of PINK1-deficient KP and control cells treated with Q-VD-OPh (20 $\mu$ M) and with or without O/A (1 $\mu$ M) for the indicated times were analyzed by immunoblotting for the Phospho-Ser<sup>65</sup> Ub. Immunoblot was reconstituted as showed by the dashed line. The immunoblot was performed at least 3 times. All values are mean  $\pm$  SEM. \*\*P<0.01 or \*\*\*\*P<0.00001 according to two-way ANOVA.

**Figure. S3**



**Figure S3: ATG7-mediated autophagy and PINK1-mediated mitophagy control *in vivo* tumor development of lung cancer cells.**

**(A-B)** Syngeneic C57BL/6 mice were subcutaneously injected with  $1 \cdot 10^6$  LLC-1 or KP cells and were intraperitoneally injected with a CD8 blockade antibody every two days ( $100\mu\text{g}/\text{mouse}$ ). One experiment was performed with 10 mice per group. **(A)** Median tumor growth curves and **(B)** quantification of  $\text{CD3}^+$ ,  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$  and  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$  populations in spleens by flow cytometry at day 9 and 13 are depicted, for LLC-1 and KP tumors respectively. **(C)** Cell proliferation assay of control, ATG7- or PINK1-deficient LLC-1 cells. **(D)** Cell proliferation assay of control or ATG7-deficient LLC-1 cells in 0.5% SVF. **(E-F)** Syngeneic C57BL/6 mice were subcutaneously injected with  $2 \cdot 10^6$  ATG7-deficient (ATG7#2) or control (Crizi Control) KP cells. One experiment was performed with 10 mice per group. **(E)** Median tumor growth curve and **(F)** their tumor weight at day 18 is showed. **(G)** Membrane PD-L1 levels in PINK1-deficient LLC-1 cells quantified by flow cytometry following 48h of  $\text{IFN}\gamma$  treatment. Data represent the pool of two independent experiments performed in triplicate **(H)** Representative confocal images of PINK1-deficient LLC-1 tumors immunostained for DAPI (blue) and TOMM20 (red) and **(I)** quantification of TOMM20 staining. Bar scale:  $50\mu\text{m}$ . All values are mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  or \*\*\*\* $P < 0.00001$  according to two-way ANOVA or T.TEST.



## DISCUSSION

---

### 1. Le rôle du cholestérol dans le développement tumoral

#### 1.1. Perturbations de l'efflux du cholestérol dans les tumeurs pulmonaires

Afin d'étudier les perturbations métaboliques du cholestérol dans le développement tumoral de cancer de poumon, nous avons utilisé le modèle murin de cancer de poumon  $CCSP^{CRE-ERTM/+};Kras^{G12D/+}$  (CC-LR). L'activation de l'oncogène  $KRAS^{G12D}$  est induite par l'expression de la recombinaise Cre, exprimée spécifiquement dans les cellules  $CCSP^+$  (*clara cell secretory protein*) épithéliales pulmonaires. La Cre est alors exprimée dans les cellules de Clara présentes au niveau des bronches mais également dans les cellules souches broncho-alvéolaires (*bronchoalveolar stem cells*, BASCs) caractérisées par la co-expression du marqueur des cellules de Clara (CCSP) ainsi que du marqueur des cellules épithéliales alvéolaires AT2 (*surfactant protein C*, SP-C du gène *Sftpc*). Au vu de leur emplacement et de l'expression spécifique des doubles marqueurs, les BASCs sont des cellules souches capable de régénérer les cellules de Clara des bronches lors de dommages pulmonaires, mais également les cellules AT2 présentes aux niveaux des alvéoles (Liu et al., 2020; Salwig et al., 2019). Il avait initialement été démontré que cette population de BASCs était susceptible d'être à l'origine du développement d'adénocarcinome (Kim et al., 2005). Étant donné que les BASCs sont les cellules progénitrices de différents types cellulaires pulmonaires dont les AT2, il n'est pas surprenant que des études ultérieures ont montré que les cellules AT2 pouvaient également être à l'origine du développement d'adénocarcinome pulmonaire (Desai et al., 2014; Mainardi et al., 2014). Au démarrage du projet, les souris SFTPC-Cre n'existait que dans les modèles complexes Tet-On nécessitant de croiser des souris doubles transgéniques (SFTPC-rTtA x TetO-Cre). Par la suite, les modèles SFTPC-Cre inducible par le tamoxifène ont été développés et aurait également pu être utilisés pour cibler non seulement les BASCs, mais aussi les cellules AT2, également décrites pour être à l'origine tumorale.

Nous avons délibérément choisi un modèle murin non métastatique car nous voulions étudier des stades précoces de cancer de poumon et s'intéresser au rôle de l'efflux du cholestérol dans l'initiation et le développement de cancer. Le modèle murin utilisé dans ce projet d'étude développe donc de nombreuses lésions tumorales mais assez petites en taille limitant l'étude de tumeurs isolées. Ainsi, nous avons analysé les poumons dans leur globalité dans nos approches de cytométrie en flux ou de transcriptomique afin d'appréhender la physiopathologie globale des poumons. Par cytométrie en flux, puisque nous ne possédons pas de marqueurs spécifiques des cellules cancéreuses ou des BASCs, nous avons utilisé sur des marqueurs préalablement identifiés pour discriminer ces populations cellulaires du reste des cellules pulmonaires à partir des marqueurs de surface épithélial EpCAM (*epithelial*

*cell adhesion molecule*) et CD24 (*cluster of differentiation 24*). Ainsi dans nos analyses, les populations de cellules épithéliales EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>inter</sup> sont enrichies en cellules cancéreuses et en BASCs tandis que les cellules EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> représentent les cellules ciliées. Par la suite, l'expression spécifique du rapporteur YFP, sous le contrôle de la Cre qui permet également l'expression de l'oncogène KRAS<sup>G12D</sup>, nous a montré que parmi la population de cellules épithéliales EpCAM<sup>+</sup> identifiées en cytométrie en flux se trouvait une population de cellules YFP<sup>+</sup>. Ces cellules YFP<sup>+</sup> sont donc celles exprimant également l'oncogène KRAS<sup>G12D</sup>, représentant alors les BASCs. Il n'est pas surprenant que ces cellules soient retrouvées en faible nombre car il a été décrit que les BASCs ne représentaient qu'un faible pourcentage des cellules épithéliales en utilisant des modèles similaires de souris avec un gène rapporteur (Liu et al., 2020; Salwig et al., 2019). En revanche, nous avons clairement pu identifier que non seulement les cellules YFP<sup>+</sup> mais également l'ensemble des cellules épithéliales EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>inter</sup> et EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> étaient amplifiées dans notre modèle de cancer de poumon. Cela pourrait être expliqué en partie par les mécanismes montrant que les cellules cancéreuses à l'origine du cancer peuvent impacter les cellules environnantes (Ombrato et al., 2019). Ainsi, malgré le manque de marqueurs spécifiques de cellules épithéliales cancéreuses par cytométrie, notre approche nous a permis d'étudier l'impact de la déficience des voies d'efflux du cholestérol et en particulier l'accumulation de cholestérol dans ces cellules épithéliales en association avec leur capacité proliférative.

De plus, l'analyse transcriptomique du séquençage à haut débit de l'expression génique des cellules individuelles des poumons a permis de confirmer qu'au sein du cluster de population des cellules épithéliales, nous retrouvions une amplification des BASCs en l'absence des voies d'efflux de cholestérol. Il serait intéressant de comparer notre analyse de « single cell » à celle récemment réalisée dans une étude récente identifiant des BASCs retrouvées dans le cancer du poumon (Marjanovic et al., 2020) : les protocoles de digestion des tissus pulmonaires tumoraux ont été montrés pour induire un biais d'isolation des cellules épithéliales, affectant ainsi le nombre final de cellules étudiées. En revanche, nous avons clairement pu identifier des perturbations des voies d'efflux du cholestérol dans les poumons des souris CC-LR comparés aux contrôles, et plus particulièrement, nous avons observé une diminution de l'expression des gènes *Abca1* et *Abcg1* dans les macrophages et le cluster de cellules épithéliales contenant les BASCs. La diminution de l'expression des transporteurs impliqués dans l'efflux du cholestérol pourrait alors expliquer l'accumulation de cholestérol observée dans ces deux types cellulaires par cytométrie en flux.

Étant donné que les taux des HDLs plasmatiques sont fortement réduits chez les souris CC-LR comparées aux souris contrôles et qu'ils permettent l'efflux cellulaire du cholestérol grâce aux transporteurs ABCA1 et ABCG1, dont l'expression est diminuée dans les tumeurs, l'accumulation de cholestérol des tumeurs par l'altération des voies d'efflux du cholestérol est donc associée au développement d'adénocarcinome pulmonaire.

Afin de déterminer la contribution de l'accumulation du cholestérol dans les macrophages et les BASCs durant le développement de cancer de poumon, nous avons exacerbé l'accumulation intracellulaire en invalidant les transporteurs ABCA1 et ABCG1 pour chacun des deux types cellulaires.

## 1.2. L'accumulation du cholestérol des macrophages augmente l'hyperplasie

Nous avons tout d'abord reconstitué le compartiment hématopoïétique des souris CC-LR préalablement irradiées par la transplantation de moelle osseuse provenant de souris dont les cellules myéloïdes sont invalidées pour ABCA1 et ABCG1. La génération de souris chimère présente des limites puisque nous repeuplons les macrophages alvéolaires (AMs) à partir de cellules souches progénitrices hématopoïétiques via la différenciation des monocytes dans le poumon, alors que les AMs sont physiologiquement des cellules résidentes s'auto-renouvelant (Hashimoto et al., 2013). Néanmoins, les AMs provenant de la différenciation des monocytes circulants sont transcriptionnellement et fonctionnellement similaires aux AMs résidents des poumons (van de Laar et al., 2016; Lavin et al., 2014; McQuattie-Pimentel et al., 2019). Ainsi, nous avons observé que l'inactivation d'ABCA1 et ABCG1 dans les cellules myéloïdes a entraîné une chute drastique du nombre des AMs associée à une augmentation des populations myéloïdes inflammatoires, ayant pour conséquence l'augmentation de l'hyperplasie des lésions des souris CC-LR.

Ces résultats diffèrent de ceux préalablement observés dans la littérature, démontrant que l'absence des transporteurs ABCA1 et ABCG1 dans les macrophages les polarisent vers un phénotype pro-inflammatoire ayant pour conséquence une diminution de la progression tumorale (Goossens et al., 2019; Sag et al., 2015; Zamanian-Daryoush et al., 2017). Différentes explications pourraient être envisagées : tout d'abord, ces études utilisent des modèles murins syngéniques, basés sur l'inoculation de cellules cancéreuses dans des souris immunocompétentes ; notre modèle de chimère se rapproche plus de la physiopathologie du cancer du poumon, et les AMs résidents, bien que préalablement repeuplés par les monocytes, sont les premiers acteurs participant au développement de cancer de poumon, avant l'arrivée des monocytes se différenciant en macrophages comme cela est le cas dans les modèles syngéniques (Casanova-Acebes et al., 2021). Ainsi, notre modèle CC-LR s'apparente à un modèle d'étude de l'initiation tumorale dans lequel les macrophages semblent jouer un rôle différent dans les premières étapes de développement de cancer du poumon contrairement aux modèles syngéniques qui sont des modèles de cancers établis. De plus, ces études se portent sur d'autres types de cancers, pouvant suggérer alors des interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires, dont les macrophages, différentes de celles observées dans notre modèle. Ainsi, bien que nous n'ayons pas identifié les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu lors de la perte des transporteurs ABCA1 et ABCG1 dans les

macrophages au cours du développement des cancer du poumon chez les souris CC-LR, leur invalidation augmente le nombre de lésions hyperplasiques ce qui, dans des temps de développement plus long, aurait probablement conduit à une transformation cellulaire des cellules hyperprolifératives et donc à une augmentation du nombre de tumeur. Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse que l'invalidation de ces transporteurs dans les macrophages du poumon entraîne une augmentation du stress oxydatif pouvant être à l'origine d'un environnement pro-oxydatif et ce qui tendrait donc à augmenter l'hyperplasie pulmonaire (Yvan-Charvet et al., 2010b). Il aurait été intéressant d'invalider les transporteurs ABCA1 et ABCG1 dans les macrophages une fois les tumeurs établies. Pour cela, la transplantation de moelle osseuse aurait pu être réalisée après l'induction des souris au tamoxifène car les cellules cancéreuses pulmonaires portant la mutation oncogénique KRAS<sup>G12D</sup> semblent résistantes à l'irradiation (Wang et al., 2017). Cela aurait permis d'étudier le rôle de l'accumulation du cholestérol des macrophages pulmonaires dans la progression tumorale et de confirmer ou non le rôle différent des voies d'efflux des macrophages qui semblerait être anti-tumorales dans le cancer du poumon.

### 1.3. L'accumulation du cholestérol des BASCs participe à la progression tumorale

Dans un second temps, nous avons pu démontrer que l'invalidation des transporteurs ABCA1 et ABCG1 spécifiquement dans les cellules exprimant la mutation oncogénique KRAS<sup>G12D</sup> augmentait la taille des lésions tumorales pulmonaires, sans affecter le nombre de nodules pour autant. Cela signifie alors que l'accumulation du cholestérol confère un avantage prolifératif des cellules à l'origine du développement des tumeurs, c'est à dire les BASCs, ce qui se traduit par une augmentation du nombre de cellules cancéreuses.

Il semblerait également que l'absence des deux transporteurs ABCA1 et ABCG1 dans les BASCs modifie l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des cellules comme démontré par les analyses transcriptomiques de séquençage à haut débit. En effet, les gènes impliqués dans les voies métaboliques de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative ont été surexprimés dans le cluster de cellules épithéliales contenant les BASCs par rapport au cluster provenant des souris CC-LR, suggérant alors des besoins énergétiques accrus ce qui pourrait contribuer à la prolifération plus importante de ces cellules. Il serait donc intéressant de mieux comprendre la connexion entre l'efflux du cholestérol et le métabolisme mitochondrial de la cellule tumorale. Ainsi, il serait important de confirmer la véracité de ces possibles reprogrammations métaboliques par l'utilisation par exemple de glucose marqué *in vivo* qui permettrait de déceler une avidité augmentée pour le glucose, si elle existe, des cellules cancéreuses déficientes pour ABCA1 et ABCG1. Nous pourrions également étudier d'autres sources énergétiques puisqu'il a été décrit que les cellules cancéreuses composant les adénocarcinomes pulmonaires sont également capable

d'utiliser le lactate et/ou les acides gras (Dias Amoedo et al., 2021; Hensley et al., 2016). De plus, des expériences supplémentaires *ex vivo* pourraient être envisagées dans le but de caractériser davantage les possibles reprogrammations métaboliques, et utiliser notamment le SeaHorse afin d'étudier les voies glycolytiques ainsi que oxydatives des cellules cancéreuses déficientes pour ABCA1 et ABCG1.

Outre la supposée reprogrammation métabolique, l'invalidation des transporteurs ABCA1 et ABCG1 dans les cellules cancéreuses a également modifié l'environnement immunitaire. En effet, nous avons pu observer une diminution des populations myéloïdes inflammatoires reflétant probablement la perte de surveillance immunitaire anti-tumorale. Nous n'avons cependant pas observé d'effets synergiques sur le développement des tumeurs lors de la déficience des transporteurs à la fois dans les cellules cancéreuses et les macrophages, et le possible stress oxydatif engendré par la déficience d'ABCA1 et ABCG1 dans les macrophages comme décrit pour les chimères CC-LR, a cependant été dominant sur les modifications du profil immunitaire. Les mécanismes à l'origine de cet échappement tumoral dépendant de l'efflux de cholestérol restent cependant à être identifiés. Il semblerait ainsi que l'absence d'efflux de cholestérol dans la cellule cancéreuse engendre une accumulation de cholestérol et active différents mécanismes indispensables à sa croissance.

D'un point de vue cellulaire, nos résultats *in vivo* et *in vitro* ont clairement identifié qu'un des mécanismes centraux de ces effets était lié à un effet intrinsèque sur la prolifération cellulaire et l'amplification des voies de signalisation responsable de cette prolifération. En effet, le cholestérol dans les cellules est indispensable à la prolifération cellulaire afin de former des membranes et permet alors de générer de nouvelles cellules, mais le cholestérol constitue également le lipide principal des radeaux lipidiques membranaires. Ces structures membranaires particulières sont riches en diverses molécules de signalisation et ont été associées aux développements de nombreux types de cancers (Vona et al., 2021). Nous étudions actuellement les radeaux lipidiques des cellules cancéreuses des souris CC-LR et nos premiers résultats nous permettent de confirmer l'augmentation du nombre des radeaux lipidiques au sein des cellules cancéreuses de poumon. Des analyses protéomiques sont également en cours permettant d'identifier les protéines associées à ces radeaux lipidiques et ainsi mettre en évidence les voies de signalisation régulées par le cholestérol des radeaux lipidiques des cellules cancéreuses des souris CC-LR participant à l'initiation et le développement précoce de cancer de poumon. Néanmoins, le cholestérol peut également être estérifié et stocké dans les cellules sous forme de gouttelettes lipidiques qui possèdent de nombreux rôles dans le cancer (Cruz et al., 2020). Il est possible de doser et de distinguer le cholestérol libre du cholestérol estérifié et il serait important dans notre étude de différencier la forme de cholestérol qui est accumulée dans nos cellules cancéreuses observé par cytométrie en flux et cela permettrait de mieux comprendre son rôle et les mécanismes qu'il active au sein des cellules cancéreuses qui tendent à augmenter le développement tumoral des cancers du poumon.

Afin de confirmer l'importance des transporteurs ABCA1 et ABCG1 dans le développement de cancer de poumon dont l'expression est diminuée dans les cellules cancéreuses, nous aurions pu envisager de surexprimer ces deux transporteurs. Pour cela, nous pourrions administrer par injection intra-trachéale aux souris *Kras<sup>LSL-G12D/+</sup>* des particules virales de lentivirus contenant la recombinaise Cre ainsi que les gènes ABCA1 et ABCG1 sous le contrôle d'un promoteur fort. Cela aurait permis d'activer l'expression de la mutation oncogénique KRAS<sup>G12D</sup> dans des cellules surexprimant les transporteurs impliqués dans les voies d'efflux cellulaire du cholestérol et ainsi d'étudier si l'efflux du cholestérol permet de diminution d'une part de l'hyperprolifération des cellules engendrée par l'activité de KRAS<sup>G12D</sup> mais d'autre part, si cela diminue la transformation cellulaire et donc le développement de tumeurs pulmonaires.

#### 1.4. L'efflux du cholestérol réduit la progression tumorale

Nous avons démontré que l'accumulation du cholestérol au sein des cellules cancéreuses, et dans une moindre mesure des macrophages, participait à la progression tumorale. De ce fait, l'efflux cellulaire du cholestérol médié par les transporteurs ABCA1 et ABCG1 semble limiter le développement de cancer du poumon. Pour confirmer cela, nous avons utilisé un modèle transgénique surexprimant l'ApoA-I, la principale composante des HDLs. L'augmentation des niveaux d'HDLs plasmatiques a permis d'une part de limiter l'accumulation du cholestérol pulmonaire, mais également de considérablement diminuer le développement tumoral induit par la mutation KRAS<sup>G12D</sup>. Nous avons observé que la surexpression de l'ApoA-I diminuait la voie de signalisation en aval de l'activation de KRAS, se traduisant par une diminution de la phosphorylation de ERK. Dans un second temps, nous avons pu observer que limiter l'accumulation du cholestérol à l'aide de méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD) permettait d'induire la régression des tumeurs pulmonaires préalablement établies. La M $\beta$ CD permet d'extraire le cholestérol des membranes, indépendamment de l'efflux cellulaire du cholestérol, ce qui favorise la régression tumorale. Néanmoins, des peptides mimétiques de l'ApoA-I ont été développés et permettent la formation des particules fonctionnelles d'HDLs *in vivo* (Su et al., 2010). L'utilisation de ces peptides mimétiques aurait permis de mettre directement en évidence l'implication des transporteurs ABCA1 et ABCG1, puisqu'ils effluent le cholestérol vers l'ApoA-I et les HDLs, dans la régression des tumeurs établies.

Les mécanismes moléculaires responsables de la diminution de l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 à la fois dans les cellules cancéreuses ainsi que dans les macrophages, engendrant la diminution de l'efflux du cholestérol et donc son accumulation intracellulaire, sont à ce jour inconnus. Puisque le facteur LXR régule et induit l'expression des gènes des transporteurs *Abca1* et *Abcg1* et que malgré l'abondance du cholestérol dans les cellules cancéreuses, LXR ne s'active plus en réponse à l'augmentation des taux élevés de cholestérol intracellulaire (Bovenga et

al., 2015; Lin and Gustafsson, 2015) nous avons tenté de l'activer *in vivo* par traitement des souris CC-LR avec son agoniste synthétique T0901217. Cependant, nous n'avons observé aucun effet direct sur la croissance tumorale à la suite du traitement, ni sur la prolifération des cellules cancéreuses *ex vivo*. Ces résultats ont donc suggéré que d'autres voies de régulations sont mises en place dans les cellules tumorales de notre modèle CC-LR. Parmi les différentes hypothèses, il a été montré qu'ABCA1 est une cible transcriptionnelle directe du facteur de transcription thyroïdien 1 (TTF-1, aussi connu sous le nom de Nkx2.1), qui joue un rôle crucial dans la maturation et la morphogenèse pulmonaires. Ainsi, la surexpression du facteur Nkx2.1 augmente l'expression d'ABCA1 dans des cellules de cancer de poumon *in vitro* (Lai et al., 2018). Cependant, nous n'avons pas détecté de diminution de l'expression transcriptionnelle de ce facteur dans le cluster de cellules épithéliales des souris CC-LR. Un rôle de miR 33 n'est pas à exclure au vu de son importance dans la régulation des transporteurs. Quoiqu'il en soit, l'équipe avait également montré précédemment que de nombreuses voies de signalisation induisant de la prolifération (ERK, JAK/STAT et PI3K) contribuaient à la diminution de l'expression des transporteurs *Abca1* et *Abcg1* (Yvan-Charvet et al., 2010c), consistant avec les observations faites dans notre étude. Cependant, nous ne savons pas à l'heure actuelle les mécanismes impliqués dans ces régulations, et des analyses approfondies sont donc nécessaires. Néanmoins, les perturbations locales et systémiques des voies d'efflux du cholestérol observées dans les modèles précliniques murins de cancer de poumon ont été confirmées chez les patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires dans notre étude et suggérant que l'élimination du cholestérol intracellulaire des tumeurs humaines pourraient réduire le développement tumoral et donc améliorer la condition des patients.

Étant donné que notre modèle CC-LR est un modèle murin précoce de cancer de poumon, il serait intéressant par la suite d'étudier le rôle de l'accumulation du cholestérol des cellules cancéreuses dans des modèles murins agressifs de cancer de poumon. Pour cela, des modèles existent et sont bien décrits dans la littérature, et reposent sur l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *P53*. Ainsi, les souris *CCSP<sup>PCRE-ERTM/+</sup>;Kras<sup>G12D/+</sup>;P53<sup>-/-</sup>* développent plus rapidement des adénocarcinomes pulmonaires qui métastasent par la suite et envahissent les organes périphériques. Cela nous permettrait d'étudier le rôle des voies d'efflux du cholestérol dans des stades tardifs de la maladie et de se rapprocher de la pathologie humaine puisque la majorité des patients sont diagnostiqués à des stades avancés de cancer de poumon. Il avait été proposé dans d'autres types de cancers que le cholestérol au sein des radeaux lipidiques participait grandement aux processus de métastase (Nicolson, 2015; Vona et al., 2021; Yamaguchi et al., 2009). Il est alors important d'étudier ces mécanismes dans le cancer du poumon mais également de déterminer si les thérapies d'élimination du cholestérol comme l'inhalation de la M $\beta$ CD ou l'administration des peptides mimétiques l'ApoA-I, une fois les adénocarcinomes pulmonaires établis, sont capables de réduire la croissance des adénocarcinomes agressifs et limiter les processus de métastase.



## 2. Le rôle de la mitophagie dans le développement tumoral

Afin d'étudier le rôle *in vivo* de la mitophagie dans le développement de cancer du poumon à partir de modèles d'études murins, nous devons tout d'abord déterminer si l'élimination des mitochondries endommagées de nos lignées de cellules cancéreuses nécessitait la mitophagie et par la suite, identifier les acteurs moléculaires participant au processus de mitophagie pour enfin les invalider *in vivo*.

### 2.1. Caractérisation de la mitophagie des cellules cancéreuses pulmonaires murines

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si l'élimination des mitochondries endommagées *in vitro* à la suite de traitement par des agents découplants la chaîne respiratoire des cellules cancéreuses pulmonaires murines nécessitait le processus de la mitophagie. Pour cela, nous avons utilisé deux lignées cellulaires de cancer du poumon, les cellules LLC-1 (*Iewis lung carcinoma*) et des cellules dérivées d'adénocarcinome de souris *Kras*<sup>G12D/+</sup>;*P53*<sup>-/-</sup> (KP). Nos résultats préliminaires semblent indiquer que l'élimination des mitochondries *in vitro* de ces cellules requiert la machinerie de l'autophagie, caractérisée par la formation des autophagosomes dépendante de l'activité de la protéine ATG7, ainsi que de la voie lysosomale. En effet, l'invalidation du gène ATG7 et l'inhibition du flux d'autophagique par l'inhibiteur de la H<sup>+</sup>-ATPase vacuolaire, la bafilomycine A1 (BAF), entravent la dégradation mitochondriale. La mitophagie étant caractérisée par l'élimination spécifique des mitochondries par l'autophagie, nous avons donc démontré que les cellules LLC-1 et KP sont capables d'éliminer leurs mitochondries endommagées par la mitophagie.

De nombreuses protéines participent à la mitophagie et engagent des voies distinctes ou interconnectées. La voie de mitophagie la mieux caractérisée implique la sérine/thréonine kinase PINK1 et l'E3 ubiquitine ligase PARKIN. Cependant, dans de nombreux cancer, PARKIN n'est pas exprimée (Bernardini et al., 2017) et l'équipe a récemment montré que l'E3 ligase ARIH1 (*Ariadne RBR E3 Ub protein ligase 1*), appartenant à la même famille des RBR ligases que PARKIN, induisait *in vitro* la mitophagie d'une manière dépendante de PINK1 dans des lignées cellulaires humaines de cancer de poumon (Villa et al., 2017). Nous avons pu montrer que PARKIN n'est pas exprimée dans les lignées cellulaires murines de cancer de poumon LLC-1 et KP, tandis que ARIH1 l'est. Cependant, malgré les nombreuses tentatives d'invalidation d'ARIH1 dans les cellules LLC-1 et KP afin d'étudier son implication dans la mitophagie, nous n'avons pas réussi à générer des clones complètement déficients, probablement en raison du rôle important d'ARIH1 dans la survie cellulaire (Hart et al., 2015). Pour surmonter cette difficulté, nous travaillons actuellement sur différents mutants d'ARIH1 permettant de conserver la fonctionnalité de la protéine requise pour ses différentes fonctions cellulaires, tout en inhibant son activité impliquée dans la

mitophagie (Scott et al., 2016). Une transfection transitoire par des petits ARNs en épingle à cheveux (shRNA) est également envisageable, ce qui permettrait d'inhiber l'expression d'ARH1 et d'étudier son rôle dans la mitophagie. En effet, la mitophagie est un processus intervenant rapidement lors du traitement des cellules par des agents découplants la chaîne respiratoire et les répercussions cellulaires de l'inhibition transitoire d'ARH1, autres que sa potentielle implication dans la mitophagie, ne devraient pas compromettre la survie cellulaire dans ce laps de temps.

Nous avons cependant démontré que la surexpression d'ARH1 augmentait les flux mitophagiques des cellules LLC-1, suggérant alors la présence des partenaires moléculaires d'ARH1 dans ces cellules. L'équipe avait préalablement montré que l'absence des récepteurs autophagiques NDP52 et OPTN n'altérait pas la mitophagie médiée par la surexpression d'ARH1 dans des lignées cellulaires humaines de cancer de poumon (Villa et al., 2017). De ce fait, ces deux acteurs moléculaires ne semblent pas requis à la mitophagie dépendante d'ARH1 et des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer les substrats et/ou partenaires d'ARH1 impliqués dans cette nouvelle voie de mitophagie des cellules cancéreuses. Pour cela, un criblage pan-génomique par invalidation utilisant l'outil CRISPR-Cas9 des cellules cancéreuses pulmonaires a été réalisé dans l'équipe. Les analyses sont en cours et vont permettre d'identifier les acteurs et les partenaires moléculaires de la mitophagie des cellules cancéreuses pulmonaires, néanmoins les gènes impliqués dans l'autophagie ainsi que les fonctions mitochondriales identifiés au cours de ce criblage permettent de valider ce criblage.

Cependant, l'équipe a d'ores et déjà pu identifier un des acteurs moléculaires d'ARH1 dans les lignées cancéreuses pulmonaires humaines. Au même titre que l'activité de l'E3 ligase PARKIN dépend de l'activation et de phosphorylations médiées par la sérine/thréonine kinase PINK1, l'activité de l'E3 ligase ARH1 dans l'initiation de la mitophagie requiert également PINK1 (Villa et al., 2017). Bien que les mécanismes moléculaires précis n'aient pas été identifiés, les phosphorylations sur des résidus sérines et thréonines d'ARH1 suggèrent une action directe de PINK1 (Villa et al., 2017). Dans notre étude, nous avons observé que les agents découplants mitochondriaux entraînent une perte du potentiel membranaire mitochondrial des cellules LLC-1 et KP, évènement qui empêche l'importation de PINK1 dans la matrice mitochondriale et par conséquent sa dégradation, ce qui stabilise la forme non clivée de PINK1 à la membrane mitochondriale externe des cellules LLC-1 et KP, reproduisant les mécanismes bien connus (Matsuda et al., 2010). Puisqu'il n'est pas possible de détecter la protéine murine PINK1 par immunoblot autrement que par l'immunoprécipitation de la protéine, nous avons tenté d'utiliser une méthode de détection de l'activité de PINK1. Ainsi, après sa stabilisation à la membrane externe mitochondriale, PINK1 phosphoryle une ubiquitine (Ub) environnante spécifiquement sur de la sérine 65 (Phospho-Ser<sup>65</sup> Ub) (Kane et al., 2014; Kazlauskaitė et al., 2014). Cette phosphorylation spécifique est indispensable pour la cascade d'activation de la mitophagie dépendante de PARKIN et donc potentiellement pour d'autres partenaires

induisant la mitophagie de manière indépendante de PARKIN mais dépendante de PINK1. L'utilisation de l'anticorps dirigé contre la Phospho-Ser<sup>65</sup> Ub en immunoblot après des temps courts de traitement endommageant les mitochondries a permis de révéler l'apparition et la stabilisation progressive au cours du temps d'une bande d'une vingtaine de kilo-dalton dans les deux lignées cellulaires murines de cancer de poumon LLC-1 et KP. Cette bande ne s'agit probablement pas de l'ubiquitine libre à la vue de la taille à laquelle elle apparaît, bien que nous ne connaissions pas à ce jour l'identité de cette molécule. Elle est en revanche dépendante de l'activation de PINK1 puisqu'elle n'est plus détectée lors de l'inactivation de PINK1 dans les cellules LLC-1 et KP. De plus, l'inactivation de PINK1 a fortement diminué la mitophagie des cellules cancéreuses pulmonaires LLC-1 *in vitro*, démontrant alors que la dégradation des mitochondries endommagées par les agents découplants la chaîne respiratoire dépend, en partie, de l'activité de PINK1. La caractérisation de la mitophagie des cellules KP est quant à elle en cours, afin de déterminer si l'activité de PINK1 est requise. De plus, il aurait été intéressant d'étudier la mitophagie induite non pas par des agents découplants mitochondriaux qui sont de puissants activateurs de la mitophagie, mais par des phénomènes physiologiques, telles que l'hypoxie, qui s'apparentent davantage à des phénomènes susceptibles d'induire la mitophagie dans les tumeurs *in vivo*. Il est à noter que l'activation conjointe de différentes voies de mitophagie en contexte physiopathologique, notion actuellement étudiée dans le domaine, rend l'analyse des résultats obtenus lors de l'inactivation d'un gène plus complexe à interpréter et à replacer dans un contexte global. Il n'est pas non plus à exclure que puisque l'élimination des mitochondries endommagées est essentielle à la survie des cellules, des phénomènes de compensation puissent se mettre également en place. Il serait intéressant d'étudier si d'autres voies dans nos cellules invalidées pour PINK1, notamment via l'accumulation de ROS produits, compensent la perte de PINK1.

Les lignées cellulaires cancéreuses pulmonaires murines LLC-1 et KP sont donc capables d'éliminer leurs mitochondries endommagées par la mitophagie lors de traitements d'agents découplants mitochondriaux entraînant la perte du potentiel membranaire mitochondrial et la stabilisation consécutive de PINK1. PINK1, par des mécanismes encore inconnus dans ces cellules, favorise le recrutement des autophagosomes, eux-mêmes dépendant de l'activité d'ATG7, permettant la séquestration et la dégradation des mitochondries endommagées par l'adressage vers les lysosomes.

## 2.2. La mitophagie dépendante de PINK1 dans le développement tumoral

Afin d'élucider le rôle de la mitophagie dépendante de PINK1 au cours de la progression tumorale *in vivo* et de son impact sur la réponse immunitaire, nous avons inoculé en sous-cutanée les cellules cancéreuses pulmonaires LLC-1 déficientes pour la kinase PINK1 dans des souris immunocompétentes. Nous avons pu observer que

l'invalidation de PINK1 augmentait fortement la progression tumorale ainsi que la masse des tumeurs finales comparée aux tumeurs contrôles. Ce phénotype a été associé à une diminution importante du nombre de neutrophiles infiltrés dans les tumeurs déficientes pour PINK1. L'analyse transcriptomique des cellules cancéreuses isolées à partir des tumeurs a permis de montrer que l'absence de PINK1 engendrait une réduction de l'expression des ARN messagers de CXCL1, G-CSF, IFN $\gamma$  et, dans une certaine mesure, IL-6, des cytokines connues pour contrôler le recrutement et la fonction des neutrophiles (Castellani et al., 2019; McLoughlin et al., 2003; Sawant et al., 2016), expliquant en partie la réduction des neutrophiles observées dans les tumeurs déficientes pour LLC-1. Nous devons valider la diminution des neutrophiles également par des marquages immunofluorescents sur les coupes *ex vivo* des tumeurs déficientes pour PINK1.

Les mitochondries sont capables d'activer des réponses immunitaires par la libération de DAMPs telles que l'ADNmt ou des ROS. Ainsi, l'ADNmt active la voie cGAS-STING, conduisant à l'activation du facteur NF- $\kappa$ B, à la réponse IFN de type I et à la sécrétion de cytokines inflammatoires et participe à l'activité anti-tumorale médiée par les réponses immunitaires. De plus, l'ADNmt et les ROS mitochondriaux activent l'inflammasome NLRP3 et la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$ . Étant donné son rôle dans l'élimination des mitochondries, l'inhibition de la mitophagie augmente l'ADNmt cytosolique qui déclenche alors une réponse pro-inflammatoire (Sliter et al., 2018), susceptible d'augmenter les réponses anti-tumorales. Nous avons montré que la mitophagie des cellules cancéreuses LLC-1 repose sur l'activité de PINK1 *in vitro* et que les cellules cancéreuses des tumeurs déficientes pour PINK1 accumulent *in vivo* des mitochondries aberrantes. Bien que l'activation de la voie cGAS-STING reste à caractériser de manière approfondie, nos résultats suggèreraient que celle-ci ne soit pas activée en réponse à l'accumulation des mitochondries aberrantes dans les cellules cancéreuses des tumeurs déficientes pour PINK1. Premièrement, la progression tumorale plus élevée suggère une réponse anti-tumorale diminuée et deuxièmement, le facteur NF- $\kappa$ B participe au recrutement des neutrophiles (Pittman and Kubes, 2013) or le nombre de neutrophiles est diminué dans les tumeurs déficientes pour PINK1. Dans le même ordre d'idée, nous avons observé une expression réduite de l'ARN messager de l'IL-1 $\beta$  accompagnée d'une légère réduction de l'expression de l'ARN messager de l'IL-6, une cible de l'IL-1 $\beta$ , suggérant que l'accumulation de mitochondries endommagées dans les cellules tumorales déficientes pour PINK1 n'a pas activé pour autant l'inflammasome NLRP3. Bien que la diminution de l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires soit cohérente avec l'augmentation de la croissance tumorale des cellules cancéreuses déficientes pour PINK1, suggérant une réponse immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses diminuée, nous nous serions attendus à l'activation des voies cGAS-STING et de l'inflammasome en réponse aux DAMPs mitochondriaux accumulés lors de l'inhibition de la mitophagie. Ainsi, nous devrions déterminer *in vitro* et *ex vivo* la présence ou non de DAMPs telles que de l'ADNmt cytosoliques dans les LLC-1 déficientes pour PINK1. Conjointement, nous analyserons *in vitro* l'impact de

l'inhibition de la mitophagie par invalidation de PINK1 sur l'expression de cytokines inflammatoires. Cette expérience nous permettra également de vérifier si les différences d'expression des cytokines observées *in vivo* sont récapitulables *in vitro*, et sont donc des défauts intrinsèques aux cellules cancéreuses. En revanche, il est possible d'envisager que d'autres modifications associées à l'absence de PINK1 prédominent l'éventuelle activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale par les DAMPs, contribuant alors à une progression tumorale plus élevée en l'absence de PINK1.

De manière intéressante, des résultats contradictoires ont été répertoriés concernant le rôle de la mitophagie, la classant comme un processus pro- ou anti-tumoral mais convergeant vers un mécanisme commun : l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses. D'une part, les propriétés du microenvironnement tumoral telle que l'hypoxie et la faible disponibilité des nutriments induisent la mitophagie ce qui diminue la masse mitochondriale des cellules cancéreuses (Daskalaki et al., 2018; Webster et al., 2014). Cela participe alors à la reprogrammation métabolique vers la glycolyse aérobie caractérisée par une forte consommation de glucose et la production élevée de lactate pour soutenir les demandes énergétiques de la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses (Semenza, 2012; Vara-Perez et al., 2019), ce qui conduit à l'effet Warburg, une caractéristique précoce des cellules cancéreuses. D'autre part, l'inhibition de la mitophagie augmente les mitochondries dysfonctionnelles et productrices de ROS, ce qui stabilise HIF-1 $\alpha$  et induit l'expression des gènes impliqués dans les voies glycolytiques telles que les transporteurs de glucose et les enzymes de la glycolyse (Agnihotri et al., 2016; Chourasia et al., 2015; Requejo-Aguilar et al., 2014; Yin et al., 2021). Dans ce contexte, la perte de PINK1 ou de BNIP3, reprogramme également le métabolisme du glucose et favorise l'effet Warburg. Ainsi, l'induction ou l'inhibition de la mitophagie induisent toutes deux l'effet Warburg qui participe à l'augmentation la croissance tumorale. Il nous faudrait alors caractériser le statut métabolique des cellules cancéreuses pulmonaires LLC-1 déficientes pour PINK1 afin de déterminer si l'effet Warburg participe à l'augmentation de la progression tumorale observée dans notre étude.

L'effet Warburg induit par la déficience de la kinase PINK1 pourrait également façonner les réponses immunitaires gouvernées par les LTs. Par exemple, puisque la consommation de glucose est augmentée dans les cellules cancéreuses, le glucose est rendu limité pour les LTs dans l'environnement tumoral (Chang et al., 2015), tandis que la production élevée de lactate par les cellules cancéreuses limite la prolifération des LTs (Quinn et al., 2020), ce qui entraîne une réduction de la réponse anti-tumorale. De plus, il a été montré que l'expression de PD-L1, une protéine de point de contrôle inhibant les fonctions effectrices des LTs, des cellules cancéreuses est associée à leur état métabolique (Chang et al., 2015). Puisque nous avons observé une augmentation des niveaux l'expression de PD-L1 membranaires dans les cellules LLC-1 déficientes pour PINK1 *in vitro*, il est envisageable que la déficience en PINK1 dans notre modèle d'étude ait participé à la reprogrammation métabolique vers la glycolyse aérobie

comme démontré précédemment dans d'autres études, ce qui participe à la réduction de la réponse anti-tumorale des LTs. Nous devons explorer davantage les mécanismes régissant l'augmentation de la croissance et de la taille des tumeurs déficientes pour PINK1 et déterminer la contribution de la réponse des LTs. Cependant, une étude a démontré que l'invalidation de PINK1 dans des cellules inoculées à des souris immunodéficientes (nudes), dépourvues de LTs, entraînait une réduction de la croissance tumorale et du poids des tumeurs par rapport aux groupes témoins (Liu et al., 2018). Dans ce cas, le phénotype associé à la déficience en PINK1 repose sur des caractéristiques intrinsèques des cellules plutôt que sur une réponse des LTs. Toutefois ce résultat opposé peut être expliqué par des caractéristiques différentes des cellules cancéreuses utilisées puisque les analyses *in vitro* révèlent que l'absence de PINK1 augmente l'apoptose et une diminution de la prolifération cellulaire, un phénotype que ni nous ni d'autres n'avons pu observer.

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de croissance des tumeurs déficientes pour PINK1 est liée à une réduction de l'immunité anti-tumorale, nous injecterons en sous-cutanées les cellules LLC-1 déficientes pour PINK1 et leurs contrôles dans des souris nudes qui sont incapables de monter une réponse immunitaire adaptative. En revanche, ces souris possèdent un système immunitaire inné fonctionnel, dont font parties les neutrophiles et que nous pensons être impliqués dans notre phénotype. Ainsi, nous envisageons de dépléter cette population cellulaire dans les souris nudes par injection d'un anticorps anti-Ly6G, et nous suivrons la croissance des cellules tumorales greffées.

Dans une mitochondrie saine, PINK1 est clivée au niveau de la matrice mitochondriale et cette forme PINK1 clivée (c-PINK1) est libérée dans le cytosol dans lequel une partie de c-PINK1 sera dégradée, tandis que l'autre partie reste stable et peut exercer différentes fonctions. Afin de déterminer si l'augmentation de croissance tumorale engendrée par l'invalidation de PINK1 dans les cellules cancéreuses est causée par l'inhibition de la mitophagie médiée par PINK1 ou par les autres fonctions connues de c-PINK1, il serait souhaitable d'introduire une forme PINK1 constitutivement active dans les cellules déficientes pour la forme endogène de PINK1 (Okatsu et al., 2015). En effet, lorsque la séquence d'adressage à la matrice mitochondriale de PINK1 est retirée du gène de la protéine (PINK1( $\Delta$ N34)), PINK1 sera tout de même adressée à la mitochondrie grâce à sa seconde séquence, cependant, elle ne pourra plus être clivée. De ce fait, la forme non clivée (mais tronquée  $\Delta$ N34) va s'accumuler à la membrane mitochondriale externe et sera apte à induire la mitophagie. Ainsi, cela nous permettrait d'obtenir des cellules possédant uniquement la forme PINK1 capable d'induire la mitophagie. Si la croissance tumorale des cellules cancéreuses déficientes pour PINK1 surexprimant la forme PINK1( $\Delta$ N34) est diminuée, cela confirmera que l'augmentation de la croissance tumorale en l'absence de PINK1 est causée par l'inhibition de la mitophagie.

### 2.3. L'inhibition de l'autophagie dans le développement tumoral

En parallèle de l'inactivation de la kinase PINK1, nous avons invalidé ATG7 dans les cellules cancéreuses LLC-1 comme contrôle de l'inhibition de globale de l'autophagie non-sélective et sélective. ATG7 est nécessaire pour la conversion de LC3-I en LC3-II, ce qui permet la formation de l'autophagosome, la séquestration de matériel cytoplasmique sélectif par les domaines de reconnaissance LC3 des récepteurs autophagiques, la fusion avec le lysosome et la dégradation (Nguyen et al., 2016; Tsuboyama et al., 2016). Nous avons montré que l'élimination des mitochondries endommagées des cellules de cancer du poumon LLC-1 dépendait d'ATG7, et donc de la machinerie de l'autophagie conventionnelle. La mitophagie est le processus d'élimination des mitochondries sélective par la machinerie de l'autophagie. Cependant, l'autophagie se produit également de manière non sélective, principalement activée par une crise énergétique et une privation en nutriments pour permettre la survie des cellules. Il a été démontré que l'autophagie est activée dans les cellules cancéreuses pour recycler et fournir des substrats métaboliques, qui soutiennent le métabolisme énergétique et biosynthétique imposé par une prolifération incontrôlée (Kimmelman and White, 2017). Ainsi, l'incapacité des cellules cancéreuses à activer l'autophagie réduit drastiquement la croissance tumorale dans des modèles de cancer du poumon (Bhatt et al., 2019; Guo et al., 2013; Rao et al., 2014). Dans notre étude, l'inactivation de la machinerie de l'autophagie n'a pas diminué la croissance tumorale, au contraire, la taille des tumeurs a été fortement augmentée. De plus, la croissance tumorale des cellules LLC-1 déficientes pour ATG7 était plus exacerbée que celle des tumeurs déficientes pour PINK1, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que l'inactivation d'ATG7 impacte toutes les voies de l'autophagie, sélective ou non, et pas uniquement la mitophagie dépendante de PINK1.

Les cellules LLC-1 déficientes pour ATG7 récapitulent *in vitro* les caractéristiques engendrées par une perte de la capacité à recycler les molécules afin de survivre durant une carence nutritionnelle, augmentant alors la mort cellulaire. Ces résultats suggèrent que l'avantage prolifératif observé *in vivo* des cellules cancéreuses déficientes pour ATG7 est dépendant d'autres mécanismes qui pourraient être attribués, au moins en partie, à l'environnement tumoral. D'une part, il est possible que l'environnement tumoral soit riche en nutriment et de ce fait, les cellules cancéreuses ne sont pas dans un état de carence nutritionnelle. D'autre part, le système immunitaire présent dans l'environnement tumoral peut influencer la progression tumorale. Par exemple, nous avons observé une chute drastique de la population des cellules CD45<sup>+</sup> dans les tumeurs déficientes pour ATG7 par rapport aux tumeurs contrôles, un résultat cohérent avec l'augmentation de la croissance tumorale observée, mais contrastant l'évasion immunitaire décrite dans la littérature qui a été attribuée à la machinerie fonctionnelle de l'autophagie (Poillet-Perez et al., 2020; Yamamoto et al., 2020). Bien que nous n'ayons pas observé de changement dans la population totale de cellules CD45<sup>+</sup> dans les tumeurs déficientes pour PINK1, nous

devrons caractériser davantage la réponse immunitaire afin de comprendre les mécanismes qui accroît la progression tumorale.

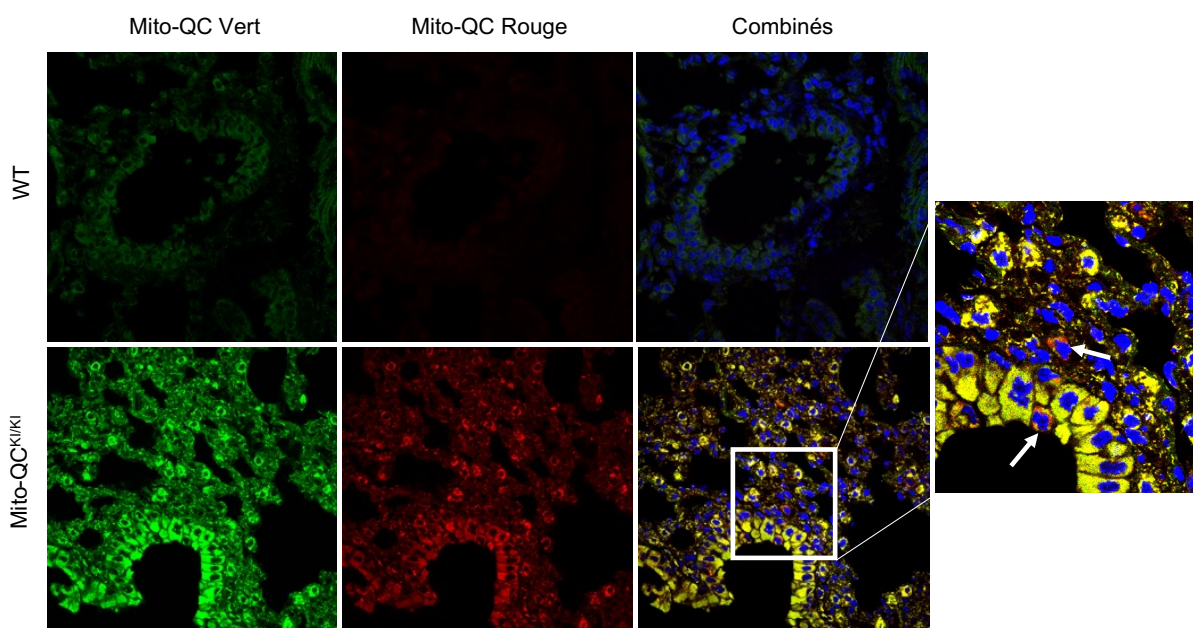
#### 2.4. La sensibilisation des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques

Nous avons montré que l'absence d'ATG7 dans les cellules cancéreuses LLC-1 sensibilisait ces cellules à la mort induite par la cisplatine *in vivo*, comparés aux cellules cancéreuses possédant une machinerie de l'autophagie fonctionnelle. Afin de déterminer si ces résultats dépendent de l'inhibition de l'autophagie globale ou de la mitophagie, nous devrions reproduire cette expérience en utilisant les cellules invalidées pour PINK1. Cependant, nous avons pu observer que l'invalidation de PINK1 sensibilise *in vitro* les cellules cancéreuses à la mort cellulaire. En effet, la mitophagie favorise la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie en éliminant les mitochondries endommagées par les agents anti-cancéreux (Villa et al., 2017). Cependant, ces résultats soutiennent le rôle de la mitophagie dans la survie cellulaire dans les cellules de cancer du poumon. Considérant que la mitophagie permet la résistance thérapeutique et que la mitophagie dépendante de PINK1 semblerait être diminuée dans les cancers du poumon, les patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires dont le flux mitophagique est faible devraient donc mieux répondre aux traitements chimiothérapeutiques. Toutefois, la stratification des patients basée sur l'expression de PINK1 permet de montrer que les patients exprimant faiblement PINK1 présentent un désavantage de survie par rapport aux patients exprimant des taux plus élevés de PINK1 (Lin et al., 2021). Les résultats contradictoires mis en évidence ici doivent être clarifiés davantage afin de comprendre le rôle de PINK1 dans la résistance chimiothérapeutique. Il est toutefois important de garder à l'esprit que l'expression du transcrite de PINK1 n'est ni le reflet de son niveau protéique, ni de son activité kinase impliquée dans la mitophagie. Quel que soit la quantité d'ARN, à l'état basal, la protéine PINK1 n'est pas ou très peu exprimée puisqu'elle est rapidement dégradée dans la mitochondrie. Ce n'est que lorsque les mitochondries sont dysfonctionnelles, avec une atteinte du potentiel de membrane, qu'elle est stabilisée. Il serait donc intéressant d'analyser l'expression protéique par immunofluorescence sur coupe de tissus, ce qui donnerait également une information sur sa localisation subcellulaire.

#### 2.5. Les cancers dans leur environnement pulmonaire

Nos études se sont portées jusqu'à présent sur l'utilisation de modèles syngéniques basés sur l'injection de cellules cancéreuses de cancer du poumon en sous-cutanée dans des souris immunocompétentes. Bien que cela représente un modèle qui permet de tester rapidement l'invalidation d'un gène, ce modèle présente des limites car d'une part il néglige la complexité de l'organe d'origine du cancer, dans notre cas le poumon, et d'autre part il permet d'étudier l'impact d'un gène uniquement

dans la croissance tumorale et non dans l'oncogenèse. Ainsi, afin d'étudier la mitophagie dans le développement de cancer du poumon, nous avons généré des modèles murins de cancer poumon *CCSP<sup>PER-ERT2/+</sup>;Kras<sup>G12D/+</sup>* croisés avec des souris exprimant le rapporteur fluorescent Mito-QC (McWilliams et al., 2016), un rapporteur mitochondrial quelque peu similaire au rapporteur mito-Keima utilisé dans l'étude. La fluorescence du Mito-QC sera verte et rouge à pH 7 cytosolique, tandis qu'uniquement rouge à pH 4 dans les autolysosomes. Ainsi, les mitochondries éliminées par la mitophagie seront rouges comme le montre les flèches blanches sur des coupes de poumon des souris Mito-QC (Figure supplémentaire). Cela nous permettra de visualiser la mitophagie des cellules cancéreuses après l'induction du développement d'adénocarcinomes pulmonaires à différents stades des cancers, dans le but d'étudier les différences, si elles existent, entre l'initiation et la progression tumorale.



**Figure supplémentaire : Sections de poumon des souris sauvage (WT) et homozygote mito-QC<sup>KI/KI</sup>.** La fluorescence verte ne représente que les mitochondries cytosoliques, tandis que la fluorescence rouge représente les mitochondries cytosoliques et dans les vacuoles autophagiques. Les flèches blanches montrent les cellules contenant des mitochondries pris en charge par la mitophagie.

Parallèlement, l'activation de l'oncogène KRAS<sup>G12D</sup> sera induite dans les souris *Kras<sup>G12D/+</sup>;Mito-QC<sup>KI/KI</sup>* par injection intra-trachéale de particules virales contenant un vecteur bicistronique permettant l'expression de la recombinase Cre conjointement à un guide ARN dirigé contre un gène spécifique d'intérêt et de la protéine Cas9 (vecteur lentiviral pSECC) (Sánchez-Rivera et al., 2014). Ainsi, au moment de la transformation cellulaire induite par l'expression de l'oncogène KRAS, nous pourrions également invalider un gène dans la même cellule, tel que PINK1 (ou les gènes identifiés par le criblage), afin d'étudier son rôle cette fois-ci dans l'initiation tumorale du cancer du poumon. De plus, cette approche permettrait d'invalider PINK1 une fois le cancer établi dans le but de distinguer sa contribution dans l'initiation ou dans la progression

tumorale. Nous pourrions monitorer la mitophagie ici aussi grâce au rapporteur Mito-QC.

Dans un dernier temps, nous pourrions confirmer nos résultats par marquages immunohistochimiques et immunofluorescents sur des coupes d'adénocarcinomes pulmonaires humains, cela rendu possible grâce à la collaboration avec le Professeur Paul Hofman, directeur du Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale (LPCE) de Nice. Par exemple, cela nous permettrait d'étudier l'expression protéique de PINK1. En effet, l'implication de PINK1 dans la mitophagie repose sur des modifications post-traductionnelles et de sa stabilisation, de ce fait, il serait plus intéressant d'étudier son expression au niveau protéique que transcriptomique.

## CONCLUSION

---

La reprogrammation métabolique est l'une des principales caractéristiques du cancer qui confère aux cellules cancéreuses la capacité de produire de l'énergie et des biomolécules nécessaires pour répondre aux demandes d'une prolifération incontrôlée. Ainsi, la reprogrammation métabolique est un mécanisme adaptatif mis en œuvre par les cellules cancéreuses après transformation cellulaire pour optimiser leur survie. Dans le cancer du poumon, ces altérations métaboliques sont de plus en plus étudiées et permettent d'identifier de nouvelles vulnérabilités à cibler au cours des traitements anti-cancéreux. Néanmoins, les adénocarcinomes pulmonaires sont des cancers constitués de population de cellules cancéreuses métaboliquement hétérogènes et une meilleure caractérisation des voies métaboliques utilisées par ces cellules cancéreuses représente alors une stratégie clef dans la mise en place de nouveaux traitements anti-cancéreux. Au cours de ma thèse, je me suis donc intéressée aux altérations métaboliques des cellules cancéreuses dans les adénocarcinomes pulmonaires.

Grâce à deux études de recherche, j'ai pu tout d'abord observer que le cholestérol des cellules cancéreuses est impliqué dans le développement tumoral. En effet, les cellules cancéreuses accumulent ce cholestérol par des mécanismes de diminution des voies d'efflux cellulaires impliquant les transporteurs ABCA1 et ABCG1 ainsi que les particules HDLs plasmatiques. Au sein des cellules cancéreuses, le cholestérol est susceptible de participer à la formation de nouvelles membranes, de transduire les signaux de survie et de prolifération cellulaires associés aux radeaux lipidiques, et sembleraient participer à la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses. Au cours de ma seconde étude de thèse, j'ai pu identifier que l'élimination sélective des mitochondries par le processus de la mitophagie dépendante de PINK1 permettait de limiter le développement tumoral, suggérant alors que les mitochondries non éliminées participent au développement tumoral en réduisant notamment la surveillance immunitaire anti-tumorale. Ainsi, des modifications cellulaires des cellules cancéreuses orchestrent l'accumulation de cholestérol et l'accumulation de mitochondries aberrantes, ce qui participe à la croissance tumorale et représentent des nouvelles adaptations métaboliques identifiées dans le cancer du poumon.

Il est possible d'envisager des mécanismes communs à ces deux altérations métaboliques identifiées dans les cancers de poumon au cours de ma thèse. En effet, l'accumulation de cholestérol intracellulaire a été décrite comme réduisant les voies d'autophagie des cellules. Ainsi, l'augmentation de cholestérol au sein des membranes des différentes organelles et vacuoles cellulaires modifie leurs propriétés et empêche notamment l'étape de fusion des autophagosomes avec les lysosomes, ce qui entrave la dégradation du contenu cytoplasmique des autophagosomes par la voie lysosomale (Fraldi et al., 2010; Koga et al., 2010). Étant

donné que la mitophagie dépend de la machinerie de l'autophagie dans le processus d'élimination sélective des mitochondries, il n'est pas étonnant que des défauts de clairance des mitochondries par la mitophagie aient également été identifiés lors de taux cellulaires élevés en cholestérol (Barbero-Camps et al., 2018; Roca-Agujetas et al., 2021). Puisque l'inhibition de l'autophagie générale ou d'une des formes d'autophagie sélective, l'inhibition de la mitophagie, des cellules cancéreuses contribue à la croissance tumorale comme le démontre mes résultats d'études de thèse, l'accumulation cellulaire de cholestérol pourrait, dans un contexte physiopathologique, diminuer l'autophagie et contribuer à la progression tumorale en plus des autres rôles du cholestérol dans la prolifération cellulaire précédemment décrits. Ainsi, l'accumulation de cholestérol des cellules cancéreuses tendrait à réduire l'élimination des mitochondries endommagées par le processus de la mitophagie, pouvant alors contribuer à l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles qui ont été impliquées dans les processus de métastases des adénocarcinomes pulmonaires (Chuang et al., 2020). De manière intéressante, une des formes sélectives de l'autophagie est la dégradation des gouttelettes lipidiques cellulaires contenant les esters de cholestérols stockés dans la cellule, appelé lipophagie (Ouimet et al., 2011). Au cours du processus de la lipophagie, les esters de cholestérol sont reconvertis en cholestérol libre, la seule forme du cholestérol capable d'être effluée par les transporteurs ABCA1 et ABCG1 vers l'ApoA-I et les HDLs. Étant donné que l'inhibition de l'autophagie réduit l'efflux du cholestérol (Ouimet et al., 2011; Robichaud et al., 2021) et que mes résultats d'études de thèse démontrent que l'inhibition de l'autophagie mais également l'inhibition des voies d'efflux du cholestérol participent à la progression tumorale, il semblerait que la diminution de l'autophagie soit en partie responsable de la diminution de l'efflux cellulaire du cholestérol observées dans les cellules cancéreuses et ces deux voies seraient intimement liées, toutes deux participant à la progression tumorale des cancers de poumon.

## REFERENCES

---

### A

Abdrakhmanov, A., Kulikov, A.V., Luchkina, E.A., Zhivotovsky, B., and Gogvadze, V. (2019). Involvement of mitophagy in cisplatin-induced cell death regulation. *Biological Chemistry* 400, 161–170.

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. (1996). Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science* 271, 518–520.

Afonso, M.S., Machado, R.M., Lavrador, M.S.F., Quintao, E.C.R., Moore, K.J., and Lottenberg, A.M. (2018). Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis. *Nutrients* 10, 760.

Agnihotri, S., Golbourn, B., Huang, X., Remke, M., Younger, S., Cairns, R.A., Chalil, A., Smith, C.A., Krumholtz, S.-L., Mackenzie, D., et al. (2016). PINK1 Is a Negative Regulator of Growth and the Warburg Effect in Glioblastoma. *Cancer Research* 76, 4708–4719.

Akutsu, M., Dikic, I., and Bremm, A. (2016). Ubiquitin chain diversity at a glance. *J Cell Sci* 129, 875–880.

Alexandre, A., Reynafarje, B., and Lehninger, A.L. (1978). Stoichiometry of vectorial H<sup>+</sup> movements coupled to electron transport and to ATP synthesis in mitochondria. *Proc National Acad Sci* 75, 5296–5300.

Alexandrov, K., Rojas, M., and Rolando, C. (2006). DNA Damage by Benzo(a)pyrene in Human Cells Is Increased by Cigarette Smoke and Decreased by a Filter Containing Rosemary Extract, Which Lowers Free Radicals. *Cancer Res* 66, 11938–11945.

Alsayyah, C., Ozturk, O., Cavellini, L., Belgareh-Touzé, N., and Cohen, M.M. (2020). The regulation of mitochondrial homeostasis by the ubiquitin proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1861, 148302.

Altmann, S.W., Davis, H.R., Zhu, L., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P.N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., et al. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science* 303, 1201–1204.

Altmann, R.: *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. Leipzig, Veit & Comp, 1890, pp. 28 and 145

Altorki, N.K., Markowitz, G.J., Gao, D., Port, J.L., Saxena, A., Stiles, B., McGraw, T., and Mittal, V. (2019). The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nature Reviews Cancer* 19, 9–31.

Ambivero, C.T., Cilenti, L., Main, S., and Zervos, A.S. (2014). Mulan E3 ubiquitin ligase interacts with multiple E2 conjugating enzymes and participates in mitophagy by recruiting GABARAP. *Cellular Signalling* 26, 2921–2929.

Antonoli, M., Rienzo, M.D., Piacentini, M., and Fimia, G.M. (2017). Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy. *Trends in Biochemical Sciences* 42, 28–41.

Aon, M.A., Bhatt, N., and Cortassa, S.C. (2014). Mitochondrial and cellular

mechanisms for managing lipid excess. *Frontiers in Physiology* 5, 282.

Appelmans, F., and Duve, C.D. (1955). Tissue fractionation studies. 3. Further observations on the binding of acid phosphatase\* by rat-liver particles. *Biochemical Journal* 59, 426–433.

Arbour, K.C., and Riely, G.J. (2019). Systemic Therapy for Locally Advanced and Metastatic Non–Small Cell Lung Cancer. *JAMA* 322, 764–774.

Arensman, M.D., Yang, X.S., Zhong, W., Bisulco, S., Upeslakis, E., Rosfjord, E.C., Deng, S., Abraham, R.T., and Eng, C.H. (2020). Anti-tumor immunity influences cancer cell reliance upon ATG7. *Oncolmmunology* 9, 1800162.

Ashford, T.P., and Porter, K.R. (1962). CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES. *J Cell Biology* 12, 198–202.

Asztalos, B.F., Schaefer, E.J., Horvath, K.V., Yamashita, S., Miller, M., Franceschini, G., and Calabresi, L. (2007). Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states. *Journal of Lipid Research* 48, 592–599.

Attané, C., and Muller, C. (2020). Drilling for Oil: Tumor-Surrounding Adipocytes Fueling Cancer. *Trends Cancer* 6, 593–604.

## B

Barbero-Camps, E., Roca-Agujetas, V., Bartolestis, I., Dios, C. de, Fernández-Checa, J.C., Marí, M., Morales, A., Hartmann, T., and Colell, A. (2018). Cholesterol impairs autophagy-mediated clearance of amyloid beta while promoting its secretion. *Autophagy* 14, 1–26.

Bard, J.A.M., Goodall, E.A., Greene, E.R., Jonsson, E., Dong, K.C., and Martin, A. (2018). Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annual Review of Biochemistry* 87, 1–28.

Basil, M.C., and Morrissey, E.E. (2019). BASC-ing in the glow: bronchioalveolar stem cells get their place in the lung. *Embo J* 38.

Beaulaton, J., and Lockshin, R.A. (1977). Ultrastructural study of the normal degeneration of the intersegmental muscles of *Antheraea polyphemus* and *Manduca sexta* (Insecta, lepidoptera) with particular reference to cellular autophagy. *Journal of Morphology* 154, 39–57.

Benda, C. *Über die Spermatogenese Arch, Anal. Physiol* (1898) 393–398

Bernardini, J.P., Lazarou, M., and Dewson, G. (2017). Parkin and mitophagy in cancer. *Oncogene* 36, 1315–1327.

Bernardini, J.P., Brouwer, J.M., Tan, I.K., Sandow, J.J., Huang, S., Stafford, C.A., Bankovacki, A., Riffkin, C.D., Wardak, A.Z., Czabotar, P.E., et al. (2019). Parkin inhibits BAK and BAX apoptotic function by distinct mechanisms during mitophagy. *The EMBO Journal* 38.

Bertolin, G., Alves-Guerra, M.-C., Cheron, A., Burel, A., Prigent, C., Borgne, R.L., and Tramier, M. (2021). Mitochondrial Aurora kinase A induces mitophagy by interacting with MAP1LC3 and Prohibitin 2. *Life Science Alliance* 4, e202000806.

Bhatt, V., Khayati, K., Hu, Z.S., Lee, A., Kamran, W., Su, X., and Guo, J.Y. (2019). Autophagy modulates lipid metabolism to maintain metabolic flexibility for Lkb1-deficient Kras-

driven lung tumorigenesis. *Genes & Development* 33, 150–165.

Biazik, J., Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.-L. (2015). Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy* 11, 439–451.

Birsoy, K., Wang, T., Chen, W.W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., and Sabatini, D.M. (2015). An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell* 162, 540–551.

Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of Cell Biology* 171, 603–614.

Blériot, C., Chakarov, S., and Ginhoux, F. (2020). Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity* 52, 957–970.

Boadu, E., and Francis, G.A. (2006). The role of vesicular transport in ABCA1-dependent lipid efflux and its connection with NPC pathways. *J Mol Med* 84, 266–275.

Bock, F.J., and Tait, S.W.G. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21, 85–100.

Bodzioch, M., Orsó, E., Klucken, J., Langmann, T., Böttcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Büchler, C., Porsch-Özcürümez, M., et al. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature Genetics* 22, 347–351.

Bovenga, F., Sabbà, C., and Moschetta, A. (2015). Uncoupling Nuclear Receptor LXR and Cholesterol Metabolism in Cancer. *Cell Metabolism* 21, 517–526.

Braciale, T.J., Sun, J., and Kim, T.S. (2012). Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. *Nature Reviews Immunology* 12, 295–305.

Brierley, J. D., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C. (2016) *TNM Classification of Malignant Tumours, 8<sup>th</sup> Edition, Oncology & Radiotherapy*, Wiley-Blackwell ISBN: 978-1-119-26357-9

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1985). A RECEPTOR-MEDIATED PATHWAY FOR CHOLESTEROL HOMEOSTASIS. Nobel Lecture.

Burman, J.L., Pickles, S., Wang, C., Sekine, S., Vargas, J.N.S., Zhang, Z., Youle, A.M., Nezich, C.L., Wu, X., Hammer, J.A., et al. (2017). Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *Journal of Cell Biology* 216, 3231–3247.

## C

Cabukusta, B., and Neefjes, J. (2018). Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic* 19, 761–769.

Calabresi, L., Baldassarre, D., Castelnuovo, S., Conca, P., Bocchi, L., Candini, C., Frigerio, B., Amato, M., Sirtori, C.R., Alessandrini, P., et al. (2009). Functional Lecithin: Cholesterol Acyltransferase Is Not Required for Efficient Atheroprotection in Humans. *Circulation* 120, 628–635.

Callis, J. (2014). The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System. *The*

Arabidopsis Book 12, e0174.

Cañadas, O., Olmeda, B., Alonso, A., and Pérez-Gil, J. (2020). Lipid–Protein and Protein–Protein Interactions in the Pulmonary Surfactant System and Their Role in Lung Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 3708.

Carbone, D.P., Reck, M., Paz-Ares, L., Creelan, B., Horn, L., Steins, M., Felip, E., Heuvel, M.M. van den, Ciuleanu, T.-E., Badin, F., et al. (2017). First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non–Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine* 376, 2415–2426.

Carter, B.W., Lichtenberger, J.P., Benveniste, M.K., Groot, P.M. de, Wu, C.C., Erasmus, J.J., and Truong, M.T. (2018). Revisions to the TNM Staging of Lung Cancer: Rationale, Significance, and Clinical Application. *RadioGraphics* 38, 374–391.

Casanova-Acebes, M., Dalla, E., Leader, A.M., LeBerichel, J., Nikolic, J., Morales, B.M., Brown, M., Chang, C., Troncoso, L., Chen, S.T., et al. (2021). Tissue-resident macrophages provide a pro-tumorigenic niche to early NSCLC cells. *Nature* 1–7.

Castellani, S., D’Oria, S., Diana, A., Polizzi, A.M., Gioia, S.D., Marigiò, M.A., Guerra, L., Favia, M., Vinella, A., Leonetti, G., et al. (2019). G-CSF and GM-CSF Modify Neutrophil Functions at Concentrations found in Cystic Fibrosis. *Scientific Reports* 9, 12937.

Castrillo, A., Joseph, S.B., Vaidya, S.A., Haberland, M., Fogelman, A.M., Cheng, G., and Tontonoz, P. (2003). Crosstalk between LXR and Toll-like Receptor Signaling Mediates Bacterial and Viral Antagonism of Cholesterol Metabolism. *Molecular Cell* 12, 805–816.

Chan, N.C., Salazar, A.M., Pham, A.H., Sweredoski, M.J., Kolawa, N.J., Graham, R.L.J., Hess, S., and Chan, D.C. (2011). Broad activation of the ubiquitin–proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet* 20, 1726–1737.

Chang, C.-H., Qiu, J., O’Sullivan, D., Buck, M.D., Noguchi, T., Curtis, J.D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M.M., van der Windt, G.J.W., et al. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 162, 1229–1241.

Chang, T.Y., and, C.C.Y.C., and Cheng, D. (1997). ACYL-COENZYME A:CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE. *Annual Review of Biochemistry* 66, 613–638.

Charan, R.A., Johnson, B.N., Zaganelli, S., Nardozi, J.D., and LaVoie, M.J. (2014). Inhibition of apoptotic Bax translocation to the mitochondria is a central function of parkin. *Cell Death & Disease* 5, e1313–e1313.

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., and Zhao, L. (2017a). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9, 7204–7218.

Chen, Q., Sun, L., and Chen, Z.J. (2016). Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nature Immunology* 17, 1142–1149.

Chen, Z., Liu, L., Cheng, Q., Li, Y., Wu, H., Zhang, W., Wang, Y., Sehgal, S.A., Siraj, S., Wang, X., et al. (2017b). Mitochondrial E3 ligase MARCH5 regulates FUNDC1 to fine-tune hypoxic mitophagy. *Embo Rep* 18, 495–509.

Cheung, W.K.C., and Nguyen, D.X. (2015). Lineage factors and differentiation states in lung cancer progression. *Oncogene* 34, 5771–5780.

Chimento, A., Casaburi, I., Avena, P., Trotta, F., Luca, A.D., Rago, V., Pezzi, V., and

Sirianni, R. (2019). Cholesterol and Its Metabolites in Tumor Growth: Therapeutic Potential of Statins in Cancer Treatment. *Frontiers in Endocrinology* 9, 807.

Chourasia, A.H., Tracy, K., Frankenberger, C., Boland, M.L., Sharifi, M.N., Drake, L.E., Sachleben, J.R., Asara, J.M., Locasale, J.W., Karczmar, G.S., et al. (2015). Mitophagy defects arising from BNip3 loss promote mammary tumor progression to metastasis. *EMBO Reports* 16, 1145–1163.

Chu, C.T., Ji, J., Dagda, R.K., Jiang, J.F., Tyurina, Y.Y., Kapralov, A.A., Tyurin, V.A., Yanamala, N., Shrivastava, I.H., Mohammadyani, D., et al. (2013). Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol* 15, 1197–1205.

Chuang, C.-H., Dorsch, M., Dujardin, P., Silas, S., Ueffing, K., Hölken, J.M., Yang, D., Winslow, M.M., and Grüner, B.M. (2020). Altered mitochondria functionality defines a metastatic cell state in lung cancer and creates an exploitable vulnerability. *Cancer Research* 80, 1865.2020.

Cianfanelli, V., Fuoco, C., Lorente, M., Salazar, M., Quondamatteo, F., Gherardini, P.F., Zio, D.D., Nazio, F., Antonioli, M., D'Orazio, M., et al. (2015). AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. *Nature Cell Biology* 17, 20–30.

Clark, I.E., Dodson, M.W., Jiang, C., Cao, J.H., Huh, J.R., Seol, J.H., Yoo, S.J., Hay, B.A., and Guo, M. (2006). Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441, 1162–1166.

Cogliati, S., Enriquez, J.A., and Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in Biochemical Sciences* 41, 261–273.

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.

Colell, A., Ricci, J.-E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N.J., Li, C.W., et al. (2007). GAPDH and Autophagy Preserve Survival after Apoptotic Cytochrome c Release in the Absence of Caspase Activation. *Cell* 129, 983–997.

Colombini, M. (2012). VDAC structure, selectivity, and dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818, 1457–1465.

Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A.R. (2000). Sterol-dependent Transactivation of the ABC1 Promoter by the Liver X Receptor/Retinoid X Receptor\*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 28240–28245.

Couraud, P.S. (2021). Référentiels Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique. 75.

Craven, B.M. (1976). Crystal structure of cholesterol monohydrate. *Nature* 260, 727–729.

Crişan, T.O., Plantinga, T.S., Veerdonk, F.L. van de, Farcaş, M.F., Stoffels, M., Kullberg, B.-J., Meer, J.W.M. van der, Joosten, L.A.B., and Netea, M.G. (2011). Inflammasome-Independent Modulation of Cytokine Response by Autophagy in Human Cells.

PLoS ONE 6, e18666.

Cruz, A.L.S., Barreto, E. de A., Fazolini, N.P.B., Viola, J.P.B., and Bozza, P.T. (2020). Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death Dis* 11, 105.

Curi, R., Newsholme, P., and Newsholme, E.A. (1988). Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. *Biochem J* 250, 383–388.

Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 49–63.

## D

Daskalaki, I., Gkikas, I., and Tavernarakis, N. (2018). Hypoxia and Selective Autophagy in Cancer Development and Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6, 104.

Davidson, S.M., Papagiannakopoulos, T., Olenchock, B.A., Heyman, J.E., Keibler, M.A., Luengo, A., Bauer, M.R., Jha, A.K., O'Brien, J.P., Pierce, K.A., et al. (2016). Environment Impacts the Metabolic Dependencies of Ras-Driven Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Metabolism* 23, 517–528.

DeBerardinis, R.J., and Chandel, N.S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances* 2, e1600200.

Decout, A., Katz, J.D., Venkatraman, S., and Ablasser, A. (2021). The cGAS–STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology* 1–22.

Deng, T., Lyon, C.J., Bergin, S., Caligiuri, M.A., and Hsueh, W.A. (2016). Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 11, 421–449.

Desai, T.J., Brownfield, D.G., and Krasnow, M.A. (2014). Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature* 507, 190–194.

Dessi, S., Batetta, B., Pulisci, D., Spano, O., Cherchi, R., Lanfranco, G., Tessitore, L., Costelli, P., Baccino, F.M., Anchis, C., et al. (1992). Altered Pattern of Lipid Metabolism in Patients with Lung Cancer. *Oncology* 49, 436–441.

Deter, R.L., Baudhuin, P., and Duve, C. de (1967). PARTICIPATION OF LYSOSOMES IN CELLULAR AUTOPHAGY INDUCED IN RAT LIVER BY GLUCAGON. *The Journal of Cell Biology* 35, C11–C16.

Detterbeck, F.C., Boffa, D.J., Kim, A.W., and Tanoue, L.T. (2017). The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest* 151, 193–203.

Di Rita, A., Peschiaroli, A., D'Acunzo, P., Strobbe, D., Hu, Z., Gruber, J., Nygaard, M., Lambrugh, M., Melino, G., Papaleo, E., et al. (2018). HUWE1 E3 ligase promotes PINK1/PARKIN-independent mitophagy by regulating AMBRA1 activation via IKK $\alpha$ . *Nature Communications* 9, 3755.

Dias, I.H., Borah, K., Amin, B., Griffiths, H.R., Sassi, K., Lizard, G., Iriondo, A., and Martinez-Lage, P. (2019). Localisation of oxysterols at the sub-cellular level and in biological fluids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 193, 105426.

Dias Amoedo, N., Sarlak, S., Obre, E., Esteves, P., Bégueret, H., Kieffer, Y., Rousseau,

B., Dupis, A., Izotte, J., Bellance, N., et al. (2021). Targeting the mitochondrial trifunctional protein restrains tumor growth in oxidative lung carcinomas. *Journal of Clinical Investigation* 131, e133081.

Dikic, I., and Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 349–364.

Ding, L., Getz, G., Wheeler, D.A., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D.M., Morgan, M.B., et al. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069–1075.

Dooley, H.C., Razi, M., Polson, H.E.J., Girardin, S.E., Wilson, M.I., and Tooze, S.A. (2014). WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12–5–16L1. *Mol Cell* 55, 238–252.

Duan, Z., and Luo, Y. (2021). Targeting macrophages in cancer immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6, 127.

Duwell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., et al. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464, 1357–1361.

Duong, M.N., Geneste, A., Fallone, F., Li, X., Dumontet, C., and Muller, C. (2015). The fat and the bad: Mature adipocytes, key actors in tumor progression and resistance. *Oncotarget* 5, 57622–57641.

Duong, P.T., Collins, H.L., Nickel, M., Lund-Katz, S., Rothblat, G.H., and Phillips, M.C. (2006). Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I. *Journal of Lipid Research* 47, 832–843.

## E

Emberson, J.R., Kearney, P.M., Blackwell, L., Newman, C., Reith, C., Bhalra, N., Holland, L., Peto, R., Keech, A., Collins, R., et al. (2012). Lack of Effect of Lowering LDL Cholesterol on Cancer: Meta-Analysis of Individual Data from 175,000 People in 27 Randomised Trials of Statin Therapy. *Plos One* 7, e29849.

Ernster, L., and Schatz, G. (1981). Mitochondria: a historical review. *J Cell Biology* 91, 227s–255s.

## F

Fahy, J.V., and Dickey, B.F. (2010). Airway Mucus Function and Dysfunction. *The New England Journal of Medicine* 363, 2233–2247.

Faubert, B., Li, K.Y., Cai, L., Hensley, C.T., Kim, J., Zacharias, L.G., Yang, C., Do, Q.N., Doucette, S., Burguete, D., et al. (2017). Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell* 171, 358–371.e9.

Faust, P.L., and Kovacs, W.J. (2014). Cholesterol biosynthesis and ER stress in peroxisome deficiency. *Biochimie* 98, 75–85.

Fedorowicz, M.A., Vries-Schneider, R.L.A. de, Rüb, C., Becker, D., Huang, Y., Zhou, C., Wolken, D.M.A., Voos, W., Liu, Y., and Przedborski, S. (2014). Cytosolic cleaved PINK1 represses Parkin translocation to mitochondria and mitophagy. *EMBO Reports* 15, 86–93.

Fessler, M.B., and Parks, J.S. (2011). Intracellular Lipid Flux and Membrane Microdomains as Organizing Principles in Inflammatory Cell Signaling. *J Immunol* 187, 1529–1535.

Fitzgerald, M.L., Morris, A.L., Chroni, A., Mendez, A.J., Zannis, V.I., and Freeman, M.W. (2004). ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J Lipid Res* 45, 287–294.

Fotakis, P., Kothari, V., Thomas, D.G., Westerterp, M., Molusky, M.M., Altin, E., Abramowicz, S., Wang, N., He, Y., Heinecke, J.W., et al. (2019). Anti-Inflammatory Effects of HDL (High-Density Lipoprotein) in Macrophages Predominate Over Proinflammatory Effects in Atherosclerotic Plaques. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 39, e253–e272.

Fraldi, A., Annunziata, F., Lombardi, A., Kaiser, H., Medina, D.L., Spanpanato, C., Fedele, A.O., Polishchuk, R., Sorrentino, N.C., Simons, K., et al. (2010). Lysosomal fusion and SNARE function are impaired by cholesterol accumulation in lysosomal storage disorders. *Embo J* 29, 3607–3620.

Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., and Nuñez, G. (2009). The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 10, 241–247.

Fujiwara, M., Marusawa, H., Wang, H.-Q., Iwai, A., Ikeuchi, K., Imai, Y., Kataoka, A., Nukina, N., Takahashi, R., and Chiba, T. (2008). Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 27, 6002–6011.

Furberg, A.-S., Veierød, M.B., Wilsgaard, T., Bernstein, L., and Thune, I. (2004). Serum High-Density Lipoprotein Cholesterol, Metabolic Profile, and Breast Cancer Risk. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 96, 1152–1160.

## G

Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., and Kroemer, G. (2014). Metabolic Control of Autophagy. *Cell* 159, 1263–1276.

Galluzzi, L., Pietrocola, F., Pedro, J.M.B., Amaravadi, R.K., Baehrecke, E.H., Cecconi, F., Codogno, P., Debnath, J., Gewirtz, D.A., Karantza, V., et al. (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO Journal* 34, 856–880.

Galluzzi, L., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., Pedro, J.M.B., Cecconi, F., Choi, A.M., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M.I., et al. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal* 36, 1811–1836.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* 25, 486–541.

Gao, F., Vasquez, S.X., Su, F., Roberts, S., Shah, N., Grijalva, V., Imaizumi, S., Chattopadhyay, A., Ganapathy, E., Meriwether, D., et al. (2011a). L-5F, an apolipoprotein A-I mimetic, inhibits tumor angiogenesis by suppressing VEGF/basic FGF signaling pathways. *Integrative Biology* 3, 479–489.

- Gao, X., Lowry, P.R., Zhou, X., Depry, C., Wei, Z., Wong, G.W., and Zhang, J. (2011b). PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*, 14509–14514.
- Gautier, E.L., and Yvan-Charvet, L. (2014). Understanding macrophage diversity at the ontogenic and transcriptomic levels. *Immunological Reviews* *262*, 85–95.
- Gautier, E.L., Chow, A., Spanbroek, R., Marcelin, G., Greter, M., Jakubzick, C., Bogunovic, M., Leboeuf, M., Rooijen, N. van, Habenicht, A.J., et al. (2012). Systemic Analysis of PPAR $\gamma$  in Mouse Macrophage Populations Reveals Marked Diversity in Expression with Critical Roles in Resolution of Inflammation and Airway Immunity. *J Immunol* *189*, 2614–2624.
- Gegg, M.E., Cooper, J.M., Chau, K.-Y., Rojo, M., Schapira, A.H.V., and Taanman, J.-W. (2010). Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* *19*, 4861–4870.
- Geisler, S., Holmström, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., and Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* *12*, 119–131.
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., and Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *21*, 204–224.
- Gimpl, G. (2016). Interaction of G protein coupled receptors and cholesterol. *Chemistry and Physics of Lipids* *199*, 61–73.
- Goerke (1998). Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* *343*, 425–430.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2009). The LDL Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *29*, 431–438.
- Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W.E.E., Nicholson, A.G., Groome, P., Mitchell, A., Bolejack, V., et al. (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* *11*, 39–51.
- Gomes, L.C., Benedetto, G.D., and Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature Cell Biology* *13*, 589–598.
- Gonen, A., and Miller, Y.I. (2020). From Inert Storage to Biological Activity—In Search of Identity for Oxidized Cholesteryl Esters. *Frontiers in Endocrinology* *11*, 602252.
- Gong, X., Li, J., Shao, W., Wu, J., Qian, H., Ren, R., Espenshade, P., and Yan, N. (2015). Structure of the WD40 domain of SCAP from fission yeast reveals the molecular basis for SREBP recognition. *Cell Research* *25*, 401–411.
- Goossens, P., Rodriguez-Vita, J., Etzerodt, A., Masse, M., Rastoin, O., Gouirand, V., Ulas, T., Papantonopoulou, O., Eck, M.V., Auphan-Anezin, N., et al. (2019). Membrane Cholesterol Efflux Drives Tumor-Associated Macrophage Reprogramming and Tumor Progression. *Cell Metabolism* *29*, 1376-1389.e4.

Gray, M.W., Lang, B.F., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Brossard, N., Delage, E., Littlejohn, T.G., et al. (1998). Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res* 26, 865–878.

Greene, A.W., Grenier, K., Aguilera, M.A., Muise, S., Farazifard, R., Haque, M.E., McBride, H.M., Park, D.S., and Fon, E.A. (2012). Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Reports* 13, 378–385.

Gudi, R., Melissa, M.B.-K., Kedishvili, N.Y., Zhao, Y., and Popov, K.M. (1995). Diversity of the Pyruvate Dehydrogenase Kinase Gene Family in Humans \*. *Journal of Biological Chemistry* 270, 28989–28994.

Guerroué, F.L., Eck, F., Jung, J., Starzetz, T., Mittelbronn, M., Kaulich, M., and Behrends, C. (2017). Autophagosomal Content Profiling Reveals an LC3C-Dependent Piecemeal Mitophagy Pathway. *Molecular Cell* 68, 786-796.e6.

Guilbaud, E., Gautier, E.L., and Yvan-Charvet, L. (2019). Macrophage Origin, Metabolic Reprogramming and IL-1 Signaling: Promises and Pitfalls in Lung Cancer. *Cancers* 11, 298.

Guillaumond, F., Bidaut, G., Ouaisi, M., Servais, S., Gouirand, V., Olivares, O., Lac, S., Borge, L., Roques, J., Gayet, O., et al. (2015). Cholesterol uptake disruption, in association with chemotherapy, is a promising combined metabolic therapy for pancreatic adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 2473–2478.

Guo, J.Y., Karsli-Uzunbas, G., Mathew, R., Aisner, S.C., Kamphorst, J.J., Strohecker, A.M., Chen, G., Price, S., Lu, W., Teng, X., et al. (2013). Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes & Development* 27, 1447–1461.

Guo, J.Y., Teng, X., Laddha, S.V., Ma, S., Nostrand, S.C.V., Yang, Y., Khor, S., Chan, C.S., Rabinowitz, J.D., and White, E. (2016). Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. *Genes & Development* 30, 1704–1717.

Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol Cell* 30, 214–226.

## H

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

Hansen, M., Rubinsztein, D.C., and Walker, D.W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 579–593.

Hart, T., Chandrashekhar, M., Aregger, M., Steinhart, Z., Brown, K.R., MacLeod, G., Mis, M., Zimmermann, M., Fradet-Turcotte, A., Sun, S., et al. (2015). High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. *Cell* 163, 1515–1526.

Hartl, D., Tirouvanziam, R., Laval, J., Greene, C.M., Habiél, D., Sharma, L., Yildirim,

A.Ö., Cruz, C.S.D., and Hogaboam, C.M. (2018). Innate Immunity of the Lung: From Basic Mechanisms to Translational Medicine. *Journal of Innate Immunity* 10, 487–501.

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* 38, 792–804.

Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer* 16, 635–649.

Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* 11, 1433–1437.

Hecht, S.S. (1999). Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 91, 1194–1210.

Hecht, S.S. (2003). Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 733–744.

Heiden, M.G.V., and DeBerardinis, R.J. (2017). Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* 168, 657–669.

Heinecke, J.W. (2009). The HDL proteome: a marker—and perhaps mediator—of coronary artery disease. *Journal of Lipid Research* 50, S167–S171.

Hensley, C.T., Faubert, B., Yuan, Q., Lev-Cohain, N., Jin, E., Kim, J., Jiang, L., Ko, B., Skelton, R., Loudat, L., et al. (2016). Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. *Cell* 164, 681–694.

Herbreteau, G., Vallée, A., Charpentier, S., Normanno, N., Hofman, P., and Denis, M.G. (2018). Circulating free tumor DNA in non-small cell lung cancer (NSCLC): clinical application and future perspectives. *Journal of Thoracic Disease* 11, S113–S126.

Herbst, R.S., Morgensztern, D., and Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 553, 446–454.

Herbst, R.S., Giaccone, G., Marinis, F. de, Reinmuth, N., Vergnenegre, A., Barrios, C.H., Morise, M., Felip, E., Andric, Z., Geater, S., et al. (2020). Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1–Selected Patients with NSCLC. *New England Journal of Medicine* 383, 1328–1339.

Herzig, S., and Shaw, R.J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19, 121–135.

Herzig, S., Raemy, E., Montessuit, S., Veuthey, J.-L., Zamboni, N., Westermann, B., Kunji, E.R.S., and Martinou, J.-C. (2012). Identification and Functional Expression of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Science* 337, 93–96.

Hoffmann, P., Roumeguère, T., Schulman, C., and Velthoven, R. van (2006). Use of Statins and Outcome of BCG Treatment for Bladder Cancer. *The New England Journal of Medicine* 355, 2705–2707.

Hofman, P. (2021). Liquid biopsy for lung cancer screening: Usefulness of circulating tumor cells and other circulating blood biomarkers. *Cancer Cytopathol* 129, 341–346.

Hofman, P., Rouleau, E., Sabourin, J., Denis, M., Deleuze, J., Barlesi, F., and Laurent-Puig, P. (2020). Predictive molecular pathology in non–small cell lung cancer in France: The past, the present and the perspectives. *Cancer Cytopathol* 128, 601–610.

Horvath, S.E., and Daum, G. (2013). Lipids of mitochondria. *Progress in Lipid Research* 52, 590–614.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol Biol Cell* 20, 1981–1991.

Howe, V., Sharpe, L.J., Prabhu, A.V., and Brown, A.J. (2017). New insights into cellular cholesterol acquisition: promoter analysis of human HMGCR and SQLE, two key control enzymes in cholesterol synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862, 647–657.

Howington, J.A., Blum, M.G., Chang, A.C., Balekian, A.A., and Murthy, S.C. (2013). Treatment of Stage I and II Non-small Cell Lung Cancer Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 143, e278S–e313S.

Howlader, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Miller, D., Brest, A., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E.J., Cronin, K.A. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975–2018, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2018/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/), based on November 2020 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2021.

Hoxhaj, G., and Manning, B.D. (2020). The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 20, 74–88.

Hsia, C.C.W., Hyde, D.M., and Weibel, E.R. (2017). *Comprehensive Physiology*. *Comprehensive Physiology* 6, 827–895.

Huang, B., Song, B., and Xu, C. (2020). Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nature Metabolism* 2, 132–141.

Huang, C.-Y., Ju, D.-T., Chang, C.-F., Reddy, P.M., and Velmurugan, B.K. (2017). A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non–small cell lung cancer. *BioMedicine* 7, 23.

Huang, S.C.-C., Everts, B., Ivanova, Y., O’Sullivan, D., Nascimento, M., Smith, A.M., Beatty, W., Love-Gregory, L., Lam, W.Y., O’Neill, C.M., et al. (2014). Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nature Immunology* 15, 846–855.

Hussain, M.M., Iqbal, J., Anwar, K., Rava, P., and Dai, K. (2003). Microsomal triglyceride transfer protein a multifunctional protein. *Frontiers in Bioscience* 8, s500–506.

Hussell, T., and Bell, T.J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature Reviews Immunology* 14, 81–93.

Igarashi, R., Yamashita, S., Yamashita, T., Inoue, K., Fukuda, T., Fukuchi, T., and Kanki, T. (2020). Gemcitabine induces Parkin-independent mitophagy through mitochondrial-resident E3 ligase MUL1-mediated stabilization of PINK1. *Scientific Reports* 10, 1465.

Ilie, M., Hofman, V., Long-Mira, E., Selva, E., Vignaud, J.-M., Padovani, B., Mouroux, J., Marquette, C.-H., and Hofman, P. (2014). “Sentinel” Circulating Tumor Cells Allow Early Diagnosis of Lung Cancer in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Plos One* 9, e111597.

Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., and Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *The Journal of Cell Biology* 170, 1021–1027.

Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* 115, 577–590.

Iqbal, J., and Hussain, M.M. (2009). Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 296, E1183–E1194.

## J

Jafri, H., Alsheikh-Ali, A.A., and Karas, R.H. (2010). Baseline and On-Treatment High-Density Lipoprotein Cholesterol and the Risk of Cancer in Randomized Controlled Trials of Lipid-Altering Therapy. *Journal of the American College of Cardiology* 55, 2846–2854.

Janes, M.R., Zhang, J., Li, L.-S., Hansen, R., Peters, U., Guo, X., Chen, Y., Babbar, A., Firdaus, S.J., Darjania, L., et al. (2018). Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell* 172, 578-589.e17.

Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR $\alpha$ . *Nature* 383, 728–731.

Jauhiainen, M., Metso, J., Pahlman, R., Blomqvist, S., Tol, A. van, and Ehnholm, C. (1993). Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J Biological Chem* 268, 4032–4036.

Javadov, S., Kozlov, A.V., and Camara, A.K.S. (2020). Mitochondria in Health and Diseases. *Cells* 9, 1177.

Jin, L., and Zhou, Y. (2019). Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncology Letters* 17, 4213–4221.

Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., and Youle, R.J. (2010). Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *The Journal of Cell Biology* 191, 933–942.

Juncadella, I.J., Kadl, A., Sharma, A.K., Shim, Y.M., Hochreiter-Hufford, A., Borish, L., and Ravichandran, K.S. (2013). Apoptotic cell clearance by bronchial epithelial cells critically influences airway inflammation. *Nature* 493, 547–551.

Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Molecular Biology of the Cell* 20, 1992–2003.

## K

- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science* *117*, 2805–2812.
- Kaminski, W.E., Piehler, A., and Wenzel, J.J. (2006). ABC A-subfamily transporters: Structure, function and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* *1762*, 510–524.
- Kane, L.A., Lazarou, M., Fogel, A.I., Li, Y., Yamano, K., Sarraf, S.A., Banerjee, S., and Youle, R.J. (2014). PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *Journal of Cell Biology* *205*, 143–153.
- Karsli-Uzunbas, G., Guo, J.Y., Price, S., Teng, X., Laddha, S.V., Khor, S., Kalaany, N.Y., Jacks, T., Chan, C.S., Rabinowitz, J.D., et al. (2014). Autophagy Is Required for Glucose Homeostasis and Lung Tumor Maintenance. *Cancer Discovery* *4*, 914–927.
- Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *19*, 365–381.
- Kazlauskaite, A., Kondapalli, C., Gourlay, R., Campbell, D.G., Ritoro, M.S., Hofmann, K., Alessi, D.R., Knebel, A., Trost, M., and Muqit, M.M.K. (2014). Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochemical Journal* *460*, 127–141.
- Khandekar, M.J., Cohen, P., and Spiegelman, B.M. (2011). Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nature Reviews Cancer* *11*, 886–895.
- Khovidhunkit, W., Kim, M.-S., Memon, R.A., Shigenaga, J.K., Moser, A.H., Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2004). Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism mechanisms and consequences to the host 1. *Journal of Lipid Research* *45*, 1169–1196.
- Kim, A.-S., Ko, H.-J., Kwon, J.-H., and Lee, J.-M. (2018). Exposure to Secondhand Smoke and Risk of Cancer in Never Smokers: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. *International Journal of Environmental Research and Public Health* *15*, 1981.
- Kim, B.-W., Kwon, D.H., and Song, H.K. (2016). Structure biology of selective autophagy receptors. *BMB Reports* *49*, 73–80.
- Kim, C.F.B., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R.T., and Jacks, T. (2005). Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer. *Cell* *121*, 823–835.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology* *13*, 132–141.
- Kimmelman, A.C., and White, E. (2017). Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metabolism* *25*, 1037–1043.
- Kloudova, A., Guengerich, F.P., and Soucek, P. (2017). The Role of Oxysterols in Human Cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism* *28*, 485–496.
- Kobayashi, S., Boggon, T.J., Dayaram, T., Jänne, P.A., Kocher, O., Meyerson, M., Johnson, B.E., Eck, M.J., Tenen, D.G., and Halmos, B. (2005). EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *The New England Journal of Medicine* *352*, 786–

792.

Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2010). Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *Faseb J* 24, 3052–3065.

*Kölliker, A. (1856) Z Wiss Zool* 8:311-325

Kondapalli, C., Kazlauskaitė, A., Zhang, N., Woodroof, H.I., Campbell, D.G., Gourlay, R., Burchell, L., Walden, H., Macartney, T.J., Deak, M., et al. (2012). PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biology* 2, 120080.

Kosmas, C.E., Sourlas, A., Guzman, E., and Kostara, C.E. (2021). Environmental Factors Modifying HDL Functionality. *Current Medicinal Chemistry* 28.

Kounakis, K., Chaniotakis, M., Markaki, M., and Tavernarakis, N. (2019). Emerging Roles of Lipophagy in Health and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7, 185.

Krall, A.S., Mullen, P.J., Surjono, F., Momcilovic, M., Schmid, E.W., Halbrook, C.J., Thambundit, A., Mittelman, S.D., Lyssiotis, C.A., Shackelford, D.B., et al. (2021). Asparagine couples mitochondrial respiration to ATF4 activity and tumor growth. *Cell Metabolism* 33, 1013-1026.e6.

Kucharska-Newton, A.M., Rosamond, W.D., Mink, P.J., Alberg, A.J., Shahar, E., and Folsom, A.R. (2008). HDL-Cholesterol and Incidence of Breast Cancer in the ARIC Cohort Study. *Annals of Epidemiology* 18, 671–677.

Kulhánová, I., Forman, D., Vignat, J., Espina, C., Brenner, H., Storm, H.H., Bauld, L., and Soerjomataram, I. (2020). Tobacco-related cancers in Europe: The scale of the epidemic in 2018. *European Journal of Cancer* 139, 27–36.

Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2002). Formation of the ~350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 Multimeric Complex, Mediated by Apg16 Oligomerization, Is Essential for Autophagy in Yeast\*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 18619–18625.

Kuzu, O.F., Noory, M.A., and Robertson, G.P. (2016). The Role of Cholesterol in Cancer. *Cancer Research* 76, 2063–2070.

## L

van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C.L., Van Isterdael, G., Hoffmann, E., Beyaert, R., Saeys, Y., Lambrecht, B.N., et al. (2016). Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 44, 755–768.

Lai, S.-C., Phelps, C.A., Short, A.M., Dutta, S.M., and Mu, D. (2018). Thyroid transcription factor 1 enhances cellular statin sensitivity via perturbing cholesterol metabolism. *Oncogene* 37, 3290–3300.

Lakin, N.D., and Jackson, S.P. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18, 7644–7655.

Landry, Y.D., Denis, M., Nandi, S., Bell, S., Vaughan, A.M., and Zha, X. (2006). ATP-binding Cassette Transporter A1 Expression Disrupts Raft Membrane Microdomains through Its ATPase-related Functions\*. *J Biol Chem* 281, 36091–36101.

- Lane, A.N., and Fan, T.W.-M. (2015). Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Research* 43, 2466–2485.
- Lange, Y., Ye, J., Rigney, M., and Steck, T.L. (1999). Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J Lipid Res* 40, 2264–2270.
- Laplanche, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149, 274–293.
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell* 159, 1312–1326.
- Lazarou, M., Sliter, D.A., Kane, L.A., Sarraf, S.A., Wang, C., Burman, J.L., Sideris, D.P., Fogel, A.I., and Youle, R.J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524, 309–314.
- Lee, J.J., Sanchez-Martinez, A., Zarate, A.M., Benincá, C., Mayor, U., Clague, M.J., and Whitworth, A.J. (2018). Basal mitophagy is widespread in *Drosophila* but minimally affected by loss of Pink1 or parkin. *The Journal of Cell Biology* 217, 1613–1622.
- Lee, Y., Stevens, D.A., Kang, S.-U., Jiang, H., Lee, Y.-I., Ko, H.S., Scarffe, L.A., Umanah, G.E., Kang, H., Ham, S., et al. (2017). PINK1 Primes Parkin-Mediated Ubiquitination of PARIS in Dopaminergic Neuronal Survival. *Cell Reports* 18, 918–932.
- Lehuédé, C., Li, X., Dauvillier, S., Vaysse, C., Franchet, C., Clement, E., Esteve, D., Longué, M., Chaltiel, L., Gonidec, S.L., et al. (2019). Adipocytes promote breast cancer resistance to chemotherapy, a process amplified by obesity: role of the major vault protein (MVP). *Breast Cancer Research* 21, 7.
- Lhuillier, C., Rudqvist, N.-P., Elemento, O., Formenti, S.C., and Demaria, S. (2019). Radiation therapy and anti-tumor immunity: exposing immunogenic mutations to the immune system. *Genome Medicine* 11, 40.
- Li, C., Yang, L., Zhang, D., and Jiang, W. (2016a). Systematic review and meta-analysis suggest that dietary cholesterol intake increases risk of breast cancer. *Nutrition Research* 36, 627–635.
- Li, C., Zhang, Y., Cheng, X., Yuan, H., Zhu, S., Liu, J., Wen, Q., Xie, Y., Liu, J., Kroemer, G., et al. (2018). PINK1 and PARK2 Suppress Pancreatic Tumorigenesis through Control of Mitochondrial Iron-Mediated Immunometabolism. *Developmental Cell* 46, 441–455.e8.
- Li, F., He, J., Wei, J., Cho, W.C., and Liu, X. (2015). Diversity of Epithelial Stem Cell Types in Adult Lung. *Stem Cells International* 2015, 1–11.
- Li, T., Cheng, H., Yuan, H., Xu, Q., Shu, C., Zhang, Y., Xu, P., Tan, J., Rui, Y., Li, P., et al. (2016b). Antitumor Activity of cGAMP via Stimulation of cGAS-cGAMP-STING-IRF3 Mediated Innate Immune Response. *Scientific Reports* 6, 19049.
- Li, Y., Wang, L.-X., Yang, G., Hao, F., Urba, W.J., and Hu, H.-M. (2008). Efficient Cross-presentation Depends on Autophagy in Tumor Cells. *Cancer Research* 68, 6889–6895.
- Li, Y.C., Park, M.J., Ye, S.-K., Kim, C.-W., and Kim, Y.-N. (2006). Elevated Levels of Cholesterol-Rich Lipid Rafts in Cancer Cells Are Correlated with Apoptosis Sensitivity Induced

by Cholesterol-Depleting Agents. *The American Journal of Pathology* 168, 1107–1118.

Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672–676.

Liao, P.-C., Wolken, D.M.A., Serrano, E., Srivastava, P., and Pon, L.A. (2020). Mitochondria-Associated Degradation Pathway (MAD) Function beyond the Outer Membrane. *Cell Reports* 32, 107902.

Lin, C.-Y., and Gustafsson, J.-Å. (2015). Targeting liver X receptors in cancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 15, 216–224.

Lin, E.P.-Y., Huang, B.-T., Lai, W.-Y., Tseng, Y.-T., Yang, S.-C., Kuo, H.-C., and Yang, P.-C. (2021). PINK1-Mediated Inhibition of EGFR Dimerization and Activation Impedes EGFR-Driven Lung Tumorigenesis. *Cancer Research* 81, 1745–1757.

Lin, X., Lu, L., Liu, L., Wei, S., He, Y., Chang, J., and Lian, X. (2017). Blood lipids profile and lung cancer risk in a meta-analysis of prospective cohort studies. *Journal of Clinical Lipidology* 11, 1073–1081.

Liscum, L., and Munn, N.J. (1999). Intracellular cholesterol transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1438, 19–37.

Litvinov, D.Y., Savushkin, E.V., and Dergunov, A.D. (2018). Intracellular and Plasma Membrane Events in Cholesterol Transport and Homeostasis. *Journal of Lipids* 2018, 1–22.

Liu, K., Tang, M., Liu, Q., Han, X., Jin, H., Zhu, H., Li, Y., He, L., Ji, H., and Zhou, B. (2020). Bi-directional differentiation of single bronchioalveolar stem cells during lung repair. *Cell Discovery* 6, 1.

Liu, L., Zuo, Z., Lu, S., Wang, L., Liu, A., and Liu, X. (2018). Silencing of PINK1 represses cell growth, migration and induces apoptosis of lung cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106, 333–341.

Llera-Moya, M. de la, Drazul-Schrader, D., Asztalos, B.F., Cuchel, M., Rader, D.J., and Rothblat, G.H. (2010). The Ability to Promote Efflux Via ABCA1 Determines the Capacity of Serum Specimens With Similar High-Density Lipoprotein Cholesterol to Remove Cholesterol From Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 796–801.

Loomis, D., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., Ghissassi, F.E., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., Straif, K., et al. (2013). The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol* 14, 1262–1263.

Luo, J., Yang, H., and Song, B.-L. (2020). Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21, 225–245.

## M

Madeo, F., Zimmermann, A., Maiuri, M.C., and Kroemer, G. (2015). Essential role for autophagy in life span extension. *Journal of Clinical Investigation* 125, 85–93.

Mainardi, S., Mijimolle, N., Francoz, S., Vicente-Dueñas, C., Sánchez-García, I., and Barbacid, M. (2014). Identification of cancer initiating cells in K-Ras driven lung adenocarcinoma. *Proc National Acad Sci* 111, 255–260.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.

Marjanovic, N.D., Hofree, M., Chan, J.E., Canner, D., Wu, K., Trakala, M., Hartmann, G.G., Smith, O.C., Kim, J.Y., Evans, K.V., et al. (2020). Emergence of a High-Plasticity Cell State during Lung Cancer Evolution. *Cancer Cell* 38, 229-246.e13.

Marquette, C.-H., Boutros, J., Benzaquen, J., Ferreira, M., Pastre, J., Pison, C., Padovani, B., Bettayeb, F., Fallet, V., Guibert, N., et al. (2020). Circulating tumour cells as a potential biomarker for lung cancer screening: a prospective cohort study. *Lancet Respir Medicine* 8, 709–716.

Martinelli, A.E.M., Maranhão, R.C., Carvalho, P.O., Freitas, F.R., Silva, B.M.O., Curiati, M.N.C., Filho, R.K., and Pereira-Barretto, A.C. (2018). Cholesteryl ester transfer protein (CETP), HDL capacity of receiving cholesterol and status of inflammatory cytokines in patients with severe heart failure. *Lipids Health Dis* 17, 242.

Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* 6, 13.

Martínez-Reyes, I., and Chandel, N.S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications* 11, 102.

Martins, I.J., Hone, E., Chi, C., Seydel, U., Martins, R.N., and Redgrave, T.G. (2000). Relative roles of LDLr and LRP in the metabolism of chylomicron remnants in genetically manipulated mice. *J Lipid Res* 41, 205–213.

Maslyanko, M., Harris, R.D., and Mu, D. (2021). Connecting Cholesterol Efflux Factors to Lung Cancer Biology and Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 7209.

Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinias, C., et al. (2009). Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62. *Cell* 137, 1062–1075.

Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., et al. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *The Journal of Cell Biology* 189, 211–221.

McLelland, G.-L., Lee, S.A., McBride, H.M., and Fon, E.A. (2016). Syntaxin-17 delivers PINK1/parkin-dependent mitochondrial vesicles to the endolysosomal system. *J Cell Biol* 214, 275–291.

McLoughlin, R.M., Witowski, J., Robson, R.L., Wilkinson, T.S., Hurst, S.M., Williams, A.S., Williams, J.D., Rose-John, S., Jones, S.A., and Topley, N. (2003). Interplay between IFN- $\gamma$  and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *Journal of Clinical Investigation* 112, 598–607.

McQuattie-Pimentel, A.C., Ren, Z., Joshi, N., Watanabe, S., Stoeger, T., Chi, M., Lu, Z., Sichizya, L., Piseaux, R., Chen, C.-I., et al. (2019). The Aging Microenvironment Shapes Alveolar Macrophage Identity in Aging. *BioRxiv* 717033.

McWilliams, T.G., Prescott, A.R., Allen, G.F.G., Tamjar, J., Munson, M.J., Thomson, C., Muqit, M.M.K., and Ganley, I.G. (2016). mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial

architecture in vivomito-QC illuminates mitophagy in vivo. *The Journal of Cell Biology* 214, 333–345.

McWilliams, T.G., Prescott, A.R., Montava-Garriga, L., Ball, G., Singh, F., Barini, E., Muqit, M.M.K., Brooks, S.P., and Ganley, I.G. (2018). Basal Mitophagy Occurs Independently of PINK1 in Mouse Tissues of High Metabolic Demand. *Cell Metabolism* 27, 439-449.e5.

Meissner, C., Lorenz, H., Weihofen, A., Selkoe, D.J., and Lemberg, M.K. (2011). The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *Journal of Neurochemistry* 117, 856–867.

Melser, S., Chatelain, E.H., Lavie, J., Mahfouf, W., Jose, C., Obre, E., Goorden, S., Priault, M., Elgersma, Y., Rezvani, H.R., et al. (2013). Rheb Regulates Mitophagy Induced by Mitochondrial Energetic Status. *Cell Metabolism* 17, 719–730.

Metchnikoff, E. Untersuchungen ueber die mesodermalen Phagocyten einiger Wirbeltiere. *Biologisches Centralblatt* (1883) 3:560–5

Miller, W.L. (1988). Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis\*. *Endocrine Reviews* 9, 295–318.

Misharin, A.V., Budinger, G.R.S., and Perlman, H. (2011). The Lung Macrophage: A Jack of All Trades. *Am J Resp Crit Care* 184, 497–498.

Moehlman, A.T., and Youle, R.J. (2020). Mitochondrial Quality Control and Restraining Innate Immunity. *Annu Rev Cell Dev Bi* 36, 265–289.

Mok, T.S., Wu, Y.-L., Ahn, M.-J., Garassino, M.C., Kim, H.R., Ramalingam, S.S., Shepherd, F.A., He, Y., Akamatsu, H., Theelen, W.S.M.E., et al. (2017). Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer. *New Engl J Medicine* 376, 629–640.

Mok, T.S.K., Wu, Y.-L., Kudaba, I., Kowalski, D.M., Cho, B.C., Turna, H.Z., Castro, G., Srimuninnimit, V., Laktionov, K.K., Bondarenko, I., et al. (2019). Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 393, 1819–1830.

Montero, J., Morales, A., Llacuna, L., Lluís, J.M., Terrones, O., Basañez, G., Antonsson, B., Prieto, J., García-Ruiz, C., Colell, A., et al. (2008). Mitochondrial Cholesterol Contributes to Chemotherapy Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 68, 5246–5256.

Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., and Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal* 274, 1393–1418.

Münz, C. (2016). Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation. *Trends in Immunology* 37, 755–763.

Murai, T. (2015). Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. *Biological Chemistry* 396, 1–11.

Murakawa, T., Yamaguchi, O., Hashimoto, A., Hikoso, S., Takeda, T., Oka, T., Yasui, H., Ueda, H., Akazawa, Y., Nakayama, H., et al. (2015). Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nature Communications* 6, 7527.

Murakawa, T., Okamoto, K., Omiya, S., Taneike, M., Yamaguchi, O., and Otsu, K. (2019). A Mammalian Mitophagy Receptor, Bcl2-L-13, Recruits the ULK1 Complex to Induce Mitophagy. *Cell Reports* 26, 338–345.e6.

Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 417, 1–13.

## N

Nakatogawa, H. (2020). Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21, 439–458.

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of Cell Biology* 183, 795–803.

Nargund, A.M., Pellegrino, M.W., Fiorese, C.J., Baker, B.M., and Haynes, C.M. (2012). Mitochondrial Import Efficiency of ATFS-1 Regulates Mitochondrial UPR Activation. *Science* 337, 587–590.

Nath, S., Dancourt, J., Shteyn, V., Puente, G., Fong, W.M., Nag, S., Bewersdorf, J., Yamamoto, A., Antonny, B., and Melia, T.J. (2014). Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nature Cell Biology* 16, 415–424.

Nelson, E.R., Wardell, S.E., Jasper, J.S., Park, S., Suchindran, S., Howe, M.K., Carver, N.J., Pillai, R.V., Sullivan, P.M., Sondhi, V., et al. (2013). 27-Hydroxycholesterol Links Hypercholesterolemia and Breast Cancer Pathophysiology. *Science* 342, 1094–1098.

Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Phillips, M.C., and Lund-Katz, S. (2009). Molecular Mechanism of Apolipoprotein E Binding to Lipoprotein Particles. *Biochemistry* 48, 3025–3032.

Nguyen, T.N., Padman, B.S., Usher, J., Oorschot, V., Ramm, G., and Lazarou, M. (2016). Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome–lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *Journal of Cell Biology* 215, 857–874.

Ngwa, W., Irabor, O.C., Schoenfeld, J.D., Hesser, J., Demaria, S., and Formenti, S.C. (2018). Using immunotherapy to boost the abscopal effect. *Nature Reviews Cancer* 18, 313–322.

Nicod, L.P. (2005). Lung defences: an overview. *European Respiratory Review* 14, 45–50.

Nicolson, G.L. (2015). Cell Membrane Fluid–Mosaic Structure and Cancer Metastasis. *Cancer Res* 75, 1169–1176.

Nielsen, S.F., Nordestgaard, B.G., and Bojesen, S.E. (2012). Statin Use and Reduced Cancer-Related Mortality. *The New England Journal of Medicine* 367, 1792–1802.

Nishimura, T., Tamura, N., Kono, N., Shimanaka, Y., Arai, H., Yamamoto, H., and Mizushima, N. (2017). Autophagosome formation is initiated at phosphatidylinositol synthase-enriched ER subdomains. *The EMBO Journal* 36, 1719–1735.

Noda, S., Sato, S., Fukuda, T., Tada, N., Uchiyama, Y., Tanaka, K., and Hattori, N. (2020). Loss of Parkin contributes to mitochondrial turnover and dopaminergic neuronal loss

in aged mice. *Neurobiol Dis* 136, 104717.

Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., and Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology* 37, 101674.

Núñez-Vázquez, S., Saura-Esteller, J., Sánchez-Vera, I., Guilbaud, E., Cosialls, A.M., Pons, G., Ricci, J.-E., Iglesias-Serret, D., Marchetti, S., and Gil, J. (2021). The prohibitin-binding compound fluorizoline inhibits mitophagy in cancer cells. *Oncogenesis* 10, 64.

## O

Okatsu, K., Mayumi, Kimura, Toshihiko, Oka, Keiji, Tanaka, and Noriyuki, Matsuda (2015). Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment. *Journal of Cell Science* 128, 964–978.

Oikkonen, V.M., Béaslas, O., and Nissilä, E. (2012). Oxysterols and Their Cellular Effectors. *Biomolecules* 2, 76–103.

Ombrato, L., Nolan, E., Kurelac, I., Mavousian, A., Bridgeman, V.L., Heinze, I., Chakravarty, P., Horswell, S., Gonzalez-Gualda, E., Matakchione, G., et al. (2019). Metastatic-niche labelling reveals parenchymal cells with stem features. *Nature* 572, 603–608.

Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., and Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO Journal* 40, e104705.

Oram, J.F. (2000). Tangier disease and ABCA1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1529, 321–330.

Oren, Y., Tsabar, M., Cuoco, M.S., Amir-Zilberstein, L., Cabanos, H.F., Hütter, J.-C., Hu, B., Thakore, P.I., Tabaka, M., Fulco, C.P., et al. (2021). Cycling cancer persister cells arise from lineages with distinct programs. *Nature* 596, 576–582.

Ostrem, J.M., Peters, U., Sos, M.L., Wells, J.A., and Shokat, K.M. (2013). K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 503, 548–551.

Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I., and Marcel, Y.L. (2011). Autophagy Regulates Cholesterol Efflux from Macrophage Foam Cells via Lysosomal Acid Lipase. *Cell Metabolism* 13, 655–667.

## P

Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 8, 98–101.

Palikaras, K., Daskalaki, I., Markaki, M., and Tavernarakis, N. (2017). Mitophagy and age-related pathologies: Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover. *Pharmacol Therapeut* 178, 157–174.

Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism* 3, 187–197.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 12, 252–264.

Parini, P., Davis, M., Lada, A.T., Erickson, S.K., Wright, T.L., Gustafsson, U., Sahlin, S., Einarsson, C., Eriksson, M., Angelin, B., et al. (2004). ACAT2 Is Localized to Hepatocytes and Is the Major Cholesterol-Esterifying Enzyme in Human Liver. *Circulation* 110, 2017–2023.

Park, J., Lee, S.B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.-M., et al. (2006). Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441, 1157–1161.

Parris, B.A., O'Farrell, H.E., Fong, K.M., and Yang, I.A. (2019). Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and lung cancer: common pathways for pathogenesis. *Journal of Thoracic Disease* 1, S2155–S2172.

Passaro, A., Jänne, P.A., Mok, T., and Peters, S. (2021). Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer. *Nature Cancer* 2, 377–391.

Pasteur, M.L. (1861). Expériences et vues nouvelles sur la nature des fermentations. 1260–1264.

Patricelli, M.P., Janes, M.R., Li, L.-S., Hansen, R., Peters, U., Kessler, L.V., Chen, Y., Kucharski, J.M., Feng, J., Ely, T., et al. (2016). Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State. *Cancer Discov* 6, 316–329.

Pedersen, P.L. (1978). Tumor Mitochondria and the Bioenergetics of Cancer Cells. *Prog Tumor Res* 22, 190–274.

Pennell, N.A., Arcila, M.E., Gandara, D.R., and West, H. (2019). Biomarker Testing for Patients With Advanced Non–Small Cell Lung Cancer: Real-World Issues and Tough Choices. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 531–542.

Perera, R.M., Stoykova, S., Nicolay, B.N., Ross, K.N., Fitamant, J., Boukhali, M., Lengrand, J., Deshpande, V., Selig, M.K., Ferrone, C.R., et al. (2015). Transcriptional control of autophagy–lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature* 524, 361–365.

Phillips, M.C. (2014). Molecular Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux\*. *Journal of Biological Chemistry* 289, 24020–24029.

Phillips, M.C. (2018). Is ABCA1 a lipid transfer protein? *Journal of Lipid Research* 59, 749–763.

Pirro, M., Ricciuti, B., Rader, D.J., Catapano, A.L., Sahebkar, A., and Banach, M. (2018). High density lipoprotein cholesterol and cancer: Marker or causative? *Progress in Lipid Research* 71, 54–69.

Pittman, K., and Kubes, P. (2013). Damage-Associated Molecular Patterns Control Neutrophil Recruitment. *Journal of Innate Immunity* 5, 315–323.

Plasschaert, L.W., Žilionis, R., Choo-Wing, R., Savova, V., Knehr, J., Roma, G., Klein, A.M., and Jaffe, A.B. (2018). A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* 560, 377–381.

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E., and Lang, A.E. (2017). Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17013.

Poillet-Perez, L., Sharp, D.W., Yang, Y., Laddha, S.V., Ibrahim, M., Bommarreddy, P.K., Hu, Z.S., Vieth, J., Haas, M., Bosenberg, M.W., et al. (2020). Autophagy promotes growth of tumors with high mutational burden by inhibiting a T-cell immune response. *Nature Cancer* 1, 923–934.

Polajnar, M., Dietz, M.S., Heilemann, M., and Behrends, C. (2017). Expanding the host cell ubiquitylation machinery targeting cytosolic Salmonella. *EMBO Reports* 18, 1572–1585.

Pommier, A.J.C., Alves, G., Viennois, E., Bernard, S., Communal, Y., Sion, B., Marceau, G., Damon, C., Mouzat, K., Caira, F., et al. (2010). Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29, 2712–2723.

Pourmousa, M., Song, H.D., He, Y., Heinecke, J.W., Segrest, J.P., and Pastor, R.W. (2018). Tertiary structure of apolipoprotein A-I in nascent high-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 201721181.

Pradelli, L.A., Bénétteau, M., and Ricci, J.-E. (2010). Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 1589–1597.

## Q

Qian, H., Zhao, X., Cao, P., Lei, J., Yan, N., and Gong, X. (2017). Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1. *Cell* 169, 1228-1239.e10.

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.-L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., et al. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *Journal of Clinical Investigation* 112, 1809–1820.

Quinn, W.J., Jiao, J., TeSlaa, T., Stadanlick, J., Wang, Z., Wang, L., Akimova, T., Angelin, A., Schäfer, P.M., Cully, M.D., et al. (2020). Lactate Limits T Cell Proliferation via the NAD(H) Redox State. *Cell Reports* 33, 108500.

## R

Rabold, K., Netea, M.G., Adema, G.J., and Netea-Maier, R.T. (2017). Cellular metabolism of tumor-associated macrophages – functional impact and consequences. *FEBS Letters* 591, 3022–3041.

Rackley, C.R., and Stripp, B.R. (2012). Building and maintaining the epithelium of the lung. *Journal of Clinical Investigation* 122, 2724–2730.

Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Oxysterols block transport by binding to Insig. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 6511–6518.

Radišauskas, R., Kuzmickienė, I., Milinavičienė, E., and Everatt, R. (2016). Hypertension, serum lipids and cancer risk: A review of epidemiological evidence. *Medicina* 52, 89–98.

Ramasamy, I. (2014). Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 52, 1695–1727.

Rao, S., Tortola, L., Perlot, T., Wirnsberger, G., Novatchkova, M., Nitsch, R., Sykacek, P., Frank, L., Schramek, D., Komnenovic, V., et al. (2014). A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nature Communications* 5, 3056.

Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A.G., Hui, R., Csósz, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., et al. (2016). Pembrolizumab versus

Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine* 375, 1823–1833.

Requejo-Aguilar, R., Lopez-Fabuel, I., Fernandez, E., Martins, L.M., Almeida, A., and Bolaños, J.P. (2014). PINK1 deficiency sustains cell proliferation by reprogramming glucose metabolism through HIF1. *Nature Communications* 5, 4514.

Ribas, V., García-Ruiz, C., and Fernández-Checa, J.C. (2016). Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism. *Clinical and Translational Medicine* 5, 22.

Rice, L.M., Donigan, M., Yang, M., Liu, W., Pandya, D., Joseph, B.K., Sodi, V., Gearhart, T.L., Yip, J., Bouchard, M., et al. (2014). Protein Phosphatase 2A (PP2A) Regulates Low Density Lipoprotein Uptake through Regulating Sterol Response Element-binding Protein-2 (SREBP-2) DNA Binding\*. *Journal of Biological Chemistry* 289, 17268–17279.

Richter, B., Sliter, D.A., Herhaus, L., Stolz, A., Wang, C., Beli, P., Zaffagnini, G., Wild, P., Martens, S., Wagner, S.A., et al. (2016). Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc National Acad Sci* 113, 4039–4044.

Riley, J.S., and Tait, S.W. (2020). Mitochondrial DNA in inflammation and immunity. *EMBO Reports* 21, e49799.

Rizvi, N.A., Cho, B.C., Reinmuth, N., Lee, K.H., Ahn, M.-J., Luft, A., Heuvel, M. van den, Cobo, M., Smolin, A., Vicente, D., et al. (2018). LBA6Durvalumab with or without tremelimumab vs platinum-based chemotherapy as first-line treatment for metastatic non-small cell lung cancer: MYSTIC. *Annals of Oncology* 29, x40–x41.

Robichaud, S., Fairman, G., Vijithakumar, V., Mak, E., Cook, D.P., Pelletier, A.R., Huard, S., Vanderhyden, B.C., Figeys, D., Lavallée-Adam, M., et al. (2021). Identification of novel lipid droplet factors that regulate lipophagy and cholesterol efflux in macrophage foam cells. *Autophagy* 1–19.

Roca-Agujetas, V., Barbero-Camps, E., Dios, C. de, Podlesniy, P., Abadin, X., Morales, A., Marí, M., Trullàs, R., and Colell, A. (2021). Cholesterol alters mitophagy by impairing optineurin recruitment and lysosomal clearance in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 16, 15.

Rodríguez-Ruiz, M.E., Vanpouille-Box, C., Melero, I., Formenti, S.C., and Demaria, S. (2018). Immunological Mechanisms Responsible for Radiation-Induced Abscopal Effect. *Trends in Immunology* 39, 644–655.

Rodríguez-Ruiz, M.E., Vitale, I., Harrington, K.J., Melero, I., and Galluzzi, L. (2020). Immunological impact of cell death signaling driven by radiation on the tumor microenvironment. *Nature Immunology* 21, 120–134.

Roger, A.J., Muñoz-Gómez, S.A., and Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology* 27, R1177–R1192.

Rohatgi, A., Westerterp, M., Eckardstein, A. von, Remaley, A., and Rye, K.-A. (2021). HDL in the 21st Century: A Multifunctional Roadmap for Future HDL Research. *Circulation* 143, 2293–2309.

Rokicki, W., Rokicki, M., Wojtacha, J., and Dželjili, A. (2016). The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Kardiochirurgia i*

Torakochirurgia Polska/Polish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 13, 26–30.

Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., Majem, M., Lopez-Vivanco, G., Isla, D., Provencio, M., et al. (2009). Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine* 361, 958–967.

Rosenson, R.S., Brewer, H.B., Davidson, W.S., Fayad, Z.A., Fuster, V., Goldstein, J., Hellerstein, M., Jiang, X.-C., Phillips, M.C., Rader, D.J., et al. (2012). Cholesterol Efflux and Atheroprotection. *Circulation* 125, 1905–1919.

Rye, K.-A., and Barter, P.J. (2014). Regulation of High-Density Lipoprotein Metabolism. *Circulation Research* 114, 143–156.

## S

Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., and Snyder, S.H. (1994). RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78, 35–43.

Sag, D., Cekic, C., Wu, R., Linden, J., and Hedrick, C.C. (2015). The cholesterol transporter ABCG1 links cholesterol homeostasis and tumour immunity. *Nature Communications* 6, 6354.

Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology* 14, 225-IN6.

Salgia, R., Pharaon, R., Mambetsariev, I., Nam, A., and Sattler, M. (2021). The improbable targeted therapy: KRAS as an emerging target in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cell Reports Medicine* 2, 100186.

Salwig, I., Spitznagel, B., Vazquez-Armendariz, A.I., Khalooghi, K., Guenther, S., Herold, S., Szibor, M., and Braun, T. (2019). Bronchioalveolar stem cells are a main source for regeneration of distal lung epithelia in vivo. *The EMBO Journal* 38.

Sánchez-Rivera, F.J., Papagiannakopoulos, T., Romero, R., Tammela, T., Bauer, M.R., Bhutkar, A., Joshi, N.S., Subbaraj, L., Bronson, R.T., Xue, W., et al. (2014). Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing. *Nature* 516, 428–431.

Santamarina-Fojo, S., González-Navarro, H., Freeman, L., Wagner, E., and Nong, Z. (2004). Hepatic Lipase, Lipoprotein Metabolism, and Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24, 1750–1754.

Sarlak, S., Lalou, C., Dias Amoedo, N., and Rossignol, R. (2020). Metabolic reprogramming by tobacco-specific nitrosamines (TSNAs) in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 98, 154–166.

Sarraf, S.A., Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M.E., Huttlin, E.L., Gygi, S.P., and Harper, J.W. (2013). Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* 496, 372–376.

Sawant, K.V., Poluri, K.M., Dutta, A.K., Sepuru, K.M., Troshkina, A., Garofalo, R.P., and Rajarathnam, K. (2016). Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Scientific Reports* 6, 33123.

Saxton, R.A., and Sabatini, D.M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960–976.

Schabath, M.B., and Cote, M.L. (2019). Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 28, 1563–1579.

Schmidt, O., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 655–667.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331, 1565–1570.

Schuck, S. (2020). Microautophagy – distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *Journal of Cell Science* 133, jcs246322.

Schürch, S. (1982). Surface tension at low lung volumes: Dependence on time and alveolar size. *Resp Physiol* 48, 339–355.

Scott, S.V., and Klionsky, D.J. (1998). Delivery of proteins and organelles to the vacuole from the cytoplasm. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 523–529.

Scott, D.C., Rhee, D.Y., Duda, D.M., Kelsall, I.R., Olszewski, J.L., Paulo, J.A., Jong, A. de, Ovaas, H., Alpi, A.F., Harper, J.W., et al. (2016). Two Distinct Types of E3 Ligases Work in Unison to Regulate Substrate Ubiquitylation. *Cell* 166, 1198-1214.e24.

Semenza, G.L. (2012). Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* 148, 399–408.

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., et al. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO Journal* 31, 1095–1108.

Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., and Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18, 361–374.

Sharpe, L.J., and Brown, A.J. (2013). Controlling Cholesterol Synthesis beyond 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase (HMGCR)\*. *Journal of Biological Chemistry* 288, 18707–18715.

Shen, W.-J., Azhar, S., and Kraemer, F.B. (2017). SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annual Review of Physiology* 80, 1–22.

Shimada, K., Crother, T.R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V.K., Wolf, A.J., Vergnes, L., Ojcius, D.M., et al. (2012). Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity* 36, 401–414.

Shimano, H., and Sato, R. (2017). SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology — divergent pathophysiology. *Nature Reviews Endocrinology* 13, 710–730.

Shin, J.-H., Ko, H.S., Kang, H., Lee, Y., Lee, Y.-I., Pletinkova, O., Troconso, J.C., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2011). PARIS (ZNF746) Repression of PGC-1 $\alpha$  Contributes to Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Cell* 144, 689–702.

Shpilka, T., and Haynes, C.M. (2018). The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19,

109–120.

Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175, 720–731.

Skoulidis, F., and Heymach, J.V. (2019). Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer* 19, 495–509.

Skoulidis, F., Li, B.T., Dy, G.K., Price, T.J., Falchook, G.S., Wolf, J., Italiano, A., Schuler, M., Borghaei, H., Barlesi, F., et al. (2021). Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *New England Journal of Medicine* 384, 2371–2381.

Sliter, D.A., Martinez, J., Hao, L., Chen, X., Sun, N., Fischer, T.D., Burman, J.L., Li, Y., Zhang, Z., Narendra, D.P., et al. (2018). Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature* 561, 258–262.

Smith, B., and Land, H. (2012). Anticancer Activity of the Cholesterol Exporter ABCA1 Gene. *Cell Reports* 2, 580–590.

Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., and Chan, D.C. (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biology* 178, 749–755.

Soubannier, V., McLelland, G.-L., Zunino, R., Braschi, E., Rippstein, P., Fon, E.A., and McBride, H.M. (2012). A Vesicular Transport Pathway Shuttles Cargo from Mitochondria to Lysosomes. *Curr Biol* 22, 135–141.

Stinccone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M.M.C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N., Krüger, A., Alam, M.T., et al. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews* 90, 927–963.

Stolz, A., Ernst, A., and Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol* 16, 495–501.

Strappazzon, F., Nazio, F., Corrado, M., Cianfanelli, V., Romagnoli, A., Fimia, G.M., Campello, S., Nardacci, R., Piacentini, M., Campanella, M., et al. (2015). AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death & Differentiation* 22, 419–432.

Strappazzon, F., Rita, A.D., Cianfanelli, V., D’Orazio, M., Nazio, F., Fimia, G.M., and Cecconi, F. (2016). Prosurvival AMBRA1 turns into a proapoptotic BH3-like protein during mitochondrial apoptosis. *Autophagy* 12, 963–975.

Su, F., Kozak, K.R., Imaizumi, S., Gao, F., Amneus, M.W., Grijalva, V., Ng, C., Wagner, A., Hough, G., Farias-Eisner, G., et al. (2010). Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 19997–20002.

Su, F., Grijalva, V., Navab, K., Ganapathy, E., Meriwether, D., Imaizumi, S., Navab, M., Fogelman, A.M., Reddy, S.T., and Farias-Eisner, R. (2012). HDL Mimetics Inhibit Tumor Development in Both Induced and Spontaneous Mouse Models of Colon Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 11, 1311–1319.

Sun, Y., and Peng, Z.-L. (2008). Autophagy, Beclin 1, and Their Relation To Oncogenesis. *Laboratory Medicine* 39, 287–290.

Sun, N., Yun, J., Liu, J., Malide, D., Liu, C., Rovira, I.I., Holmström, K.M., Fergusson, M.M., Yoo, Y.H., Combs, C.A., et al. (2015). Measuring In Vivo Mitophagy. *Molecular Cell* 60, 685–696.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, 209–249.

Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Research* 26, 399–422.

## T

Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 621–632.

Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., and Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Gene Dev* 25, 795–800.

Tall, A.R. (1990). Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 86, 379–384.

Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 15, 104–116.

Tall, A.R., Yvan-Charvet, L., Terasaka, N., Pagler, T., and Wang, N. (2008). HDL, ABC Transporters, and Cholesterol Efflux: Implications for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell Metabolism* 7, 365–375.

Tan, S.Y.S., and Krasnow, M.A. (2016). Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development* 143, 1318–1327.

Tarling, E.J., and Edwards, P.A. (2011). ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 19719–19724.

Terasaka, N., Wang, N., Yvan-Charvet, L., and Tall, A.R. (2007). High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 15093–15098.

Thomas, R., and Weihua, Z. (2019). Rethink of EGFR in Cancer With Its Kinase Independent Function on Board. *Frontiers in Oncology* 9, 800.

Thornton, D.J., Rousseau, K., and McGuckin, M.A. (2008). Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. *Annual Review of Physiology* 70, 459–486.

Thuahnai, S.T., Lund-Katz, S., Dhanasekaran, P., Llera-Moya, M. de la, Connelly, M.A., Williams, D.L., Rothblat, G.H., and Phillips, M.C. (2004). Scavenger Receptor Class B Type I-mediated Cholesteryl Ester-selective Uptake and Efflux of Unesterified Cholesterol INFLUENCE OF HIGH DENSITY LIPOPROTEIN SIZE AND STRUCTURE\*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 12448–12455.

Tiwari, S., and Siddiqi, S.A. (2018). Intracellular Trafficking and Secretion of VLDL.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 32, 1079–1086.

Towers, C.G., Wodetzki, D.K., Thorburn, J., Smith, K.R., Caino, M.C., and Thorburn, A. (2021). Mitochondrial-derived vesicles compensate for loss of LC3-mediated mitophagy. *Developmental Cell* 56, 2029-2042.e5.

Trajkovska, K.T., and Topuzovska, S. (2017). High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol. *Anatolian Journal of Cardiology* 18, 149–154.

Trapnell, B.C., Nakata, K., Bonella, F., Campo, I., Griese, M., Hamilton, J., Wang, T., Morgan, C., Cottin, V., and McCarthy, C. (2019). Pulmonary alveolar proteinosis. *Nat Rev Dis Primers* 5, 16.

Travaglini, K.J., Nabhan, A.N., Penland, L., Sinha, R., Gillich, A., Sit, R.V., Chang, S., Conley, S.D., Mori, Y., Seita, J., et al. (2020). A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* 587, 619–625.

Travis, W.D., Brambilla, E., Nicholson, A.G., Yatabe, Y., Austin, J.H.M., Beasley, M.B., Chirieac, Lucian.R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D.B., et al. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of Thoracic Oncology* 10, 1243–1260.

Trédaniel, J., Aarab-Terrisse, S., Teixeira, L., Savinelli, F., Fraboulet, S., Gossot, D., and Hennequin, C. (2009). Pollution atmosphérique et cancer bronchique : données épidémiologiques. *Rev Mal Respir* 26, 437–445.

Treutlein, B., Brownfield, D.G., Wu, A.R., Neff, N.F., Mantalas, G.L., Espinoza, F.H., Desai, T.J., Krasnow, M.A., and Quake, S.R. (2014). Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature* 509, 371–375.

Tsuboyama, K., Koyama-Honda, I., Sakamaki, Y., Koike, M., Morishita, H., and Mizushima, N. (2016). The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science* 354, 1036–1041.

## V

Vaisar, T., Pennathur, S., Green, P.S., Gharib, S.A., Hoofnagle, A.N., Cheung, M.C., Byun, J., Vuletic, S., Kassim, S., Singh, P., et al. (2007). Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *Journal of Clinical Investigation* 117, 746–756.

Vaites, L.P., Paulo, J.A., Huttlin, E.L., and Harper, J.W. (2018). Systematic Analysis of Human Cells Lacking ATG8 Proteins Uncovers Roles for GABARAPs and the CCZ1/MON1 Regulator C18orf8/RMC1 in Macroautophagic and Selective Autophagic Flux. *Molecular and Cellular Biology* 38, e00392-17.

Vara-Perez, M., Felipe-Abrio, B., and Agostinis, P. (2019). Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation. *Cells* 8, 493.

Vargas, J.N.S., Wang, C., Bunker, E., Hao, L., Maric, D., Schiavo, G., Randow, F., and Youle, R.J. (2019). Spatiotemporal Control of ULK1 Activation by NDP52 and TBK1 during Selective Autophagy. *Molecular Cell* 74, 347-362.e6.

Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2005). ABCG1 Redistributes Cell Cholesterol to

Domains Removable by High Density Lipoprotein but Not by Lipid-depleted Apolipoproteins\*. *J Biol Chem* 280, 30150–30157.

Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., and Tontonoz, P. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR $\alpha$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 12097–12102.

Villa, E., Proïcs, E., Rubio-Patiño, C., Obba, S., Zunino, B., Bossowski, J.P., Rozier, R.M., Chiche, J., Mondragón, L., Riley, J.S., et al. (2017). Parkin-Independent Mitophagy Controls Chemotherapeutic Response in Cancer Cells. *Cell Reports* 20, 2846–2859.

Villa, E., Marchetti, S., and Ricci, J.-E. (2018). No Parkin Zone: Mitophagy without Parkin. *Trends in Cell Biology* 28, 882–895.

Villa, E., Paul, R., Meynet, O., Volturo, S., Pinna, G., and Ricci, J.-E. (2020). The E3 ligase UBR2 regulates cell death under caspase deficiency via Erk/MAPK pathway. *Cell Death & Disease* 11, 1041.

Vitale, I., Manic, G., Coussens, L.M., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2019). Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metabolism* 30, 36–50.

Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310.

Vona, R., Iessi, E., and Matarrese, P. (2021). Role of Cholesterol and Lipid Rafts in Cancer Signaling: A Promising Therapeutic Opportunity? *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 09, 622908.

## W

Wagner, P.D. (2015). The physiological basis of pulmonary gas exchange: implications for clinical interpretation of arterial blood gases. *European Respiratory Journal* 45, 227–243.

Waldman, A.D., Fritz, J.M., and Lenardo, M.J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology* 20, 651–668.

Walther, D.M., and Rapaport, D. (2009). Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793, 42–51.

Wang, B., and Tontonoz, P. (2018). Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology* 14, 452–463.

Wang, X., and Chen, X.J. (2015). A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death. *Nature* 524, 481–484.

Wang, M., Han, J., Marcar, L., Black, J., Liu, Q., Li, X., Nagulapalli, K., Sequist, L.V., Mak, R.H., Benes, C.H., et al. (2017). Radiation Resistance in KRAS-Mutated Lung Cancer Is Enabled by Stem-like Properties Mediated by an Osteopontin–EGFR Pathway. *Cancer Res* 77, 2018–2028.

Wang, N., Zhu, P., Huang, R., Wang, C., Sun, L., Lan, B., He, Y., Zhao, H., and Gao, Y. (2020). PINK1: The guard of mitochondria. *Life Sciences* 259, 118247.

Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123, 309–314.

Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN

THE BODY. *The Journal of General Physiology* 8, 519–530.

Webster, B.R., Scott, I., Traba, J., Han, K., and Sack, M.N. (2014). Regulation of autophagy and mitophagy by nutrient availability and acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841, 525–534.

Wee, P., and Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* 9, 52.

Wei, Y., Chiang, W.-C., Sumpter, R., Mishra, P., and Levine, B. (2017). Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell* 168, 224-238.e10.

Weidberg, H., and Amon, A. (2018). MitoCPR—A surveillance pathway that protects mitochondria in response to protein import stress. *Science* 360, eaan4146.

Weihua, Z., Tsan, R., Huang, W.-C., Wu, Q., Chiu, C.-H., Fidler, I.J., and Hung, M.-C. (2008). Survival of Cancer Cells Is Maintained by EGFR Independent of Its Kinase Activity. *Cancer Cell* 13, 385–393.

Weinberg, S.E., Sena, L.A., and Chandel, N.S. (2015). Mitochondria in the Regulation of Innate and Adaptive Immunity. *Immunity* 42, 406–417.

Wen, Y.-A., Xiong, X., Zaytseva, Y.Y., Napier, D.L., Vallee, E., Li, A.T., Wang, C., Weiss, H.L., Evers, B.M., and Gao, T. (2018). Downregulation of SREBP inhibits tumor growth and initiation by altering cellular metabolism in colon cancer. *Cell Death & Disease* 9, 265.

Westerterp, M., Fotakis, P., Ouimet, M., Bochem, A.E., Zhang, H., Molusky, M.M., Wang, W., Abramowicz, S., Gemert, S. la B., Wang, N., et al. (2018). Cholesterol Efflux Pathways Suppress Inflammasome Activation, NETosis, and Atherogenesis. *Circulation* 138, 898–912.

Wicha, M.S., Liu, S., and Dontu, G. (2006). Cancer Stem Cells: An Old Idea—A Paradigm Shift. *Cancer Research* 66, 1883–1890.

Wiedemann, N., and Pfanner, N. (2015). Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annual Review of Biochemistry* 86, 1–30.

Wolf, D.M., Segawa, M., Kondadi, A.K., Anand, R., Bailey, S.T., Reichert, A.S., Bliet, A.M., Shackelford, D.B., Liesa, M., and Shrihari, O.S. (2019). Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane potentials and are functionally independent. *The EMBO Journal* 38, e101056.

Wrobel, L., Topf, U., Bragoszewski, P., Wiese, S., Sztolsztener, M.E., Oeljeklaus, S., Varabyova, A., Lirski, M., Chroscicki, P., Mroczek, S., et al. (2015). Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol. *Nature* 524, 485–488.

Wu, W., Tian, W., Hu, Z., Chen, G., Huang, L., Li, W., Zhang, X., Xue, P., Zhou, C., Liu, L., et al. (2014). ULK1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC1 to regulate mitophagy. *Embo Rep* 15, 566–575.

Wu, Y., Zhang, C., Liu, X., He, Z., Shan, B., Zeng, Q., Zhao, Q., Zhu, H., Liao, H., Cen, X., et al. (2021). ARIH1 signaling promotes anti-tumor immunity by targeting PD-L1 for proteasomal degradation. *Nature Communications* 12, 2346.

## X

Xu, D., Wang, Z., Zhang, Y., Jiang, W., Pan, Y., Song, B.-L., and Chen, Y. (2015). PAQR3 modulates cholesterol homeostasis by anchoring Scap/SREBP complex to the Golgi apparatus. *Nat Commun* 6, 8100.

## Y

Yamaguchi, H., Takeo, Y., Yoshida, S., Kouchi, Z., Nakamura, Y., and Fukami, K. (2009). Lipid Rafts and Caveolin-1 Are Required for Invadopodia Formation and Extracellular Matrix Degradation by Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 69, 8594–8602.

Yamamoto, K., Venida, A., Yano, J., Biancur, D.E., Kakiuchi, M., Gupta, S., Sohn, A.S.W., Mukhopadhyay, S., Lin, E.Y., Parker, S.J., et al. (2020). Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature* 581, 100–105.

Yamazaki, T., Pedro, J.M.B.-S., Galluzzi, L., Kroemer, G., and Pietrocola, F. (2020a). Autophagy in the cancer-immunity dialogue. *Advanced Drug Delivery Reviews* 169, 40–50.

Yamazaki, T., Kirchmair, A., Sato, A., Buqué, A., Rybstein, M., Petroni, G., Bloy, N., Finotello, F., Stafford, L., Manzano, E.N., et al. (2020b). Mitochondrial DNA drives abscopal responses to radiation that are inhibited by autophagy. *Nature Immunology* 21, 1160–1171.

Yan, C., Gong, L., Chen, L., Xu, M., Abou-Hamdan, H., Tang, M., Désaubry, L., and Song, Z. (2019). PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis. *Autophagy* 16, 419–434.

Yancey, P.G., Llera-Moya, M. de la, Swarnakar, S., Monzo, P., Klein, S.M., Connelly, M.A., Johnson, W.J., Williams, D.L., and Rothblat, G.H. (2000). High Density Lipoprotein Phospholipid Composition Is a Major Determinant of the Bi-directional Flux and Net Movement of Cellular Free Cholesterol Mediated by Scavenger Receptor BI\*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 36596–36604.

Yang, C., Tian, G., Mi, J., Wei, X., Li, X., Li, X., Wang, W., and Wang, B. (2015). Causal relevance of circulating high-density lipoprotein cholesterol with cancer: a Mendelian randomization meta-analysis. *Scientific Reports* 5, 9495.

Yang, H., Liang, S.-Q., Schmid, R.A., and Peng, R.-W. (2019). New Horizons in KRAS-Mutant Lung Cancer: Dawn After Darkness. *Frontiers in Oncology* 9, 953.

Yin, K., Lee, J., Liu, Z., Kim, H., Martin, D.R., Wu, D., Liu, M., and Xue, X. (2021). Mitophagy protein PINK1 suppresses colon tumor growth by metabolic reprogramming via p53 activation and reducing acetyl-CoA production. *Cell Death & Differentiation* 28, 1–15.

Yoke Wui Ng, M., Wai, T., and Simonsen, A. (2021). Quality control of the mitochondrion. *Developmental Cell* 56, 881–905.

Youle, R.J., and Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 657–663.

Young, R.P., and Hopkins, R.J. (2010). Link between COPD and lung cancer. *Respiratory Medicine* 104, 758–759.

Young, A.R.J., Chan, E.Y.W., Hu, X.W., Köchl, R., Crawshaw, S.G., High, S., Hailey, D.W., Lippincott-Schwartz, J., and Tooze, S.A. (2006). Starvation and ULK1-dependent

- cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* 119, 3888–3900.
- Young, J.C., Hoogenraad, N.J., and Hartl, F.U. (2003). Molecular Chaperones Hsp90 and Hsp70 Deliver Preproteins to the Mitochondrial Import Receptor Tom70. *Cell* 112, 41–50.
- Yu, H., Boyle, T.A., Zhou, C., Rimm, D.L., and Hirsch, F.R. (2016). PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 11, 964–975.
- Yu, J.E., Han, S.-Y., Wolfson, B., and Zhou, Q. (2017). The role of endothelial lipase in lipid metabolism, inflammation, and cancer. *Histology and Histopathology* 33, 1–10.
- Yun, J., Rago, C., Cheong, I., Pagliarini, R., Angenendt, P., Rajagopalan, H., Schmidt, K., Willson, J.K.V., Markowitz, S., Zhou, S., et al. (2009). Glucose Deprivation Contributes to the Development of *KRAS* Pathway Mutations in Tumor Cells. *Science* 325, 1555–1559.
- Yun, J., Puri, R., Yang, H., Lizzio, M.A., Wu, C., Sheng, Z.-H., and Guo, M. (2014). MUL1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway in regulating mitofusin and compensates for loss of PINK1/parkin. *ELife* 3, e01958.
- Yvan-Charvet, L., Pagler, T.A., Wang, N., Senokuchi, T., Brundert, M., Li, H., Rinninger, F., and Tall, A.R. (2008a). SR-BI inhibits ABCG1-stimulated net cholesterol efflux from cells to plasma HDL. *Journal of Lipid Research* 49, 107–114.
- Yvan-Charvet, L., Welch, C., Pagler, T.A., Ranalletta, M., Lamkanfi, M., Han, S., Ishibashi, M., Li, R., Wang, N., and Tall, A.R. (2008b). Increased Inflammatory Gene Expression in ABC Transporter–Deficient Macrophages. *Circulation* 118, 1837–1847.
- Yvan-Charvet, L., Wang, N., and Tall, A.R. (2010a). Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 Transporters in Cholesterol Efflux and Immune Responses. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 139–143.
- Yvan-Charvet, L., Pagler, T.A., Seimon, T.A., Thorp, E., Welch, C.L., Witztum, J.L., Tabas, I., and Tall, A.R. (2010b). ABCA1 and ABCG1 Protect Against Oxidative Stress–Induced Macrophage Apoptosis During Efferocytosis. *Circ Res* 106, 1861–1869.
- Yvan-Charvet, L., Pagler, T., Gautier, E.L., Avagyan, S., Siry, R.L., Han, S., Welch, C.L., Wang, N., Randolph, G.J., Snoeck, H.W., et al. (2010c). ATP-Binding Cassette Transporters and HDL Suppress Hematopoietic Stem Cell Proliferation. *Science* 328, 1689–1693.
- ## Z
- Zamanian-Daryoush, M., Lindner, D., Tallant, T.C., Wang, Z., Buffa, J., Klipfell, E., Parker, Y., Hatala, D., Parsons-Wingter, P., Rayman, P., et al. (2013). The Cardioprotective Protein Apolipoprotein A1 Promotes Potent Anti-tumorigenic Effects. *Journal of Biological Chemistry* 288, 21237–21252.
- Zamanian-Daryoush, M., Lindner, D.J., DiDonato, J.A., Wagner, M., Buffa, J., Rayman, P., Parks, J.S., Westerterp, M., Tall, A.R., and Hazen, S.L. (2017). Myeloid-specific genetic ablation of ATP-binding cassette transporter ABCA1 is protective against Cancer. *Oncotarget* 5, 71965–71980.
- Zannis, V.I., Cole, F.S., Jackson, C.L., Kurnit, D.M., and Karathanasis, S.K. (1985). Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages.

Biochemistry 24, 4450–4455.

Zannis, V.I., Fotakis, P., Koukos, G., Kardassis, D., Ehnholm, C., Jauhiainen, M., and Chroni, A. (2014). High Density Lipoproteins, From Biological Understanding to Clinical Exploitation. *Handbook of Experimental Pharmacology* 224, 53–111.

Zappa, C., and Mousa, S.A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational Lung Cancer Research* 5, 288–300.

Zardoya, R. (2020). Recent advances in understanding mitochondrial genome diversity. *F1000Research* 9, F1000 Faculty Rev-270.

Zhang, W., and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research* 12, 9–18.

Zhang, C., Lin, M., Wu, R., Wang, X., Yang, B., Levine, A.J., Hu, W., and Feng, Z. (2011). Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 16259–16264.

Zhang, S., Hulver, M.W., McMillan, R.P., Cline, M.A., and Gilbert, E.R. (2014). The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutrition & Metabolism* 11, 10.

Zhang, Y., Yu, C., Liu, J., Spencer, T.A., Chang, C.C.Y., and Chang, T.-Y. (2003). Cholesterol Is Superior to 7-Ketocholesterol or 7 $\alpha$ -Hydroxycholesterol as an Allosteric Activator for Acyl-coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase 1\*. *J Biol Chem* 278, 11642–11647.

Zhang, Y., Breevoort, S.R., Angdisen, J., Fu, M., Schmidt, D.R., Holmstrom, S.R., Kliewer, S.A., Mangelsdorf, D.J., and Schulman, I.G. (2012). Liver LXR $\alpha$  expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. *J Clin Invest* 122, 1688–1699.

Zhao, R.-Z., Jiang, S., Zhang, L., and Yu, Z.-B. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 44, 3–15.

Zheng, M. (2016). Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* 25, 447–468.

Zhou, G. (2019). Tobacco, air pollution, environmental carcinogenesis, and thoughts on conquering strategies of lung cancer. *Cancer Biology & Medicine* 16, 700–713.

Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225.

Zhu, J., Gardner, J., Pullinger, C.R., Kane, J.P., Thompson, J.F., and Francone, O.L. (2009). Regulation of apoA1 processing by procollagen C-proteinase enhancer-2 and bone morphogenetic protein-1. *J Lipid Res* 50, 1330–1339.

Zhu, L., Derijard, B., Chakrabandhu, K., Wang, B.-S., Chen, H.-Z., and Hueber, A.-O. (2014). Synergism of PI3K/Akt inhibition and Fas activation on colon cancer cell death. *Cancer Lett* 354, 355–364.

Zhu, L., Wu, W., Jiang, S., Yu, S., Yan, Y., Wang, K., He, J., Ren, Y., and Wang, B. (2020). Pan-Cancer Analysis of the Mitophagy-Related Protein PINK1 as a Biomarker for the Immunological and Prognostic Role. *Frontiers in Oncology* 10, 569887.





Review

# Macrophage Origin, Metabolic Reprogramming and IL-1 $\beta$ Signaling: Promises and Pitfalls in Lung Cancer

Emma Guilbaud <sup>1</sup>, Emmanuel L. Gautier <sup>2</sup>  and Laurent Yvan-Charvet <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1065, Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Atip-Avenir, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Oncoage, 06204 Nice, France; eguilbaud@unice.fr

<sup>2</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) UMR\_S 1166, Sorbonnes Universités, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, 75013 Paris, France; emmanuel-laurent.gautier@inserm.fr

\* Correspondence: yvancharvet@unice.fr

Received: 28 January 2019; Accepted: 26 February 2019; Published: 2 March 2019



**Abstract:** Macrophages are tissue-resident cells that act as immune sentinels to maintain tissue integrity, preserve self-tolerance and protect against invading pathogens. Lung macrophages within the distal airways face around 8000–9000 L of air every day and for that reason are continuously exposed to a variety of inhaled particles, allergens or airborne microbes. Chronic exposure to irritant particles can prime macrophages to mediate a smoldering inflammatory response creating a mutagenic environment and favoring cancer initiation. Tumor-associated macrophages (TAMs) represent the majority of the tumor stroma and maintain intricate interactions with malignant cells within the tumor microenvironment (TME) largely influencing the outcome of cancer growth and metastasis. A number of macrophage-centered approaches have been investigated as potential cancer therapy and include strategies to limit their infiltration or exploit their antitumor effector functions. Recently, strategies aimed at targeting IL-1 $\beta$  signaling pathway using a blocking antibody have unexpectedly shown great promise on incident lung cancer. Here, we review the current understanding of the bridge between TAM metabolism, IL-1 $\beta$  signaling, and effector functions in lung adenocarcinoma and address the challenges to successfully incorporating these pathways into current anticancer regimens.

**Keywords:** lung adenocarcinoma; macrophage; immunotherapy; interleukin-1 $\beta$  and immunometabolism

## 1. Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death and the second most common malignancy with non-small cell lung cancer (NSCLC) referring for lung adeno and squamous carcinomas and accounting for up to 80% of all newly diagnosed lung cancer cases [1,2]. The overall five-year survival rate among newly diagnosed lung cancer patients remains in the low range of 15% [3]. This is in part because (1) the majority of lung cancer cases are diagnosed relatively late in the course of the disease despite advances in lung cancer screening and diagnosis and (2) lung adenocarcinomas are extremely diverse in terms of histopathology, radiology, and molecular spectrum impeding treatments despite multimodality therapeutics [4]. Since the 80's, macrophage density from biopsies of dozen types of cancer, including lung adenocarcinoma, has been linked to tumor growth and poor outcomes for cancer patients [5–8]. However, distinct subsets of tumor-associated macrophages (TAMs) exist within tumors and these cells can adopt a wide array of phenotypes depending on their environment. We are just starting to better appreciate the ontogeny and effector functions of these TAMs and how they can influence the initiation and growth of the tumor depending on a dynamic equilibrium influenced by the tumor microenvironment (TME) [5,6,9–11].

The plasticity of macrophages has now been largely accepted [12] and is reflected by their ability to sense, respond, and rapidly adapt to their local environment [13–17] to maintain tissue integrity and preserve self-tolerance [18–20]. However, when the host is chronically challenged, upon chronic exposure to irritant particles or infection, for example, macrophages may play a detrimental role contributing to a low-grade inflammatory state that leads to disease progression or even cancer initiation [21,22]. This is illustrated by the increased lung cancer risk in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

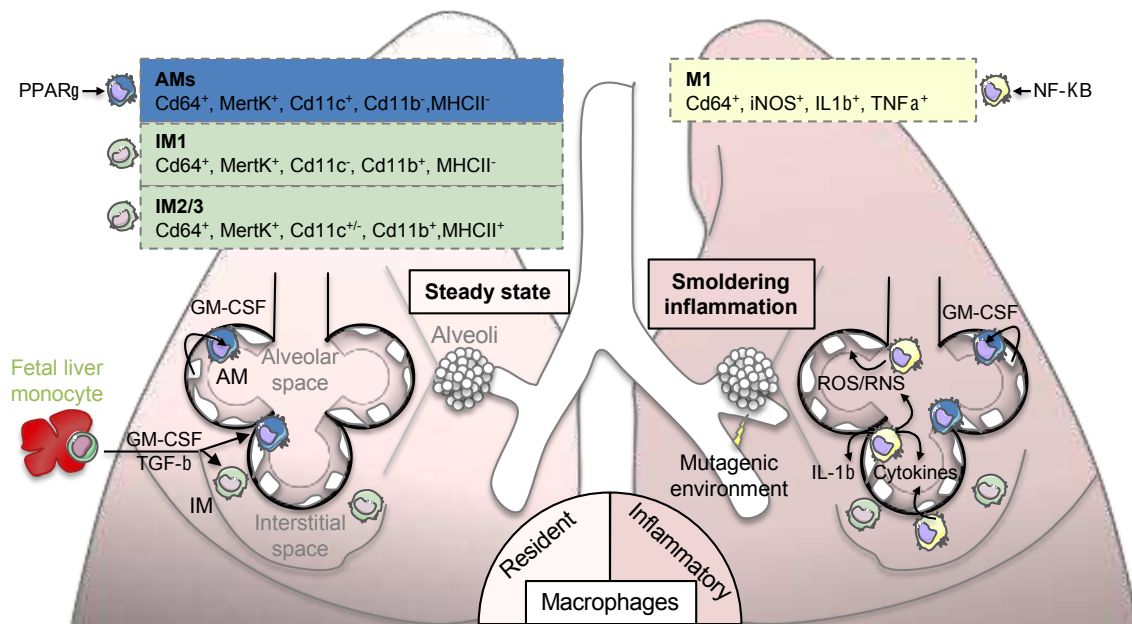
The origin of TAMs within lung adenocarcinoma and their selective functions are currently a topic for debate but a mixed ontogeny and immunosuppressive functions are emerging depending of the stage and location of the tumors [23–26]. For instance, tumors can early on secrete the colony-stimulating factor 1 (CSF-1 or M-CSF) that expands the pool of macrophages towards the cancer supporting TAM phenotype and later on the chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) that attracts monocytes [5,6,9–11]. Once infiltrated within the tumor, TAMs maintain intricate interactions with malignant cells within the TME and this is most likely the key culprit of their antitumoral response largely influencing the outcome of tumor growth and metastasis.

In this review, we describe recent advances made on the ontogeny of lung resident macrophages and their expansion and metabolic rewiring towards the lung cancer supporting TAM phenotype, which depend on a specialized TME. We discuss therapeutic promises of general therapies to block macrophage recruitment to tumors or more selective therapies to reeducate their tumoricidal functions, both having reached clinical trials. We further outline the contribution of the IL-1 $\beta$  signaling pathway, and how its metabolic-dependent modulation in TAMs could explain part of the anti-tumorigenic potential of IL-1 $\beta$  inhibition.

## 2. Environment-Dependent Maintenance of Lung Macrophages during Homeostasis

### 2.1. Lung Macrophage Ontogeny and Maintenance

Macrophages are tissue-resident cells that act as immune sentinels to maintain tissue integrity, preserve self-tolerance, and protect against invading pathogens [18–20]. In the lung, early preclinical studies have suggested that monocytes poorly contribute to tissue-resident macrophages at steady state and their maintenance mainly relies on homeostatic self-renewal [27–29]. Modern tools using fate mapping and tracing methods in mice have confirmed that a specific population of lung alveolar macrophages (AMs) originates from fetal liver progenitors and relies in large part on their ability to self-renew at steady state [30–36]. Alveolar macrophages remain the main macrophage population investigated in the lung and reside in the airspace lumen where they are specialized in recycling surfactant molecules and clearing inhaled particles and debris [37–41]. Alveolar macrophages are long-lived, with a turnover rate of only approximately 40% in a year [41]. By contrast to most of tissue-resident macrophages, the maintenance of AMs is not supported by CSF-1 as illustrated in *op/op* mice that harbor a mutation in this gene [18–20]. Indeed, mouse AMs are highly dependent on the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and the transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) for their genesis and survival [42,43]. Three additional subpopulations of mouse interstitial macrophages (IMs) have been identified in the pulmonary interstitium, comprising up to 4% of lung macrophages and presumably existing between the blood compartment and the airways [44,45]. These macrophage populations are defined by their location and site of origin, and distinguished by specific cell surface markers (Figure 1, left panel) [46]. As for AMs, two populations of mouse IMs may self-maintain independently of adult hematopoiesis [44,45]. Emphasizing the complexity of IMs, the third population of IMs could be maintained by circulating monocytes to exert their tissue remodeling and immunoregulatory activities [47–49]. Consistently, there is a strong interest to develop new tools to specifically target these different macrophage populations *in vivo* and address their transcriptional signature and immune function during lung homeostasis and diseases [50].



**Figure 1.** Lung macrophage origin and contribution to “smoldering inflammation”. Left panel: lung-resident macrophages are derived from fetal liver monocytes originating during embryogenesis. The genesis and self-maintenance of macrophages depend on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Four populations of macrophages are present in the lung and are defined by their locations and expression of specific cell surface markers (please refer to boxes): alveolar macrophages (AMs) reside in the airspaces of lung where they self-renew thanks to GM-CSF-expressing alveolar cells. AMs express peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) to maintain lipid homeostasis most likely required for surfactant lipid recycling. Three interstitial macrophage (IMs) populations are located in the lung interstitium and have potential immunoregulatory properties. Right panel: upon exposure to irritant particles or chronic inflammation, macrophages can be primed into an inflammatory M1 phenotype participating to a “smoldering inflammation”. This inflammation is illustrated by the secretion inflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) or tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) that are under the control of the transcriptional factor NF- $\kappa$ B and the production of reactive oxygen or nitrogen species (ROS/RNS) that favor the induction of somatic mutations in surrounding epithelial cells.

## 2.2. Environment-Dependent Lung Macrophage Identity during Homeostasis

The plasticity of macrophages has now been largely accepted [12] and is reflected by their ability to sense, respond and rapidly adapt to their local environment, including inflammatory signals [13], ectopic nutrient deposition [14,15] or apoptotic debris [16,17]. Consistently, gene expression patterns of mouse macrophages are diverse among various peripheral tissues reflecting their propensity to sense environmental cues and the wide array of phenotypes they can adopt [51–53]. For instance, macrophages within the distal airways face around 8000–9000 L of air every day and for that reason are continuously exposed to a variety of inhaled particles, allergens or airborne microbes [37–40]. A handy and consequently persistent shorthand for understanding macrophage function divides these cells into two extreme phenotypes of a large spectrum *in vitro* by polarizing them into a pro-inflammatory M1 phenotype induced by LPS (alone or in combination with INF $\gamma$ ) or an alternative M2 phenotype induced after IL-4 stimulation [54–56]. Although oversimplified, this *in vitro* classification has provided a useful guide for investigating the mechanisms that dictate macrophage switch during lung inflammation or repair [57,58]. For instance, while the inflammatory properties of M1 macrophages contribute to early host defense or injury responses, the repair functions of M2 macrophages play a crucial role during wound healing. This adaptation to the environment could explain why macrophage effector functions is intimately linked to intracellular metabolic reprogramming to rapidly respond

to the adequate energy demand [59–62]. However, this classification limits our ability to clearly define a boundary and categorize cells during homeostasis as macrophages respond to a vast number of steady state single or combined environmental cues, thus complicating our understanding of the precise mechanisms and metabolic flows that maintain macrophage basic cellular functions *in vivo*. At least, compared to other tissue resident macrophages, AMs are better equipped with genes involved in gas exchange such as the carbonic anhydrase *Car4* due to their proximity to the airways or genes regulating lipid metabolism in order to catabolize the surfactant, which are in large part controlled by the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) [51,53]. Consistently, PPAR $\gamma$  expression is important to maintain lung macrophage transcriptome, functionality, and surfactant catabolism as well as response to infection in mice [63–66]. This tissue specific transcriptional signature is in part the consequence of a chromatin landscape reshaping induced by the local microenvironment [53] that could largely be influenced by acute and chronic inflammation [57,67] and epigenetic-dependent reprogramming [67,68]. In contrast, little is known about the regulation of IM populations. Besides sensing microbial products [47], IMs may be impacted by low oxygen tension (i.e., hypoxia) to exert their immunoregulatory activities in mouse pulmonary hypertension or allergenic contexts [69,70]. Thus, given their different phenotypes and ontogenies, it is now clear that AMs and IMs perform different functions in the lung that are so far been linked to tissue maintenance (i.e., surfactant catabolism and luminal infection) and innate immunoregulatory mechanisms (i.e., hypoxia and allergen sensing and tissular infection).

### 3. Lung Macrophage Origin and Diversity in Lung Adenocarcinoma

#### 3.1. Smoldering Inflammation

Environmental and genetic factors influence lung cancer pathogenesis with cigarette smoke being the major environmental risk factor, followed by chronic infection and dietary factors. Chronic inflammatory diseases are linked to the initiation of tumorigenesis in part by creating a mutagenic environment in sub-epithelial stroma [21,22]. This type of inflammation with increased cancer risk is often referred to “smoldering inflammation”. Immune cells, especially macrophages, participate to the mutagenic environment by producing various cytokines (including IL-1 $\beta$ ) and generating reactive nitrogen and oxygen species that promote genetic instability and induce somatic mutations in epithelial cells (Figure 1, right panel). Even if detailed mechanisms underlying tobacco-induced cancerogenesis are not completely elucidated [71], there is strong evidence that cigarette smoke contributes to this smoldering inflammation by inducing secretion of inflammatory cytokines and macrophage apoptosis [72,73] along with the formation of lung nodules [74]. The two most frequent oncogenic mutations in lung adenocarcinoma, which are generally mutually exclusive, include the activating mutations in a small GTPase transducer protein KRAS (V-KI-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) and the epidermal growth factor receptor (EGFR) [4]. In preclinical and clinical studies, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) leads to increased lung cancer risk [75,76]. This disease is predicted to rank in the top five of overall burden of disease by 2020 according to the World Health Organization (WHO) [77] because of increased tobacco use and its relationship to the metabolic syndrome [78,79]. There are also evidences that COPD could be driven by chronic exposure to irritant particles such as asbestos or silica through NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion [80,81]. Thus, chronic inflammatory diseases, dominated by macrophage inflammation, is a culprit of cancer initiation.

#### 3.2. Resident Tumor-Associated Macrophages (rTAMs)

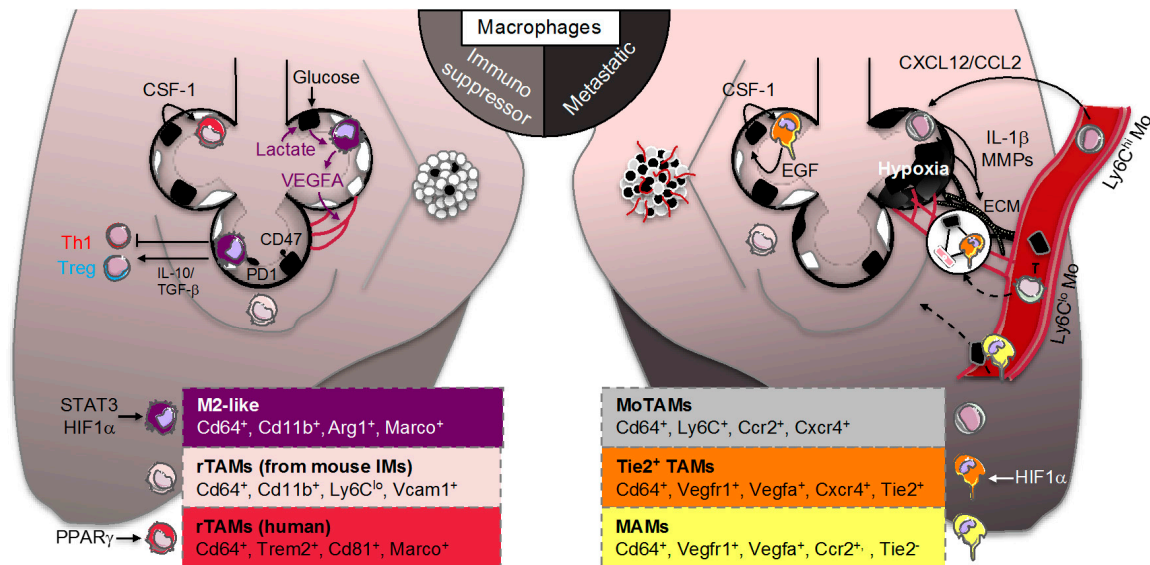
On the site where a tumor develops, malignant cells are surrounded by non-malignant stroma cells that are part of the TME. Non-malignant populations include connective tissue cells and leucocytes, with TAMs representing the majority of the leukocyte population [82,83]. The specific maintenance of tissue-resident macrophages through *in situ* proliferation and the diversity of TAMs within tumors

have challenged our understanding of their role in tumors. Indeed, in mouse models of brain tumors and pancreatic cancer, TAMs can originate from both circulating monocytes and tissue-resident macrophages where they could facilitate tumor growth by contributing to tissue remodeling [25,84]. After inoculation of TC-1 lung carcinoma cells in mice, the group of Boissonnas identified a specific population of mouse rTAMs that originated from tissue-resident IMs already present in healthy lungs that could support lung tumor development (Figure 2, left panel) [85]. In comparison to other macrophage subsets, profiling of rTAMs revealed a transcriptional signature associated to tissue remodeling including transcripts related to extracellular matrix (ECM) and vasculature interactions that supported tumor cell growth [85]. Using single-cell and mass cytometry by time of-flight (CyTOF) analyses in early human lung adenocarcinomas, the group of Merad also identified a unique tumor-specific macrophage population that dissociated from tissue-resident macrophages (Figure 2, left panel) [86]. These rTAMs exhibited an upregulation of transcripts involved in macrophage effector functions such as triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2), tetraspanin CD81 or macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) that were associated with a significant survival disadvantage [86]. As reviewed elsewhere, it was previously reported that both TREM2 and MARCO are critical in mouse airway macrophages to limit pro-inflammatory or Toll-like receptor responses [41]. Intriguingly, these human rTAMs also expressed higher levels of the transcription factor PPAR $\gamma$  involved in tissue-resident AM immunomodulatory functions and surfactant catabolism [86]. These findings suggest that rTAMs signature may be associated with a tumor-specific metabolic rewiring opening therapeutic perspectives for lung cancer diagnosis and treatment [87]. For instance, pro-surfactant protein B (SFTPB), known to be transcriptionally controlled by PPAR $\gamma$ , is used as a serum biomarker of lung adenocarcinoma both in preclinical and clinical studies [88–90]. Additionally, higher density of anti-tumoral TAMs were observed in human lung tumor nests and stroma [21] and stroma TAMs were associated with systemic blood inflammation (i.e., elevated plasma CRP levels), adverse prognostic factors (i.e., lymph node metastasis) or poor overall survival [91,92].

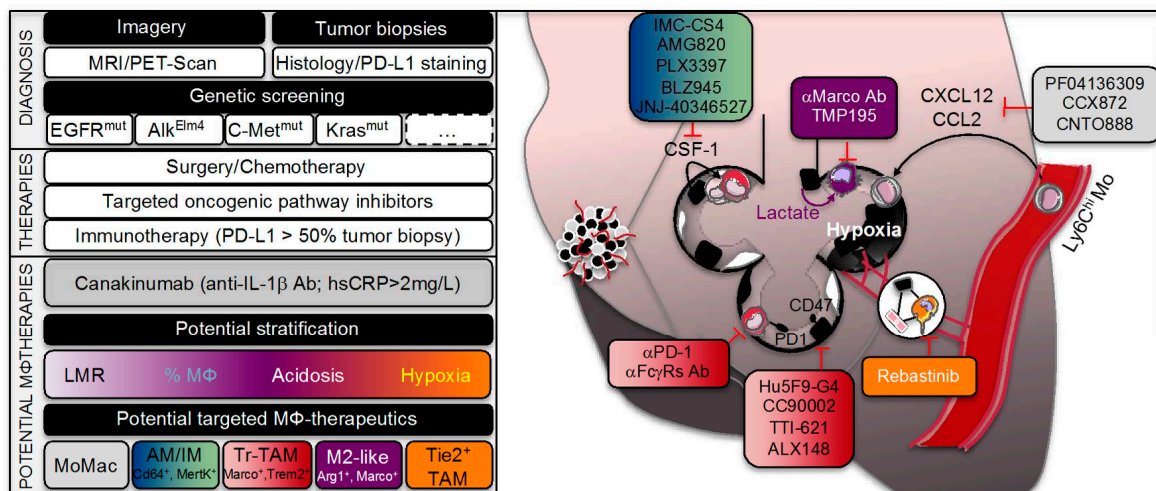
### 3.3. Monocyte-Derived TAMs (MoTAMs)

While the role of rTAMs in promoting cancers spread (i.e., metastasis) is well documented, the role of MoTAMs remains much less understood beyond their potential roles in continuously replenishing tumors [6,93]. The TAMs were originally hypothesized to originate from circulating monocytes that were recruited in response to chemotactic signals released from tumor cells with a subset of these cells being called myeloid-derived-suppressor cells [94,95]. Targeting chemokine interactions and subsequent recruitment of macrophages within tumors, including the CCL2/CCR2 or CXCL12/CXCR4/7 chemokine-chemokine receptor axes, have shown great potential for cancer therapies in various mouse models of cancer metastasis [96–98]. In the clinic, antibodies that selectively target CCL2 (CNTO888) have produced mixed results as antitumor activity [99–101]. By contrast, CCR2 inhibitors (i.e., PF04136309 or CCX872) are currently tested in metastatic pancreatic cancer (Figure 3) [102,103]. Using a mouse model of lung cancer metastasis driven by p53 deficiency and the oncogenic mutation *Kras*<sup>G12D</sup> the group of Pittet showed that circulating classical inflammatory monocytes employ the chemokine receptor CCR2 to promote a potent macrophage amplification program that generated TAMs within the lung (Figure 2, right panel) [23,94]. A role for the CXCL12/CXCR4/7 chemokine-chemokine receptor axes has also been proposed in mouse lung cancer metastasis-induced by lung carcinoma cell transplantation [104,105] most likely by shaping infiltrated immune cell population and promoting angiogenesis [106]. By contrast to classical monocytes, the group of Hedrick recently identified that nonclassical “patrolling” monocytes, enriched in the microvasculature of multiple mouse metastatic tumor models, prevented tumor invasion and reduced lung metastasis by scavenging tumor material from the lung vasculature (Figure 2, right panel) [107]. Further investigations will be required to pinpoint at with stage the imbalance between classical and non-classical MoTAMs occurs in lung cancer. Still, some evidences in humans indicate that the lymphocyte–monocyte ratio (LMR) could not only be an independent prognostic factor in patient with

NSCLC (Figure 3) [108] but also a predictor of survival and clinical outcome before complete resection for primary lung cancer or after treatment with anti-angiogenic therapy plus chemotherapy [109–112]. However, whether this ratio predicts a chemokine gradient, a switch between MoTAMs and/or the pathologic role for infiltrated MoTAMs remain to be fully elucidated.



**Figure 2.** Macrophage effector functions as part of the 7th hallmark of cancer. Right panel: In established tumors, tumor-associated macrophages (TAMs) are the major part of the immune infiltrate that constitutes the tumor microenvironment (TME). Malignant cells produce the colony stimulating factor 1 (CSF-1), which participates to the conversion of tissue-resident macrophages into resident-TAMs (rTAMs). Their origin and cell surface makers may differ between mice and humans, with PPAR $\gamma$  being highly expressed in human rTAMs. Tumor cells also produce lactate through anaerobic glycolysis referred as the “Warburg effect” that can feed cancer cells in a cell-autonomous fashion for proliferation or act in a paracrine fashion to stabilize the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) and promote a non-classical “M2-like” macrophage polarization. The signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is another key transcription factor of M2 polarization. These M2-like macrophages participate to the tumor growth through at least 4 mechanisms: (1) secretion of the angiogenic vascular endothelial growth factor A (VEGFA), (2) expression of the immune checkpoint programmed death-1 (PD-1), (3) defect in recognizing and phagocytosing CD47-expressing tumor cells and (4) immunosuppression through inhibition of Th1 helper cells (Th1) and recruitment of regulatory T cells (Treg). Left panel: TAMs are also involved in more chaotic metastatic tumors. A feed-forward loop between CSF-1-expressing tumor cells and EGF-expressing TAMs contributes to intensive proliferation and oxygen consumption leading to a hypoxic environment. Tumor cells also secrete chemokine ligands such as CXCL12 and CCL2, involved in the recruitment into the tumor site of newly monocyte-derived TAMs (MoTAMs) from circulating Ly6C $^{hi}$  monocytes contributing to the expansion of the tumor and the hypoxic niche. Hypoxia within tumor nest alters tumor cells and surrounding MoTAMs promoting extracellular matrix (ECM) remodeling through secretion of IL-1 $\beta$  and metalloproteases (MMPs). This remodeling favors the “angiogenic switch”. A population of Tie2 $^+$  TAMs, which most likely derives from a subpopulation of circulating Ly6C $^{lo}$  monocytes, is located within the tumor vasculature interacting with mammalian-enabled (MENA)-expressing tumor cells and endothelial cells to further promote angiogenesis and create a metastatic environment. Circulating Ly6C $^{lo}$  monocytes also scavenge tumor materials to prevent tumor invasion whereas metastasis-associated macrophages (MAMs) allow the extravasation of tumor cells into the lung.



**Figure 3.** Lung adenocarcinoma treatment and emerging therapeutic potential of targeting macrophages. Diagnosis of lung adenocarcinoma patient requires at first magnetic resonance imaging (MRI) or positron-emission tomography scan (PET-scan). Tumor biopsies were also performed to further characterize the histology of the tumor and to determine the cancer cell's origin, the disease progression, and the expression of PD-L1 among other features. Oncogenic mutations driving lung adenocarcinomas were screened, of which V-KI-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) and epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations were the most frequent. These different diagnoses allow personalized treatment options with targeted oncogenic pathway inhibitors and/or chemotherapy. Immunotherapy is highly patient-dependent since the treatment with a checkpoint inhibitor that targets the PD-1/PD-L1 pathway requires tumors expressing levels of PD-L1 higher than 50%. These therapies are generally not exclusive and different strategies are employed for a better healing without remission. Novel potential therapies are aimed at targeting tumor-associated macrophages (TAMs). Whether or not IL-1 $\beta$  inhibitory antibody (Canakinumab) targets macrophages, its use on patients with C-reactive protein (CRP) levels higher than 2 mg/L reduced the rate of lung cancer. Composition of the tumor microenvironment (TME) may allow patient stratification. For instance, lymphocyte-monocyte ratio (LMR), a prognostic factor and a predictor survival, could be modified with CCR2 inhibitors (PF04136309 or CCX872) or with CCL2 inhibitors (CNTO888), preventing the recruitment of circulating Ly6<sup>Ch</sup>i monocytes into tumors. To limit the conversion of tissue-resident macrophages (i.e., alveolar macrophages AMs and interstitial macrophages IMs) into TAMs, blocking antibodies anti-CSF-1R (IMC-CS4 or AMG820) and tyrosine kinase inhibitors (PLX3397, BLZ945 or JNJ-40346527) are used. Cancer cells express CD47 on their surface, known to be a “don't eat me” signal and recognized by SIRP1 $\alpha$  expressed on macrophages, which triggers a cascade of events that inhibit phagocytosis: anti-CD47 (Hu5F9-G4 or CC90002) or competitive recombinant SIRP1 $\alpha$ FC (TTI-621 or ALX148) are developed as a way to reeducate TAMs for eliminating cancer cells. As for T-cells, TAMs also express the immune checkpoint receptor PD-1, inducing immune tolerance and TAMs PD-1 expression reduced the phagocytic potency against tumor cells. Immunotherapy with the use of  $\alpha$ PD-1 not only targets PD-1/PD-L1 pathway on T-cells but is efficient to reactivate phagocytic potency of macrophages. However, TAMs could limit anti-PD-1 therapeutic benefits by stealing and capturing  $\alpha$ PD-1 antibody from the CD8<sup>+</sup> T-cells via Fc $\gamma$ RIIb/III receptors unless if  $\alpha$ Fc $\gamma$ Rs antibodies are administrated before. Another way to reeducate TAMs is to convert M2-like macrophages to an antitumor phenotype in targeting MARCO ( $\alpha$ Marco Ab) or in inhibiting histone deacetylase (TMP195) to reprogram macrophage-dependent T-cell immune responses. Rebastinib reduced cancer cell metastasis by inhibiting a specific Tie2<sup>+</sup> TAMs population implicated in the angiogenic switch.

## 4. Lung Macrophage Immunometabolism and Function in Lung Adenocarcinoma

### 4.1. TAM Immunomodulation

Understanding the distinct functions of different TAM populations within tumors remains an intense area of research. Nevertheless, in the vast majority of cancers, macrophages exhibit an overall immunosuppressive phenotype characterized by low levels of inflammatory molecules and an increased expression of transcripts expressed by alternatively activated M2 macrophages (Figure 2, left panel) [6]. Their *in vitro* and *in vivo* responses are associated with TGF- $\beta$  and other growth factor such as vascular endothelial growth factor (VEGFA), interleukin or metalloprotease production that could impact their proliferation and differentiation in an autocrine manner and their surrounding environment in a paracrine manner [113,114]. This macrophage switch was recently highlighted in a transcriptional single cell analysis of human lung adenocarcinomas [115]. This antitumor response is thought to be mediated by the local environment created by the tumor to educate and take advantage of them. Although the M1/M2 distinction is oversimplified, therapies aimed at reprogramming TAMs towards a pro-inflammatory phenotype have emerged as a way to promote tumoricidal functions of TAMs. In animal models, drugs that inhibit key signaling molecules involved in M2 polarization (i.e., IL-4, STAT3 or PI3-kinase) successfully limited the immunosuppressive functions of TAMs and shrank tumors [116–120]. Macrophage-specific deletion of c-MYC also reduced tumor growth by preventing alternative TAM polarization [121]. Similarly, targeting the macrophage receptor with collagenous structure (MARCO), which is a key M2 marker, reprogrammed macrophage-dependent T-cell immune responses restricting tumor development and metastasis in mice (Figure 3) [122]. These findings add on the original Weissman's work on how cancer cells escape TAM's cancer-killing potential. Indeed, almost every type of cancer cell expresses CD47 at their cell surface, which is a molecule known for its role on normal, healthy cells as a "don't eat me" signal to phagocytosing macrophages (Figure 2, left panel) [123]. By expressing CD47, cancer cells will block "eat me" signals (such as the molecule calreticulin, which marks the cells for phagocytosis) by engaging the signal regulatory protein alpha (SIRP1 $\alpha$ ) on the surface of macrophages and limiting their cellular rearrangement for efficient engulfment. These findings led to novel therapeutic approaches targeting CD47 or SIRP1 $\alpha$  (i.e., anti-CD47 antibodies such as Hu5F9-G4 or CC90002 and competitive recombinant SIRP1 $\alpha$ FC such as TTI-621 and ALX148) as a way to reeducate TAMs for eliminating cancer cells in humans (Figure 3) [124,125]. Another example to reeducate the tumoricidal activity of TAMs is the use of CD40 agonists [126] that have also found their ways to the clinic [11]. Despite major efforts in precision medicine in the era of personalized medicine [127], identifying the type of cancer and patient population who will benefit the most from these emerging "macro-immunotherapies" is still a matter of intense investigations. At least in mouse models of lung cancer metastasis-induced by lung carcinoma cell transplantation or xenograft, therapeutic targeting of intracellular signaling pathways that regulate the switch between macrophage polarization states or the efferocytic function of TAMs was efficient to promote tumor regression and synergized with checkpoint inhibitor therapy [116,117,124,128–131].

### 4.2. Adaptation of TAM to the "Warburg Effect"

Although the immunosuppression of TAMs is anticipated to be highly complex and context-dependent, recent evidence suggest that metabolic changes in tumor cells could create a metabolic imbalance within the TME that can significantly impact TAM effector functions [132,133]. This environment is generally characterized by hypoxia and acidosis. The latter arises from the propensity for cancer cells to convert glucose to lactate despite the presence of oxygen, a mechanism originally described by Otto Warburg and referred as the "Warburg effect" [134]. Consistently, positron emission tomography (PET) scans using 18F-labeled 2-deoxyglucose as a non-metabolizable glucose analog light up primary and metastatic mouse and human lung cancers (Figure 3). Additionally, an inverse association between the tumor expression of the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ , glucose transporter GLUT1 or the lactate dehydrogenase LDHA and the prognostic of patients was observed in

lung adenocarcinoma [135–138]. Recent works from the group of DeBerardinis elegantly showed that human NSCLC heterogeneously oxidize glucose in the tricarboxylic acid (TCA) cycle [139] and even use a larger amount of lactate in a cell-autonomous fashion [140]. Some preclinical evidence in a lung cancer murine xenograft model suggest that targeting GLUT1 inhibits cancer cell growth [141,142]. In a murine model of *Kras*<sup>G12D</sup>-driven lung cancer, pharmaceutical LDHA inhibition also inhibited both tumor progression and regression [143]. Thus, optimization of GLUT1 (BAY and DRB-18) or LDHA inhibitors may offer novel therapeutic strategies for treating lung cancer [144–146]. The importance of this metabolic pathway for TAM effector functions has been revealed by Colegio et al. who demonstrated in a murine model of Lewis lung carcinoma that lactic acid produced by tumors stabilizes HIF1 $\alpha$  in TAMs, leading to an “M2-like” phenotype that was independent of IL-4R signaling (Figure 2, left panel) [147]. In other mouse model of cancer, the immunosuppression of TAMs was rather attributed to a role of HIF2 $\alpha$  in accelerating tumor burden [148]. These discrepancies may reflect the specific metabolic rewiring of tumors depending on the oncogenic driver mutation, the local TME organization or the tissue where they develop and how TAMs form an alliance with cancer cells for metabolic symbiosis or compete for precious nutrients [132,149,150]. Recently, Carmona-Fontaine et al. showed that the modular organization of hypoxia and acidosis within the mouse TME may not only dictate the metabolic rewiring of TAMs but may also be sufficient to recapitulate their spatial diversity in vitro [151,152]. Although oxidative phosphorylation (OXPHOS) is a hallmark of anti-inflammatory M2 macrophages by contrast to glycolytic M1 macrophages in vitro [59,60] and the high glucose requirement of the tumor competes with the surrounding cells present in the mouse TME [153], reports on the glucose utilization and OXPHOS by TAMs in lung adenocarcinoma remain scarce [133].

#### 4.3. TAM Immunometabolism beyond Glycolytic Activity

Besides glucose metabolism, modulation of lipid and amino acid metabolism by tumors could also impact the metabolic flexibility and mitochondrial OXPHOS in TAMs [133,149,150]. Although current knowledge on whether modulation of peripheral lipid flux affects cancer pathogenesis is still elusive and controversial [154], an original study from the group of Hoefler revealed that inhibition of peripheral lipolysis was not sufficient to locally affect tumor burden [155]. Moreover, the importance of the pathophysiological tissue context for cancer growth has recently been highlighted by the metabolic phenotyping of a murine model of *Kras*<sup>G12D</sup>-driven lung tumor revealing that glutamine utilization was minimal in contrast to in vitro culture or other types of cancer [156]. Thus, the origin of alteration of lipid and amino acid metabolism in lung adenocarcinoma remains to be fully understood. On one hand, it could be linked to local acidosis that reprogram mitochondrial metabolism and promote histone deacetylation [157–159]. In line with these observations, checkpoint blockade therapy to restore immune cell nutrition restriction, nutritional intervention or treatment with a histone deacetylase inhibitor (TMP195) converted immune cells to an antitumor phenotype in mouse models of cancer metastasis (Figure 3) [153,160–162] including a shift from an M2 phenotype to a more efferocytic function of TAMs against cancer cells [160]. Alternatively, there is emerging evidence of local communication between cancer cells and TAMs through energy metabolism-derived (i.e., lipid and amino acid) mediators, referred to nowadays as “oncometabolites” or “metabokines” [163–165], even though their identification in lung adenocarcinoma has been limited [156,163–165]. At least, alteration of lipid metabolism within different populations of macrophages, especially AMs, in an immunocompetent syngeneic murine model injected with Lewis lung carcinoma cell correlated with selective expression of eicosanoids from both tumor cells and TAMs [166,167]. Although a new fatty acid-synthesis inhibitor (ND-646) was shown to blunt lung tumor growth in xenograft and genetically engineered mouse models of NSCLC [168], it is unknown if this compound may restore the functional polarization of TAMs as it has been shown by metformin in other cancer models [169,170]. Apart from glutamine, other amino acids such as arginine derived from the urea cycle may also be involved in the communication between cancer cells and TAMs. Indeed, knockdown of arginase 1 (ARG1) in macrophages prevented lung tumor growth by limiting the hydrolysis of arginine to

ornithine [147]. Most of these metabolic pathways converge to increase localized ROS in cancer cells, which activate signaling pathways and transcription factors such as the transcription factor nuclear factor (erythroid-derived 2)-related factor-2 (NRF2) to promote tumorigenesis [160]. For instance, NRF2 regulates serine biosynthesis in NSCLC to generate NADPH and recycle oxidized glutathione, which is critical for the redox balance of cancer cells. Thus, emerging mechanistic insights linking tumor cells to the metabolic reprogramming of TAMs in lung adenocarcinoma hold promise for novel cancer therapy.

#### 4.4. Tie2+ TAMs and Metastasis-Associated Macrophages (MAMs)

From original works by the group of Pollard and others [5,6], it has been well appreciated that, by supporting tumor angiogenesis, TAMs not only supply oxygen, nutrients and growth factors for tumor's development but also lay out a path for metastatic cells to reach new sites in the body, a process known as the "angiogenic switch" [171]. In the mid-1990s, evidence arose from CSF-1 deficient mice that the maturation and survival of macrophages had to do with cancer's spread (i.e., metastasis), rather than cancer tumor growth [5,6,9–11]. This led to the development of several anti-CSF-1R therapies (including CSF-1R blocking antibodies IMC-CS4 or AMG820 or tyrosine kinase inhibitors such as PLX3397, BLZ945 or JNJ-40346527) for patients with advanced solid tumors refractory to standard therapy (Figure 3) [11]. A specific Tie2-positive TAM population has been identified to mediate tumor angiogenesis and support tumor cell intravasation [172,173]. These TAMs could originate from Tie2-positive monocytes that are a subpopulation of nonclassical "patrolling" monocytes playing a role during mouse tumor neovascularization [174–177]. Mechanistically, these TAMs secrete VEGFA and proteases that degrade basement membranes of the ECM and participate in the formation of a TME of metastasis that comprises a pyramid-type structure on the vessel wall with mammalian-enabled (MENA)-expressing tumor cells that allow interactions with Tie2+ TAMs and blood vessel endothelial cells (Figure 2, right panel) [172,173]. These interactions suggest cell–cell contact for short-range transmission of growth and survival signals as recently illustrated for macrophage–fibroblast circuit [178] and resembles the paracrine EGF–CSF-1 interactions previously observed between TAMs and tumor cells [5,6]. Hypoxia is a major determinant of angiogenesis and HIF1 $\alpha$  in TAMs acts as a major regulator of the "angiogenic switch" by inducing a switch from aerobic to anaerobic metabolism and increasing expression of diverse range of factors including VEGFA [174]. Despite mitigated cancer patient outcomes with VEGFR tyrosine kinase inhibitors or VEGFR2 antibodies [4,179], these findings have set up the stage for therapeutic approaches aimed at reducing cancer cell metastasis using a selective Tie2 inhibitor Rebastinib (Figure 3). In mice, the cooperation of the two oncogenes *Kras* and *Myc* has been recently shown to be required for the "angiogenic switch" and the transition to invasive adenocarcinoma [180]. It will remain to be carefully investigated in lung adenocarcinoma whether these Tie2+ TAMs also impact the epithelial–mesenchymal transition (EMT) that has been linked to invasive potential of various cancer cells [113,114,181,182]. Additionally, another population of TAMs seeding at distant sites and being recruited by CCL2 were dubbed metastasis-associated macrophages (MAMs) (Figure 2, right panel). These MAMs allow the extravasation of mouse tumor cells by secreting the chemokine ligand CCL3 and CSF-1 that facilitates metastatic seeding of breast cancer cells in the lung [183,184] and potentially VCAM-1 that transmits survival signals to these tumor cells [185]. The relevance of these MAMs in helping cancer cells to leave blood vessels and promote lung adenocarcinoma metastasis in mice was previously illustrated through their recruitment to extravasating pulmonary metastatic cells regardless of species of origin [186].

#### 4.5. Bone Marrow Macrophages and Bone Metastasis

Osteolytic bone metastasis is a frequent event in late stage of lung cancer and is associated with high mortality of lung adenocarcinoma [187–189]. Once metastatic tumor cells reach the bone marrow (BM) after adhesion to the mineralized matrix through their invadopodia [190], they

promote resorption and bone destruction by interfering with the osteoblastic bone-forming cells and osteoclastic bone-resorbing cells [191]. Osteoclasts are large multinucleated cells that differentiate from macrophage lineage precursors by increasing tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) expression following coregulation by CSF-1 and the receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) among other growth factors [192,193]. These growth factors can all be secreted by metastatic lung tumor cells [194–196]. Two different populations of macrophage have been described in the BM namely CD11b<sup>hi</sup> osteomacs [197] and CD11b<sup>int</sup>CD169<sup>+</sup> macrophages [198] that are localized in different hypoxic area of the BM [199]. Targeting of these macrophage populations influences tumor-induced bone modelling in mouse models of prostate or Lewis lung cancer-induced bone metastasis [200,201]. The underlying mechanisms are not fully understood but could be linked to perturbation of osteoclast differentiation and disruption of the endosteal “osteoblastic niche” through bone resorption (i.e., mineral dissolution, followed by a degradation of the organic phase) and demineralization (i.e., acidification of the extracellular microenvironment and exposure to proteases) [138]. Future studies will be required to investigate whether tumor cells could also locally impact bone tissue, which is a specialized connective tissue consisting of cells and mineralized extracellular matrix (i.e., hydroxyapatite, a type of calcium phosphate) that could be responsible for the production of the calcified matrix in lung nodules [202–204].

## 5. IL-1 $\beta$ Signaling and Immunometabolism: A New Role in Lung Adenocarcinoma?

### 5.1. CANTOS Trial and Lung Adenocarcinoma

A recent retrospective analysis by Ridker et al. [205] reveal an unexpected dramatic reduction in the number of incident cases of lung cancer in the large, randomized CANTOS trial (Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study) originally designed to test the hypothesis that canakinumab, an interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) inhibitory antibody, could reduce a secondary cardiovascular event in very high-risk patients with prior myocardial infarction and inflamed setting (i.e., C-reactive protein (CRP) levels > 2 mg/L) (Figure 3). Of note, the incidence rate for all non-lung cancers was not statistically significant and one has to be cautious with hypothesis-based retrospective analysis [206,207]. Nevertheless, these findings led to a follow-up phase I study aimed at testing the combination of canakinumab and PD-1 inhibitor in NSCLC patients. As discussed above the relationship between inflammation and cancer is complicated, probably driven by an immunosuppression within TME. However, the concept of immunotherapy came from Coley’s observation that cancer regression can be achieved by active bacterial infection [208,209]. Thus, the higher incidence of bacterial infection in the CANTOS trial [210] may suggest that by dampening chronic low-grade inflammation, canakinumab has unlocked an unspecific bacterial lung antitumoral activity. However, there are several evidences that blocking IL-1 $\beta$  signaling or upstream NLRP3 inflammasome regulation may have direct anticancer activity [211–215]. First, anti-IL-1 $\beta$  antibody dampens low-grade inflammation [211,216], which could prevent “smoldering inflammation” and reduce the mutagenic environment created by inflammatory immune cells [21,22]. Consistently, expression of specific inflammasome gene modules stratifies older individuals into two extreme clinical and immunological states that was associated with all-cause mortality [217]. Since IL-1 $\beta$  has been linked to airway inflammation [218,219], it will be of interest to know if the high CRP levels in the CANTOS trial at baseline were associated with an incidence of COPD, known to increase lung cancer risk [75,76]. Reduced COPD incidence could partially explain how canakinumab at the 300 mg dose induced a marked separation of the incidence curves for lung cancer within few months. Additionally, deficiency or inhibition of IL-1 $\beta$  signaling in TME has been shown to inhibit tumor angiogenesis and metastasis in mouse models of lung metastases-induced by various metastatic cells regardless of species of origin [220–225]. These findings may suggest an additional direct effect of canakinumab on established lung tumors. The CANTOS trial has opened the door to the human relevance of the

relationship between IL-1 $\beta$  signaling and lung cancer and provides promising avenue with which to explore new anti-cancer therapies.

### 5.2. IL-1 $\beta$ Signaling and Lung Adenocarcinoma

The cell origin of IL-1 $\beta$  secretion and the implication of NLRP3 or other inflammasomes in lung TME remain to be identified and could have crucial therapeutic implications. Indeed, this pathway could promote on one hand leukocyte priming and trafficking or on the other hand, tumor growth. The tumor growth potential could be attributed to (1) an imbalance between cancer cell proliferation and pyroptosis, (2) an increased epithelial–mesenchymal transition (EMT) through secretion of metalloproteases and other ECM remodeling proteins or (3) an effect on lymphangiogenesis and angiogenesis [211–215]. While macrophages are the main source of IL-1 $\beta$  secretion in the immune response to pathogen [226–228], the TME of established tumors is characterized by an immunosuppression dominated by a M2 alternatively activated TAM phenotype that inhibits NLRP3-dependent IL-1 $\beta$  secretion [229]. Consistently, reduced NLRP3-dependent IL-1 $\beta$  secretion is observed in AMs isolated from the bronchoalveolar lavage of lung cancer patients despite a systemic higher NLRP3 inflammasome activation and IL-1 $\beta$  secretion in peripheral blood leukocytes from these patients [230,231]. Thus, the elevated IL-1 $\beta$  concentration in TME [232] could either derive directly from oncogenic lung cancer cells [233] or eventually from another TAM population (i.e., infiltrated MoTAMs) [230]. In the first scenario, combination of canakinumab with anti-PD-1 therapy, as initiated in phase I trial, may be beneficial by dual targeting of cancer and immune cells. However, in the second scenario, outcomes may be mitigated depending on the stage of tumor development and how suppression of an inflammatory response by canakinumab affect the antitumoral anti-PD-1 therapy response [211–215].

### 5.3. Immunometabolism: The Missing Link?

As discussed above, the origin of the tumor immunosuppression could be in part mediated by the hypoxia and acidosis within the TME [147,148], the metabolic restriction imposed by the high energy demand of the tumor [153] or an epigenetic reprogramming of immune cells [160], all these mechanisms being intimately linked to IL-1 $\beta$  secretion [226,234]. However, whether, where and how IL-1 $\beta$  secretion and potentially the activation of the NLRP3 or other inflammasomes could occur in tumor tissues remain elusive. At least, IL-1 $\beta$  secretion in macrophages must be primed by HIF1 $\alpha$  and nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)-dependent transcriptional regulation prior cleavage of pro-IL-1 $\beta$  into active IL-1 $\beta$  by caspase 1 [234,235]. Although historically, hypoxia was seen as a main driver of the activation of HIF1 $\alpha$  and the expression of glycolytic enzymes to support an anaerobic glycolysis, it has become apparent that other metabolic stimuli can cause HIF1 $\alpha$ -dependent metabolic reprogramming, especially in macrophages [59,62]. Are there such metabolic stimuli driving macrophage IL-1 $\beta$  priming in the heterogeneous lung TME [139,156]? As discussed above HIF1 $\alpha$  can be stabilized under acidic conditions in TAMs [147]. So, could we envision that IL-1 $\beta$  secretion is dictated by acidosis in TAMs [236]? What we have learned from in vitro studies is that a broken TCA cycle with a concomitant reduction in mitochondrial respiration allows for funneling citrate and succinate out of the mitochondria where succinate acts as an activator of HIF1 $\alpha$  turning on the transcriptional expression of pro-IL-1 $\beta$  [237]. Itaconate, one of the most highly induced metabolites in response to pathogens, could be responsible for the upstream regulation of succinate at least in activated macrophages [238]. Thus, it may not be surprising that succinate and itaconate also mediates crosstalk between macrophage metabolism and tumor growth [239,240]. In parallel, perturbed mitochondria metabolism could provide the second signal for proper activation of the inflammasome and subsequent cleavage of pro-IL-1 $\beta$  into active IL-1 $\beta$  by caspase 1 including mitochondrial DNA (mtDNA), calcium and ROS (mROS) among other stimuli [241]. Thus, future studies are warranted to delineate the metabolic communication between cancer cells and macrophages and how it specifically shapes the tumor immune microenvironment response.

## 6. Lung Adenocarcinoma Treatment and Macrophage Interaction

### 6.1. Lung Cancer Therapy Options

In recent years, treatments for all the different hallmarks of cancer have been investigated including anti-proliferative therapies (i.e., tyrosine kinase receptor, cyclin-dependent kinase or growth factor receptor inhibitors), pro-apoptotic therapies (i.e., mitochondrial cell death activation, blockade of DNA repair or telomere destabilization) or anti-angiogenic therapies to limit tumor growth and metastasis [82]. In the context of NSCLC, targeted therapies have been embraced thanks to genetic testing [242]. Targeted therapies prior cytotoxic chemotherapies include EGFR antagonists (i.e., tyrosine kinase inhibitors such as erlotinib, gefitinib, afatinib, necitumumab or osimertinib) for patients harboring an EGFR mutation [243–248], ALK inhibitors (i.e., ceritinib, alectinib or crizotinib) for ALK-rearranged NSCLC patients [249] or c-Met inhibitors (i.e., c-Met tyrosine kinase receptor inhibitors) for ALK/c-Met positive NSCLC (Figure 3) [250]. Details on these current therapies are deeply reviewed elsewhere [249–251]. However, the majority of lung tumors do not contain identified oncogenic mutations, thereby limiting the use of targeted oncogenic pathway inhibitors to a small fraction of patients (Figure 3). Moreover, no highly effective therapies have been developed for cancers harboring mutant KRAS. For instance, lung cancer patients who are positive for KRAS mutation have a low response rate to EGF tyrosine kinase receptor in part because KRAS and EGFR mutations are generally mutually exclusive and when they co-exist, KRAS mutations may confer resistance to EGFR mutations [4]. Thus, there continues to be a great need for new therapeutic strategies for patients with lung adenocarcinoma. Although several groups have demonstrated that concomitant use of MEK and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitors (MEKi/PI3Ki) can induce dramatic tumor regressions in mouse models of KRAS-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC), clinical trials investigating this strategy have been underwhelming [252,253] most likely because of heterogeneity in induction of cancer cell apoptosis [254]. By determining anti-apoptotic addiction, novel BH3-mimetic compounds have been developed to overwhelm anti-apoptotic defense mechanisms in response to oncogenic stress or anti-cancer therapy and a recent study revealed that this treatment could synergize with chemotherapy to induce tumor regression in *Kras*<sup>G12D</sup> mutant lung cancer mouse model [255]. Clinical trials evaluating safety and efficacy of this approach are currently ongoing [252]. Although clinical trials using telomerase inhibitors in NSCLC patients found that overall survival was not improved and this treatment may even causes some adverse decrease in platelet counts [256], they might still be effective in some tumor types (i.e., subgroup of patients with shortened telomers) [257,258] as it was recently observed in preclinical mouse models bearing the *Kras*<sup>G12D</sup> oncogenic mutation [259]. Some drug resistant NSCLC cells could also be sensitized by epigenetic drugs to other cytotoxic drugs [260]. As novel molecular mechanisms of cell death emerge [261], pro-apoptotic therapies may find its path to fight NSCLC, especially KRAS-bearing mutations. Nevertheless, these therapies will have to face drug resistance and find their way within immune checkpoint inhibitors that are increasingly being incorporated into lung cancer treatment protocols.

### 6.2. Emerging Immunotherapy

New paradigms such as targeting tumor immune microenvironments have been tested [262] and from this research, immune checkpoint inhibitors have emerged in the last decade has a new means to treat human cancer. In the context of NSCLC, immunotherapy (i.e., anti-programmed death-1 (PD-1) antibodies such as pembrolizumab or nivolumab and anti-programmed death ligand-1 (PD-L1) antibodies including atezolizumab, durvalumab and avelumab) was used for PD-L1 expression in at least 50% of tumor biopsies (Figure 3) [263–266]. In preclinical and clinical studies, combined anti-PD-L1 and anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) monoclonal antibodies may result in higher and more durable responses [267,268]. Even though immune checkpoint inhibitors (anti-CTLA-4 and PD-1/PD-L1 antibodies) have signaled a new direction for lung cancer care, the proportion of patients that respond to these agents remains low and the duration of response is often short [4].

Apart from loss of mismatch-repair function of cancer cells [269], driver mutations could also dampen immune checkpoint blockage by shaping TME. For instance, heterogeneity of intratumor neoantigen or EMT could predict sensitivity to immune checkpoint blockage [270,271] and inactivation of the tumor suppressor liver kinase B1 (LKB1), occurring in one-third of KRAS-mutated lung adenocarcinoma promotes the accumulation of immunosuppressive neutrophils and loss of PD-L1 expression, which is associated with fewer cytotoxic lymphocytes responsible for killing the tumor [272]. Therefore, novel methodologies to enhance the efficacy of immunotherapy in lung cancer are highly desirable.

### 6.3. TAMs and Lung Cancer Therapy Responses

The mechanisms by which TAMs could inhibit antitumor T cell responses involve more than one mechanism. First, TAMs have “tissue-reparative” activity, particularly M2-like macrophages that support tissue remodeling but at the same time suppress type 1 immune response [273]. Indeed, TAMs could inhibit antitumor T cell responses by secreting various factors including interleukin-10, which prevent dendritic cells from activating antitumor T-cell responses [274] or migration inhibitory factor (MIF), TGF- $\beta$  and amino-acid degrading enzymes such as ARG1 and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1), which promote survival of a subset of anti-inflammatory regulatory T-cells (Figure 2, left panel) [147,274–277]. The influx of new TAMs to tumors after first chemotherapy could also suppress the cytotoxic activity of antimetabolic agents and stimulate tumor relapse [278,279], although they can in some cases be required for optimal therapy [280]. The group of Pittet identified an anti-PD-1 steal mechanism by TAMs which depends on Fc $\gamma$ RIIb/III receptors and limits binding and activation to tumor-killing T-cells (Figure 3) [281]. Interestingly, PD-L1 and PD-1 expression by TAMs also inhibits phagocytosis and tumor immunity revealing that immune checkpoint therapy functions through a direct effect on macrophage effector functions (Figure 2, left panel) [282,283]. Recently, the specific enrichment of M2-like CD163<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>PDL-1<sup>+</sup> TAMs was associated with paradoxical boost in tumor growth in patients treated with immunotherapy, a phenomenon referred as “hyperprogression” [284]. Thus, TAMs may limit anti-PD-1 and other therapies by different means both in mice and humans. Altogether, these findings open substantial perspectives for improving immunotherapy efficacy including the combinations with strategies aimed at reeducating TAMs to limit their immunosuppressive functions or drug clearance capacity and help them eat cancer cells.

## 7. Conclusions

We have entered an exciting era of precision medicine with novel genetic and imaging modalities that should help to better stratify patient populations for which a battery of novel checkpoint blockade therapies will become available. Characterization of TME, especially its immune component, has provided an undoubted value to our understanding of cancer development. Emerging evidences suggest that targeting macrophages and their metabolic reprogramming may have great therapeutic potential. Although, many large questions remain, there is no doubt that human clinical studies and the recent success of the CANTOS trial using an IL-1 $\beta$  inhibitory antibody will pave the way to the investigation of novel approaches to targeting not only traditional checkpoint blockade therapies but also immune checkpoint therapies to fight the residual burden of unmet need of NSCLC patients.

**Funding:** This work was supported by grants from the Inserm Atip-Avenir program, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE12-0017-01), the European Marie Curie Career Integration Grant (CIG-630926), the Fondation ARC (ARC-R14027AA), and the European Research Council (ERC) consolidator program (ERC2016COG724838) to L.Y.-C.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Travis, W.D.; Brambilla, E.; Nicholson, A.G.; Yatabe, Y.; Austin, J.H.M.; Beasley, M.B.; Chirieac, L.R.; Dacic, S.; Duhig, E.; Flieder, D.B.; et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J. Thorac. Oncol.* **2015**, *10*, 1243–1260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Siegel, R.; Naishadham, D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* **2012**, *62*, 10–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Herbst, R.S.; Morgensztern, D.; Boshoff, C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* **2018**, *553*, 446–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lewis, C.E.; Harney, A.S.; Pollard, J.W. The Multifaceted Role of Perivascular Macrophages in Tumors. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 18–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Yang, M.; McKay, D.; Pollard, J.W.; Lewis, C.E. Diverse Functions of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 5492–5503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Fridman, W.H.; Pagès, F.; Sautès-Fridman, C.; Galon, J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 298–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Remark, R.; Becker, C.; Gomez, J.E.; Damotte, D.; Dieu-Nosjean, M.-C.; Sautès-Fridman, C.; Fridman, W.-H.; Powell, C.A.; Altorki, N.K.; Merad, M.; et al. The Non-Small Cell Lung Cancer Immune Contexture. A Major Determinant of Tumor Characteristics and Patient Outcome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2015**, *191*, 377–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Schupp, J.; Krebs, F.K.; Zimmer, N.; Trzeciak, E.; Schuppan, D.; Tuettenberg, A. Targeting myeloid cells in the tumor sustaining microenvironment. *Cell Immunol.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Binnewies, M.; Roberts, E.W.; Kersten, K.; Chan, V.; Fearon, D.F.; Merad, M.; Coussens, L.M.; Gaborit, D.I.; Ostrand-Rosenberg, S.; Hedrick, C.C.; et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 541–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Poh, A.R.; Ernst, M. Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Front. Oncol.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Gordon, S.; Taylor, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 953–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Glass, C.K.; Natoli, G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 26–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Tall, A.R.; Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 104–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Koelwyn, G.J.; Corr, E.M.; Erbay, E.; Moore, K.J. Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 526–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 36–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Han, C.Z.; Ravichandran, K.S. Metabolic connections during apoptotic cell engulfment. *Cell* **2011**, *147*, 1442–1445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Gautier, E.L.; Yvan-Charvet, L. Understanding macrophage diversity at the ontogenic and transcriptomic levels. *Immunol. Rev.* **2014**, *262*, 85–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ginhoux, F.; Guilliams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **2016**, *44*, 439–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wynn, T.A.; Chawla, A.; Pollard, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **2013**, *496*, 445–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Conway, E.M.; Pikor, L.A.; Kung, S.H.Y.; Hamilton, M.J.; Lam, S.; Lam, W.L.; Bennewith, K.L. Macrophages, Inflammation, and Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *193*, 116–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Grivnickov, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **2010**, *140*, 883–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cortez-Retamozo, V.; Eitzrodt, M.; Newton, A.; Ryan, R.; Pucci, F.; Sio, S.W.; Kuswanto, W.; Rauch, P.J.; Chudnovskiy, A.; Iwamoto, Y.; et al. Angiotensin II drives the production of tumor-promoting macrophages. *Immunity* **2013**, *38*, 296–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chen, Z.; Feng, X.; Herting, C.J.; Garcia, V.A.; Nie, K.; Pong, W.W.; Rasmussen, R.; Dwivedi, B.; Seby, S.; Wolf, S.A.; et al. Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2266–2278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Zhu, Y.; Herndon, J.M.; Sojka, D.K.; Kim, K.-W.; Knolhoff, B.L.; Zuo, C.; Cullinan, D.R.; Luo, J.; Bearden, A.R.; Lavine, K.J.; et al. Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity* **2017**, *47*, 323–338.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Qian, B.-Z.; Li, J.; Zhang, H.; Kitamura, T.; Zhang, J.; Campion, L.R.; Kaiser, E.A.; Snyder, L.A.; Pollard, J.W. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **2011**, *475*, 222–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Van Furth, R. The Origin and Kinetics of Mononuclear Phagocytes. *J. Exp. Med.* **1968**, *128*, 415–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Cogle, J.E.; Tarling, J.D. The Proliferation Kinetics of Pulmonary Alveolar Macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **1984**, *35*, 317–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Sawyer, R.T. The Ontogeny of Pulmonary Alveolar Macrophages in Parabolic Mice. *J. Leukoc. Biol.* **1986**, *40*, 347–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Ginhoux, F.; Greter, M.; Leboeuf, M.; Nandi, S.; See, P.; Gokhan, S.; Mehler, M.F.; Conway, S.J.; Ng, L.G.; Stanley, E.R.; et al. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* **2010**, *330*, 841–845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Schulz, C.; Gomez Perdiguero, E.; Chorro, L.; Szabo-Rogers, H.; Cagnard, N.; Kierdorf, K.; Prinz, M.; Wu, B.; Jacobsen, S.E.W.; Pollard, J.W.; et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **2012**, *336*, 86–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Yona, S.; Kim, K.-W.; Wolf, Y.; Mildner, A.; Varol, D.; Breker, M.; Strauss-Ayali, D.; Viukov, S.; Guilliams, M.; Misharin, A.; et al. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* **2013**, *38*, 79–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hashimoto, D.; Chow, A.; Noizat, C.; Teo, P.; Beasley, M.B.; Leboeuf, M.; Becker, C.D.; See, P.; Price, J.; Lucas, D.; et al. Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity* **2013**, *38*, 792–804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gomez Perdiguero, E.; Klapproth, K.; Schulz, C.; Busch, K.; Azzoni, E.; Crozet, L.; Garner, H.; Trouillet, C.; de Bruijn, M.F.; Geissmann, F.; et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **2015**, *518*, 547–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Geissmann, F.; Manz, M.G.; Jung, S.; Sieweke, M.H.; Merad, M.; Ley, K. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* **2010**, *327*, 656–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sheng, J.; Ruedl, C.; Karjalainen, K. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* **2015**, *43*, 382–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Laskin, D.L.; Sunil, V.R.; Gardner, C.R.; Laskin, J.D. Macrophages and Tissue Injury: Agents of Defense or Destruction? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2011**, *51*, 267–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Westphalen, K.; Gusarova, G.A.; Islam, M.N.; Subramanian, M.; Cohen, T.S.; Prince, A.S.; Bhattacharya, J. Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature* **2014**, *506*, 503–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Guilliams, M.; Lambrecht, B.N.; Hammad, H. Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal Immunol.* **2013**, *6*, 464–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Kopf, M.; Schneider, C.; Nobs, S.P. The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 36–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Hussell, T.; Bell, T.J. Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context. *Nat. Rev. Immunol.* **2014**, *14*, 81–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Guilliams, M.; De Kleer, I.; Henri, S.; Post, S.; Vanhoutte, L.; De Prijck, S.; Deswarte, K.; Malissen, B.; Hammad, H.; Lambrecht, B.N. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 1977–1992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yu, X.; Buttgerit, A.; Lelios, I.; Utz, S.G.; Cansever, D.; Becher, B.; Greter, M. The Cytokine TGF- $\beta$  Promotes the Development and Homeostasis of Alveolar Macrophages. *Immunity* **2017**, *47*, 903–912.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Tan, S.Y.S.; Krasnow, M.A. Developmental origin of lung macrophage diversity. *Dev. Camb. Engl.* **2016**, *143*, 1318–1327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Gibbings, S.L.; Thomas, S.M.; Atif, S.M.; McCubbrey, A.L.; Desch, A.N.; Danhorn, T.; Leach, S.M.; Bratton, D.L.; Henson, P.M.; Janssen, W.J.; et al. Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2017**, *57*, 66–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Liegeois, M.; Legrand, C.; Desmet, C.J.; Marichal, T.; Bureau, F. The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. *Cell Immunol.* **2018**, *330*, 91–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Sabatel, C.; Radermecker, C.; Fievez, L.; Paulissen, G.; Chakarov, S.; Fernandes, C.; Olivier, S.; Toussaint, M.; Pirotin, D.; Xiao, X.; et al. Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity* **2017**, *46*, 457–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Schyns, J.; Bureau, F.; Marichal, T. Lung Interstitial Macrophages: Past, Present, and Future. *J. Immunol. Res.* **2018**, *2018*, 5160794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Rodero, M.P.; Poupel, L.; Loyher, P.-L.; Hamon, P.; Licata, F.; Pessel, C.; Hume, D.A.; Combadière, C.; Boissonnas, A. Immune surveillance of the lung by migrating tissue monocytes. *eLife* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. McCubbrey, A.L.; Allison, K.C.; Lee-Sherick, A.B.; Jakubzick, C.V.; Janssen, W.J. Promoter Specificity and Efficacy in Conditional and Inducible Transgenic Targeting of Lung Macrophages. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Gautier, E.L.; Shay, T.; Miller, J.; Greter, M.; Jakubzick, C.; Ivanov, S.; Helft, J.; Chow, A.; Elpek, K.G.; Gordonov, S.; et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 1118–1128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Gosselin, D.; Link, V.M.; Romanoski, C.E.; Fonseca, G.J.; Eichenfield, D.Z.; Spann, N.J.; Stender, J.D.; Chun, H.B.; Garner, H.; Geissmann, F.; et al. Environment Drives Selection and Function of Enhancers Controlling Tissue-Specific Macrophage Identities. *Cell* **2014**, *159*, 1327–1340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Lavin, Y.; Winter, D.; Blecher-Gonen, R.; David, E.; Keren-Shaul, H.; Merad, M.; Jung, S.; Amit, I. Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell* **2014**, *159*, 1312–1326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Mills, C.D.; Kincaid, K.; Alt, J.M.; Heilman, M.J.; Hill, A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 6166–6173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Mosser, D.M.; Edwards, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 958–969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Murray, P.J.; Allen, J.E.; Biswas, S.K.; Fisher, E.A.; Gilroy, D.W.; Goerdt, S.; Gordon, S.; Hamilton, J.A.; Ivashkiv, L.B.; Lawrence, T.; et al. Macrophage activation and polarization: Nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **2014**, *41*, 14–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Misharin, A.V.; Morales-Nebreda, L.; Reyfman, P.A.; Cuda, C.M.; Walter, J.M.; McQuattie-Pimentel, A.C.; Chen, C.-I.; Anekalla, K.R.; Joshi, N.; Williams, K.J.N.; et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 2387–2404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Reyfman, P.A.; Washko, G.R.; Dransfield, M.T.; Spira, A.; Han, M.K.; Kalhan, R. Defining Impaired Respiratory Health. A Paradigm Shift for Pulmonary Medicine. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2018**, *198*, 440–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Artyomov, M.N.; Sergushichev, A.; Schilling, J.D. Integrating immunometabolism and macrophage diversity. *Semin. Immunol.* **2016**, *28*, 417–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. O'Neill, L.A.J.; Pearce, E.J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J. Exp. Med.* **2016**, *213*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Murphy, M.P.; O'Neill, L.A.J. Krebs Cycle Reimagined: The Emerging Roles of Succinate and Itaconate as Signal Transducers. *Cell* **2018**, *174*, 780–784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Domínguez-Andrés, J.; Joosten, L.A.; Netea, M.G. Induction of innate immune memory: The role of cellular metabolism. *Curr. Opin. Immunol.* **2018**, *56*, 10–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Trapnell, B.C.; Whitsett, J.A. Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu. Rev. Physiol.* **2002**, *64*, 775–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Baker, A.D.; Malur, A.; Barna, B.P.; Ghosh, S.; Kavuru, M.S.; Malur, A.G.; Thomassen, M.J. Targeted PPAR $\gamma$  deficiency in alveolar macrophages disrupts surfactant catabolism. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 1325–1331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Schneider, C.; Nobs, S.P.; Kurrer, M.; Rehrauer, H.; Thiele, C.; Kopf, M. Induction of the nuclear receptor PPAR $\gamma$  by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 1026–1037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

66. Gautier, E.L.; Chow, A.; Spanbroek, R.; Marcelin, G.; Greter, M.; Jakubzick, C.; Bogunovic, M.; Leboeuf, M.; van Rooijen, N.; Habenicht, A.J.; et al. Systemic analysis of PPAR $\gamma$  in mouse macrophage populations reveals marked diversity in expression with critical roles in resolution of inflammation and airway immunity. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 2614–2624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Yao, Y.; Jeyanathan, M.; Haddadi, S.; Barra, N.G.; Vaseghi-Shanjani, M.; Damjanovic, D.; Lai, R.; Afkhami, S.; Chen, Y.; Dvorkin-Gheva, A.; et al. Induction of Autonomous Memory Alveolar Macrophages Requires T Cell Help and Is Critical to Trained Immunity. *Cell* **2018**, *175*, 1634–1650.e17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Bekkering, S.; Arts, R.J.W.; Novakovic, B.; Kourtzelis, I.; van der Heijden, C.D.C.C.; Li, Y.; Popa, C.D.; Ter Horst, R.; van Tuijl, J.; Netea-Maier, R.T.; et al. Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway. *Cell* **2018**, *172*, 135–146.e9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Toussaint, M.; Fievez, L.; Drion, P.-V.; Cataldo, D.; Bureau, F.; Lekeux, P.; Desmet, C.J. Myeloid hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  prevents airway allergy in mice through macrophage-mediated immunoregulation. *Mucosal Immunol.* **2013**, *6*, 485–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Pugliese, S.C.; Kumar, S.; Janssen, W.J.; Graham, B.B.; Frid, M.G.; Riddle, S.R.; Kasmi, K.C.E.; Stenmark, K.R. A Time- and Compartment-Specific Activation of Lung Macrophages in Hypoxic Pulmonary Hypertension. *J. Immunol.* **2017**, *198*, 4802–4812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Maci, E.; Comito, F.; Frezza, A.M.; Tonini, G.; Pezzuto, A. Lung nodule and functional changes in smokers after smoking cessation short-term treatment. *Cancer Investig.* **2014**, *32*, 388–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Demirjian, L.; Abboud, R.T.; Li, H.; Duronio, V. Acute effect of cigarette smoke on TNF-alpha release by macrophages mediated through the erk1/2 pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1762*, 592–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Aoshiba, K.; Tamaoki, J.; Nagai, A. Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2001**, *281*, L1392–L1401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Tonini, G.; D’Onofrio, L.; Dell’Aquila, E.; Pezzuto, A. New molecular insights in tobacco-induced lung cancer. *Future Oncol.* **2013**, *9*, 649–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Shacter, E.; Weitzman, S.A. Chronic inflammation and cancer. *Oncology* **2002**, *16*, 217–226. [[PubMed](#)]
76. Moghaddam, S.J.; Li, H.; Cho, S.-N.; Dishop, M.K.; Wistuba, I.I.; Ji, L.; Kurie, J.M.; Dickey, B.F.; DeMayo, F.J. Promotion of Lung Carcinogenesis by Chronic Obstructive Pulmonary Disease–Like Airway Inflammation in a K-ras–Induced Mouse Model. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2009**, *40*, 443–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. GBD 2017 SDG Collaborators. Measuring progress from 1990 to 2017 and projecting attainment to 2030 of the health-related Sustainable Development Goals for 195 countries and territories: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, *392*, 2091–2138. [[CrossRef](#)]
78. Barnes, P.J.; Burney, P.G.J.; Silverman, E.K.; Celli, B.R.; Vestbo, J.; Wedzicha, J.A.; Wouters, E.F.M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2015**, *1*, 15076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Wouters, E.F.M. Obesity and Metabolic Abnormalities in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2017**, *14*, S389–S394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Dostert, C.; Pétrilli, V.; Van Bruggen, R.; Steele, C.; Mossman, B.T.; Tschopp, J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **2008**, *320*, 674–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Cassel, S.L.; Eisenbarth, S.C.; Iyer, S.S.; Sadler, J.J.; Colegio, O.R.; Tephly, L.A.; Carter, A.B.; Rothman, P.B.; Flavell, R.A.; Sutterwala, F.S. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9035–9040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Balkwill, F.; Mantovani, A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet* **2001**, *357*, 539–545. [[CrossRef](#)]
84. Bowman, R.L.; Klemm, F.; Akkari, L.; Pyonteck, S.M.; Sevenich, L.; Quail, D.F.; Dhara, S.; Simpson, K.; Gardner, E.E.; Iacobuzio-Donahue, C.A.; et al. Macrophage Ontogeny Underlies Differences in Tumor-Specific Education in Brain Malignancies. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 2445–2459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Loyher, P.-L.; Hamon, P.; Laviron, M.; Meghraoui-Kheddar, A.; Goncalves, E.; Deng, Z.; Torstensson, S.; Bercovici, N.; Baudesson de Chanville, C.; Combadière, B.; et al. Macrophages of distinct origins contribute to tumor development in the lung. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 2536–2553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Lavin, Y.; Kobayashi, S.; Leader, A.; Amir, E.D.; Elefant, N.; Bigenwald, C.; Remark, R.; Sweeney, R.; Becker, C.D.; Levine, J.H.; et al. Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell* **2017**, *169*, 750–765.e17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

87. Merino Salvador, M.; Gómez de Cedrón, M.; Moreno Rubio, J.; Falagán Martínez, S.; Sánchez Martínez, R.; Casado, E.; Ramírez de Molina, A.; Sereno, M. Lipid metabolism and lung cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2017**, *112*, 31–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Taguchi, A.; Politi, K.; Pitteri, S.J.; Lockwood, W.W.; Faça, V.M.; Kelly-Spratt, K.; Wong, C.-H.; Zhang, Q.; Chin, A.; Park, K.-S.; et al. Lung Cancer Signatures in Plasma Based on Proteome Profiling of Mouse Tumor Models. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 289–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Sin, D.D.; Tammemagi, C.M.; Lam, S.; Barnett, M.J.; Duan, X.; Tam, A.; Auman, H.; Feng, Z.; Goodman, G.E.; Hanash, S.; et al. Pro-surfactant protein B as a biomarker for lung cancer prediction. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 4536–4543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Wikoff, W.R.; Hanash, S.; DeFelice, B.; Miyamoto, S.; Barnett, M.; Zhao, Y.; Goodman, G.; Feng, Z.; Gandara, D.; Fiehn, O.; et al. Diacetylspermine is a Novel Prediagnostic Serum Biomarker for Non-Small-Cell Lung Cancer has Additive Performance with Pro-Surfactant Protein, B. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 3880–3886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Carus, A.; Ladekarl, M.; Hager, H.; Pilegaard, H.; Nielsen, P.S.; Donskov, F. Tumor-associated neutrophils and macrophages in non-small cell lung cancer: No immediate impact on patient outcome. *Lung Cancer* **2013**, *81*, 130–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Wu, P.; Wu, D.; Zhao, L.; Huang, L.; Chen, G.; Shen, G.; Huang, J.; Chai, Y. Inverse role of distinct subsets and distribution of macrophage in lung cancer prognosis: A meta-analysis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 40451–40460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Biswas, S.K.; Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 889–896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Cortez-Retamozo, V.; Etzrodt, M.; Newton, A.; Rauch, P.J.; Chudnovskiy, A.; Berger, C.; Ryan, R.J.H.; Iwamoto, Y.; Marinelli, B.; Gorbатов, R.; et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 2491–2496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Franklin, R.A.; Liao, W.; Sarkar, A.; Kim, M.V.; Bivona, M.R.; Liu, K.; Pamer, E.G.; Li, M.O. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* **2014**, *344*, 921–925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Nagarsheth, N.; Wicha, M.S.; Zou, W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 559–572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. D’Agostino, G.; Cecchinato, V.; Uguccioni, M. Chemokine Heterocomplexes and Cancer: A Novel Chapter to Be Written in Tumor Immunity. *Front. Immunol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Susek, K.H.; Karvouni, M.; Alici, E.; Lundqvist, A. The Role of CXC Chemokine Receptors 1-4 on Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Loberg, R.D.; Ying, C.; Craig, M.; Day, L.L.; Sargent, E.; Neeley, C.; Wojno, K.; Snyder, L.A.; Yan, L.; Pienta, K.J. Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 9417–9424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Brana, I.; Calles, A.; LoRusso, P.M.; Yee, L.K.; Puchalski, T.A.; Seetharam, S.; Zhong, B.; de Boer, C.J.; Tabernero, J.; Calvo, E. Carlumab, an anti-C-C chemokine ligand 2 monoclonal antibody, in combination with four chemotherapy regimens for the treatment of patients with solid tumors: An open-label, multicenter phase 1b study. *Target. Oncol.* **2015**, *10*, 111–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Arakaki, R.; Yamasaki, T.; Kanno, T.; Shibasaki, N.; Sakamoto, H.; Utsunomiya, N.; Sumiyoshi, T.; Shibuya, S.; Tsuruyama, T.; Nakamura, E.; et al. CCL2 as a potential therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Med.* **2016**, *5*, 2920–2933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Nywening, T.M.; Wang-Gillam, A.; Sanford, D.E.; Belt, B.A.; Panni, R.Z.; Cusworth, B.M.; Toriola, A.T.; Nieman, R.K.; Worley, L.A.; Yano, M.; et al. Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: A single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 651–662. [[CrossRef](#)]
103. Linehan, D.; Noel, M.S.; Hezel, A.F.; Wang-Gillam, A.; Eskens, F.; Sleijfer, S.; Desar, I.M.E.; Erdkamp, F.; Wilmink, J.; Diehl, J.; et al. Overall survival in a trial of orally administered CCR2 inhibitor CCX872 in locally advanced/metastatic pancreatic cancer: Correlation with blood monocyte counts. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 92. [[CrossRef](#)]

104. Phillips, R.J.; Burdick, M.D.; Lutz, M.; Belperio, J.A.; Keane, M.P.; Strieter, R.M. The Stromal Derived Factor-1/CXCL12–CXC Chemokine Receptor 4 Biological Axis in Non–Small Cell Lung Cancer Metastases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2003**, *167*, 1676–1686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Miao, Z.; Luker, K.E.; Summers, B.C.; Berahovich, R.; Bhojani, M.S.; Rehemtulla, A.; Kleer, C.G.; Essner, J.J.; Nasevicius, A.; Luker, G.D.; et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15735–15740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Wald, O. CXCR4 Based Therapeutics for Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *J. Clin. Med.* **2018**, *7*, 303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Hanna, R.N.; Cekic, C.; Sag, D.; Tacke, R.; Thomas, G.D.; Nowyhed, H.; Herrley, E.; Rasquinha, N.; McArdle, S.; Wu, R.; et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science* **2015**, *350*, 985–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Hu, P.; Shen, H.; Wang, G.; Zhang, P.; Liu, Q.; Du, J. Prognostic significance of systemic inflammation-based lymphocyte- monocyte ratio in patients with lung cancer: Based on a large cohort study. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Sarraf, K.M.; Belcher, E.; Raevsky, E.; Nicholson, A.G.; Goldstraw, P.; Lim, E. Neutrophil/lymphocyte ratio and its association with survival after complete resection in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2009**, *137*, 425–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Zhang, J.; Huang, S.-H.; Li, H.; Li, Y.; Chen, X.-L.; Zhang, W.-Q.; Chen, H.-G.; Gu, L.-J. Preoperative lymphocyte count is a favorable prognostic factor of disease-free survival in non-small-cell lung cancer. *Med. Oncol.* **2013**, *30*, 352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Kobayashi, N.; Usui, S.; Kikuchi, S.; Goto, Y.; Sakai, M.; Onizuka, M.; Sato, Y. Preoperative lymphocyte count is an independent prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2012**, *75*, 223–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Botta, C.; Barbieri, V.; Ciliberto, D.; Rossi, A.; Rocco, D.; Addeo, R.; Staropoli, N.; Pastina, P.; Marvaso, G.; Martellucci, I.; et al. Systemic inflammatory status at baseline predicts bevacizumab benefit in advanced non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biol. Ther.* **2013**, *14*, 469–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Zhang, J.; Yao, H.; Song, G.; Liao, X.; Xian, Y.; Li, W. Regulation of epithelial-mesenchymal transition by tumor-associated macrophages in cancer. *Am. J. Transl. Res.* **2015**, *7*, 1699–1711. [[PubMed](#)]
114. Song, W.; Mazzieri, R.; Yang, T.; Gobe, G.C. Translational Significance for Tumor Metastasis of Tumor-Associated Macrophages and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Lambrechts, D.; Wauters, E.; Boeckx, B.; Aibar, S.; Nittner, D.; Burton, O.; Bassez, A.; Decaluwé, H.; Pircher, A.; Van den Eynde, K.; et al. Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1277–1289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Sun, L.; Chen, B.; Jiang, R.; Li, J.; Wang, B. Resveratrol inhibits lung cancer growth by suppressing M2-like polarization of tumor associated macrophages. *Cell Immunol.* **2017**, *311*, 86–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Kaneda, M.M.; Messer, K.S.; Ralainirina, N.; Li, H.; Leem, C.J.; Gorjestani, S.; Woo, G.; Nguyen, A.V.; Figueiredo, C.C.; Foubert, P.; et al. PI3K $\gamma$  is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature* **2016**, *539*, 437–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Yu, H.; Kortylewski, M.; Pardoll, D. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 41–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. DeNardo, D.G.; Barreto, J.B.; Andreu, P.; Vasquez, L.; Tawfik, D.; Kolhatkar, N.; Coussens, L.M. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* **2009**, *16*, 91–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Gocheva, V.; Wang, H.-W.; Gadea, B.B.; Shree, T.; Hunter, K.E.; Garfall, A.L.; Berman, T.; Joyce, J.A. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 241–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Pello, O.M.; Andrés, V. Role of c-MYC in tumor-associated macrophages and cancer progression. *Oncoimmunology* **2013**, *2*, e22984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Georgoudaki, A.-M.; Prokopec, K.E.; Boura, V.F.; Hellqvist, E.; Sohn, S.; Östling, J.; Dahan, R.; Harris, R.A.; Rantalainen, M.; Klevebring, D.; et al. Reprogramming Tumor-Associated Macrophages by Antibody Targeting Inhibits Cancer Progression and Metastasis. *Cell Rep.* **2016**, *15*, 2000–2011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Weissman, I. How One Thing Led to Another. *Annu. Rev. Immunol.* **2016**, *34*, 1–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

124. Weiskopf, K. Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRP $\alpha$  axis. *Eur. J. Cancer* **2017**, *76*, 100–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Ring, N.G.; Herndler-Brandstetter, D.; Weiskopf, K.; Shan, L.; Volkmer, J.-P.; George, B.M.; Lietzenmayer, M.; McKenna, K.M.; Naik, T.J.; McCarty, A.; et al. Anti-SIRP $\alpha$  antibody immunotherapy enhances neutrophil and macrophage antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E10578–E10585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Beatty, G.L.; Chiorean, E.G.; Fishman, M.P.; Saboury, B.; Teitelbaum, U.R.; Sun, W.; Huhn, R.D.; Song, W.; Li, D.; Sharp, L.L.; et al. CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* **2011**, *331*, 1612–1616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Dugger, S.A.; Platt, A.; Goldstein, D.B. Drug development in the era of precision medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 183–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Sharma, S.K.; Chintala, N.K.; Vadrevu, S.K.; Patel, J.; Karbowniczek, M.; Markiewski, M.M. Pulmonary alveolar macrophages contribute to the premetastatic niche by suppressing antitumor T cell responses in the lungs. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 5529–5538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Zhao, H.; Wang, J.; Kong, X.; Li, E.; Liu, Y.; Du, X.; Kang, Z.; Tang, Y.; Kuang, Y.; Yang, Z.; et al. CD47 Promotes Tumor Invasion and Metastasis in Non-small Cell Lung Cancer. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Zhang, X.; Kim, S.; Hundal, J.; Herndon, J.M.; Li, S.; Petti, A.A.; Soysal, S.D.; Li, L.; McLellan, M.D.; Hoog, J.; et al. Breast Cancer Neoantigens Can Induce CD8+ T-Cell Responses and Antitumor Immunity. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, *5*, 516–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Liu, L.; Zhang, L.; Yang, L.; Li, H.; Li, R.; Yu, J.; Yang, L.; Wei, F.; Yan, C.; Sun, Q.; et al. Anti-CD47 Antibody as a Targeted Therapeutic Agent for Human Lung Cancer and Cancer Stem Cells. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Dang, C.V.; Kim, J.-W. Convergence of Cancer Metabolism and Immunity: An Overview. *Biomol. Ther.* **2018**, *26*, 4–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Netea-Maier, R.T.; Smit, J.W.A.; Netea, M.G. Metabolic changes in tumor cells and tumor-associated macrophages: A mutual relationship. *Cancer Lett.* **2018**, *413*, 102–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029–1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Maki, Y.; Soh, J.; Ichimura, K.; Shien, K.; Furukawa, M.; Muraoka, T.; Tanaka, N.; Ueno, T.; Yamamoto, H.; Asano, H.; et al. Impact of GLUT1 and Ki-67 expression on early-stage lung adenocarcinoma diagnosed according to a new international multidisciplinary classification. *Oncol. Rep.* **2013**, *29*, 133–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Osugi, J.; Yamaura, T.; Muto, S.; Okabe, N.; Matsumura, Y.; Hoshino, M.; Higuchi, M.; Suzuki, H.; Gotoh, M. Prognostic impact of the combination of glucose transporter 1 and ATP citrate lyase in node-negative patients with non-small lung cancer. *Lung Cancer* **2015**, *88*, 310–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Miao, P.; Sheng, S.; Sun, X.; Liu, J.; Huang, G. Lactate dehydrogenase A in cancer: A promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life* **2013**, *65*, 904–910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Pezzuto, A.; Carico, E. Role of HIF-1 in Cancer Progression: Novel Insights. A Review. *Curr. Mol. Med.* **2018**, *18*, 343–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Hensley, C.T.; Faubert, B.; Yuan, Q.; Lev-Cohain, N.; Jin, E.; Kim, J.; Jiang, L.; Ko, B.; Skelton, R.; Loudat, L.; et al. Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. *Cell* **2016**, *164*, 681–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Faubert, B.; Li, K.Y.; Cai, L.; Hensley, C.T.; Kim, J.; Zacharias, L.G.; Yang, C.; Do, Q.N.; Doucette, S.; Burguete, D.; et al. Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell* **2017**, *171*, 358–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Liu, Y.; Cao, Y.; Zhang, W.; Bergmeier, S.; Qian, Y.; Akbar, H.; Colvin, R.; Ding, J.; Tong, L.; Wu, S.; et al. A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 1672–1682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Suzuki, S.; Okada, M.; Takeda, H.; Kuramoto, K.; Sanomachi, T.; Togashi, K.; Seino, S.; Yamamoto, M.; Yoshioka, T.; Kitanaka, C. Involvement of GLUT1-mediated glucose transport and metabolism in gefitinib resistance of non-small-cell lung cancer cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 32667–32679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Xie, H.; Hanai, J.-I.; Ren, J.-G.; Kats, L.; Burgess, K.; Bhargava, P.; Signoretti, S.; Billiard, J.; Duffy, K.J.; Grant, A.; et al. Targeting lactate dehydrogenase—A inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 795–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

144. Siebeneicher, H.; Cleve, A.; Rehwinkel, H.; Neuhaus, R.; Heisler, I.; Müller, T.; Bauser, M.; Buchmann, B. Identification and Optimization of the First Highly Selective GLUT1 Inhibitor BAY-876. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 2261–2271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Shriwas, P.; Qian, Y.; Wang, X.; Roberts, D.; Bergmeier, S.; Chen, X. Abstract 2799: New-generation glucose transporter inhibitors targeting non-small cell lung cancer and triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 2799. [[CrossRef](#)]
146. Rani, R.; Kumar, V. When will small molecule lactate dehydrogenase inhibitors realize their potential in the cancer clinic? *Future Med. Chem.* **2017**, *9*, 1113–1115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. 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. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* **2014**, *513*, 559–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Imtiyaz, H.Z.; Williams, E.P.; Hickey, M.M.; Patel, S.A.; Durham, A.C.; Yuan, L.-J.; Hammond, R.; Gimotty, P.A.; Keith, B.; Simon, M.C. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 2699–2714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Obre, E.; Rossignol, R. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: Metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2015**, *59*, 167–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Vander Heiden, M.G.; DeBerardinis, R.J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **2017**, *168*, 657–669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Carmona-Fontaine, C.; Bucci, V.; Akkari, L.; Deforet, M.; Joyce, J.A.; Xavier, J.B. Emergence of spatial structure in the tumor microenvironment due to the Warburg effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Carmona-Fontaine, C.; Deforet, M.; Akkari, L.; Thompson, C.B.; Joyce, J.A.; Xavier, J.B. Metabolic origins of spatial organization in the tumor microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 2934–2939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Chang, C.-H.; Qiu, J.; O’Sullivan, D.; Buck, M.D.; Noguchi, T.; Curtis, J.D.; Chen, Q.; Gindin, M.; Gubin, M.M.; van der Windt, G.J.W.; et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment is a Driver of Cancer Progression. *Cell* **2015**, *162*, 1229–1241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Schreiber, R.; Xie, H.; Schweiger, M. Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Das, S.K.; Eder, S.; Schauer, S.; Diwoy, C.; Temmel, H.; Guertl, B.; Gorkiewicz, G.; Tamilarasan, K.P.; Kumari, P.; Trauner, M.; et al. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science* **2011**, *333*, 233–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Davidson, S.M.; Papagiannakopoulos, T.; Olenchock, B.A.; Heyman, J.E.; Keibler, M.A.; Luengo, A.; Bauer, M.R.; Jha, A.K.; O’Brien, J.P.; Pierce, K.A.; et al. Environment Impacts the Metabolic Dependencies of Ras-Driven Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 517–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Cantor, J.R.; Sabatini, D.M. Cancer cell metabolism: One hallmark, many faces. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 881–898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Corbet, C.; Feron, O. Tumour acidosis: From the passenger to the driver’s seat. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 577–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. DeBerardinis, R.J.; Chandel, N.S. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1600200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Guerriero, J.L.; Sotayo, A.; Ponichtera, H.E.; Castrillon, J.A.; Pourzia, A.L.; Schad, S.; Johnson, S.F.; Carrasco, R.D.; Lazo, S.; Bronson, R.T.; et al. Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour macrophages. *Nature* **2017**, *543*, 428–432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Rubio-Patiño, C.; Bossowski, J.P.; Donatis, G.M.D.; Mondragón, L.; Villa, E.; Aira, L.E.; Chiche, J.; Mhaidly, R.; Lebeaupin, C.; Marchetti, S.; et al. Low-Protein Diet Induces IRE1 $\alpha$ -Dependent Anticancer Immunosurveillance. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 828–842.e7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Orillion, A.; Damayanti, N.P.; Shen, L.; Adelaiye-Ogala, R.; Affronti, H.; Elbanna, M.; Chintala, S.; Ciesielski, M.; Fontana, L.; Kao, C.; et al. Dietary Protein Restriction Reprograms Tumor-Associated Macrophages and Enhances Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Wang, D.; Dubois, R.N. Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 181–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Beloribi-Djefalia, S.; Vasseur, S.; Guillaumond, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* **2016**, *5*, e189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

165. Pavlova, N.N.; Thompson, C.B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 27–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Poczubutt, J.M.; Gijon, M.; Amin, J.; Hanson, D.; Li, H.; Walker, D.; Weiser-Evans, M.; Lu, X.; Murphy, R.C.; Nemenoff, R.A. Eicosanoid Profiling in an Orthotopic Model of Lung Cancer Progression by Mass Spectrometry Demonstrates Selective Production of Leukotrienes by Inflammatory Cells of the Microenvironment. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e79633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Poczubutt, J.M.; De, S.; Yadav, V.K.; Nguyen, T.T.; Li, H.; Sippel, T.R.; Weiser-Evans, M.C.M.; Nemenoff, R.A. Expression Profiling of Macrophages Reveals Multiple Populations with Distinct Biological Roles in an Immunocompetent Orthotopic Model of Lung Cancer. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 2847–2859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Svensson, R.U.; Parker, S.J.; Eichner, L.J.; Kolar, M.J.; Wallace, M.; Brun, S.N.; Lombardo, P.S.; Van Nostrand, J.L.; Hutchins, A.; Vera, L.; et al. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 1108–1119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Ding, L.; Liang, G.; Yao, Z.; Zhang, J.; Liu, R.; Chen, H.; Zhou, Y.; Wu, H.; Yang, B.; He, Q. Metformin prevents cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of tumor associated macrophages. *Oncotarget* **2015**, *6*, 36441–36455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Chiang, C.-F.; Chao, T.-T.; Su, Y.-F.; Hsu, C.-C.; Chien, C.-Y.; Chiu, K.-C.; Shiah, S.-G.; Lee, C.-H.; Liu, S.-Y.; Shieh, Y.-S. Metformin-treated cancer cells modulate macrophage polarization through AMPK-NF- $\kappa$ B signaling. *Oncotarget* **2017**, *8*, 20706–20718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Hanahan, D.; Folkman, J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* **1996**, *86*, 353–364. [[CrossRef](#)]
172. Wyckoff, J.B.; Wang, Y.; Lin, E.Y.; Li, J.; Goswami, S.; Stanley, E.R.; Segall, J.E.; Pollard, J.W.; Condeelis, J. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 2649–2656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Harney, A.S.; Arwert, E.N.; Entenberg, D.; Wang, Y.; Guo, P.; Qian, B.-Z.; Oktay, M.H.; Pollard, J.W.; Jones, J.G.; Condeelis, J.S. Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2hi Macrophage-Derived VEGFA. *Cancer Discov.* **2015**, *5*, 932–943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Murdoch, C.; Muthana, M.; Coffelt, S.B.; Lewis, C.E. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 618–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. De Palma, M.; Murdoch, C.; Venneri, M.A.; Naldini, L.; Lewis, C.E. Tie2-expressing monocytes: Regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol.* **2007**, *28*, 519–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Pucci, F.; Venneri, M.A.; Bizziato, D.; Nonis, A.; Moi, D.; Sica, A.; Di Serio, C.; Naldini, L.; De Palma, M. A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood “resident” monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships. *Blood* **2009**, *114*, 901–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Coffelt, S.B.; Tal, A.O.; Scholz, A.; De Palma, M.; Patel, S.; Urbich, C.; Biswas, S.K.; Murdoch, C.; Plate, K.H.; Reiss, Y.; et al. Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 5270–5280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Zhou, X.; Franklin, R.A.; Adler, M.; Jacox, J.B.; Bailis, W.; Shyer, J.A.; Flavell, R.A.; Mayo, A.; Alon, U.; Medzhitov, R. Circuit Design Features of a Stable Two-Cell System. *Cell* **2018**, *172*, 744–757.e17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Arjaans, M.; Schröder, C.P.; Oosting, S.F.; Dafni, U.; Kleibeuker, J.E.; de Vries, E.G.E. VEGF pathway targeting agents, vessel normalization and tumor drug uptake: From bench to bedside. *Oncotarget* **2016**, *7*, 21247–21258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Kortlever, R.M.; Sodik, N.M.; Wilson, C.H.; Burkhart, D.L.; Pellegrinet, L.; Brown Swigart, L.; Littlewood, T.D.; Evan, G.I. Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell* **2017**, *171*, 1301–1315.e14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Yang, J.; Weinberg, R.A. Epithelial-mesenchymal transition: At the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* **2008**, *14*, 818–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Thiery, J.P.; Acloque, H.; Huang, R.Y.J.; Nieto, M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **2009**, *139*, 871–890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

183. Qian, B.-Z.; Zhang, H.; Li, J.; He, T.; Yeo, E.-J.; Soong, D.Y.H.; Carragher, N.O.; Munro, A.; Chang, A.; Bresnick, A.R.; et al. FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. *J. Exp. Med.* **2015**, *212*, 1433–1448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Kitamura, T.; Qian, B.-Z.; Soong, D.; Cassetta, L.; Noy, R.; Sugano, G.; Kato, Y.; Li, J.; Pollard, J.W. CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *J. Exp. Med.* **2015**, *212*, 1043–1059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Chen, Q.; Zhang, X.H.-F.; Massagué, J. Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 538–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Qian, B.; Deng, Y.; Im, J.H.; Muschel, R.J.; Zou, Y.; Li, J.; Lang, R.A.; Pollard, J.W. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Weiss, R.J.; Wedin, R. Surgery for skeletal metastases in lung cancer. *Acta Orthop.* **2011**, *82*, 96–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Rove, K.O.; Crawford, E.D. Metastatic cancer in solid tumors and clinical outcome: Skeletal-related events. *Oncology* **2009**, *23*, 21–27. [[PubMed](#)]
189. Luis-Ravelo, D.; Antón, I.; Zanduetta, C.; Valencia, K.; Ormazábal, C.; Martínez-Canarias, S.; Guruceaga, E.; Perurena, N.; Vicent, S.; De Las Rivas, J.; et al. A gene signature of bone metastatic colonization sensitizes for tumor-induced osteolysis and predicts survival in lung cancer. *Oncogene* **2014**, *33*, 5090–5099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Marx, J. Cell biology. Podosomes and invadopodia help mobile cells step lively. *Science* **2006**, *312*, 1868–1869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Coughlin, T.R.; Romero-Moreno, R.; Mason, D.E.; Nystrom, L.; Boerckel, J.D.; Niebur, G.; Littlepage, L.E. Bone: A Fertile Soil for Cancer Metastasis. *Curr. Drug Targets* **2017**, *18*, 1281–1295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Suda, T.; Takahashi, N.; Udagawa, N.; Jimi, E.; Gillespie, M.T.; Martin, T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.* **1999**, *20*, 345–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Guerrini, M.M.; Takayanagi, H. The immune system, bone and RANKL. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *561*, 118–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Shih, L.-Y.; Shih, H.-N.; Chen, T.-H. Bone resorption activity of osteolytic metastatic lung and breast cancers. *J. Orthop. Res.* **2004**, *22*, 1161–1167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Hernández, I.; Moreno, J.L.; Zanduetta, C.; Montuenga, L.; Lecanda, F. Novel alternatively spliced ADAM8 isoforms contribute to the aggressive bone metastatic phenotype of lung cancer. *Oncogene* **2010**, *29*, 3758–3769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Kuo, P.-L.; Liao, S.-H.; Hung, J.-Y.; Huang, M.-S.; Hsu, Y.-L. MicroRNA-33a functions as a bone metastasis suppressor in lung cancer by targeting parathyroid hormone related protein. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3756–3766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Winkler, I.G.; Sims, N.A.; Pettit, A.R.; Barbier, V.; Nowlan, B.; Helwani, F.; Poulton, I.J.; van Rooijen, N.; Alexander, K.A.; Raggatt, L.J.; et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* **2010**, *116*, 4815–4828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Chow, A.; Lucas, D.; Hidalgo, A.; Méndez-Ferrer, S.; Hashimoto, D.; Scheiermann, C.; Battista, M.; Leboeuf, M.; Prophete, C.; van Rooijen, N.; et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 261–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Ehninger, A.; Trumpp, A. The bone marrow stem cell niche grows up: Mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 421–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Wu, A.C.; He, Y.; Broomfield, A.; Paatan, N.J.; Harrington, B.S.; Tseng, H.-W.; Beaven, E.A.; Kiernan, D.M.; Swindle, P.; Clubb, A.B.; et al. CD169(+) macrophages mediate pathological formation of woven bone in skeletal lesions of prostate cancer. *J. Pathol.* **2016**, *239*, 218–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
201. Jing, W.; Zhang, L.; Qin, F.; Li, X.; Guo, X.; Li, Y.; Qiu, C.; Zhao, Y. Targeting macrophages for cancer therapy disrupts bone homeostasis and impairs bone marrow erythropoiesis in mice bearing Lewis lung carcinoma tumors. *Cell Immunol.* **2018**, *331*, 168–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Mahoney, M.C.; Shipley, R.T.; Corcoran, H.L.; Dickson, B.A. CT demonstration of calcification in carcinoma of the lung. *AJR Am. J. Roentgenol.* **1990**, *154*, 255–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

203. Yoshikawa, J.; Takashima, T.; Miyata, S.; Kitagawa, M. CT demonstration of calcification in an adenoid cystic carcinoma of the lung. *AJR Am. J. Roentgenol.* **1990**, *154*, 419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Khan, A.N.; Al-Jahdali, H.H.; Allen, C.M.; Irion, K.L.; Al Ghanem, S.; Koteyar, S.S. The calcified lung nodule: What does it mean? *Ann. Thorac. Med.* **2010**, *5*, 67–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Ridker, P.M.; MacFadyen, J.G.; Thuren, T.; Everett, B.M.; Libby, P.; Glynn, R.J.; Ridker, P.; Lorenzatti, A.; Krum, H.; Varigos, J.; et al. Effect of interleukin-1 $\beta$  inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: Exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **2017**, *390*, 1833–1842. [[CrossRef](#)]
206. Chabner, B.A.; Nabel, C.S. Canakinumab and Lung Cancer: Intriguing, but Is It Real? *Oncologist* **2018**, *23*, 637–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. Crossman, D.; Rothman, A.M.K. Interleukin-1  $\beta$  inhibition with canakinumab and reducing lung cancer—Subset analysis of the canakinumab anti-inflammatory thrombosis outcome study trial (CANTOS). *J. Thorac. Dis.* **2018**, *10*, S3084–3087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
208. Haux, J. Infection and cancer. *Lancet* **2001**, *358*, 155–156. [[CrossRef](#)]
209. Vernon, L.F. William Bradley Coley, MD, and the phenomenon of spontaneous regression. *Immunol. Targets Ther.* **2018**, *7*, 29–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
210. Ridker, P.M.; Everett, B.M.; Thuren, T.; MacFadyen, J.G.; Chang, W.H.; Ballantyne, C.; Fonseca, F.; Nicolau, J.; Koenig, W.; Anker, S.D.; et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 1119–1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
211. Libby, P. Interleukin-1  $\beta$  as a Target for Atherosclerosis Therapy: Biological Basis of CANTOS and Beyond. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *70*, 2278–2289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
212. Apte, R.N.; Dotan, S.; Elkabets, M.; White, M.R.; Reich, E.; Carmi, Y.; Song, X.; Dvozkin, T.; Krelin, Y.; Voronov, E. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev.* **2006**, *25*, 387–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Dinarello, C.A. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev.* **2010**, *29*, 317–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Zitvogel, L.; Kepp, O.; Galluzzi, L.; Kroemer, G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 343–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Karki, R.; Man, S.M.; Kanneganti, T.-D. Inflammasomes and Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, *5*, 94–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
216. Lee, M.K.S.; Yvan-Charvet, L.; Masters, S.L.; Murphy, A.J. The modern interleukin-1 superfamily: Divergent roles in obesity. *Semin. Immunol.* **2016**, *28*, 441–449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
217. Furman, D.; Chang, J.; Lartigue, L.; Bolen, C.R.; Haddad, F.; Gaudilliere, B.; Ganio, E.A.; Fragiadakis, G.K.; Spitzer, M.H.; Douchet, I.; et al. Expression of specific inflammasome gene modules stratifies older individuals into two extreme clinical and immunological states. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 174–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
218. Pinkerton, J.W.; Kim, R.Y.; Robertson, A.A.B.; Hirota, J.A.; Wood, L.G.; Knight, D.A.; Cooper, M.A.; O'Neill, L.A.J.; Horvat, J.C.; Hansbro, P.M. Inflammasomes in the lung. *Mol. Immunol.* **2017**, *86*, 44–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
219. Howrylak, J.A.; Nakahira, K. Inflammasomes: Key Mediators of Lung Immunity. *Annu. Rev. Physiol.* **2017**, *79*, 471–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
220. Chirivi, R.G.; Garofalo, A.; Padura, I.M.; Mantovani, A.; Giavazzi, R. Interleukin 1 receptor antagonist inhibits the augmentation of metastasis induced by interleukin 1 or lipopolysaccharide in a human melanoma/nude mouse system. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5051–5054. [[PubMed](#)]
221. Voronov, E.; Shouval, D.S.; Krelin, Y.; Cagnano, E.; Benharroch, D.; Iwakura, Y.; Dinarello, C.A.; Apte, R.N. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 2645–2650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
222. Nakao, S.; Kuwano, T.; Tsutsumi-Miyahara, C.; Ueda, S.; Kimura, Y.N.; Hamano, S.; Sonoda, K.; Saijo, Y.; Nukiwa, T.; Strieter, R.M.; et al. Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 $\beta$ -induced neovascularization and tumor growth. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 2979–2991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

223. Shi, H.; Zhang, J.; Han, X.; Li, H.; Xie, M.; Sun, Y.; Liu, W.; Ba, X.; Zeng, X. Recruited monocytic myeloid-derived suppressor cells promote the arrest of tumor cells in the premetastatic niche through an IL-1 $\beta$ -mediated increase in E-selectin expression. *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 1370–1383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Guo, B.; Fu, S.; Zhang, J.; Liu, B.; Li, Z. Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Saijo, Y.; Tanaka, M.; Miki, M.; Usui, K.; Suzuki, T.; Maemondo, M.; Hong, X.; Tazawa, R.; Kikuchi, T.; Matsushima, K.; et al. Proinflammatory cytokine IL-1  $\beta$  promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: In vivo analysis of tumor-stromal interaction. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 469–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
226. Próchnicki, T.; Latz, E. Inflammasomes on the Crossroads of Innate Immune Recognition and Metabolic Control. *Cell Metab.* **2017**, *26*, 71–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
227. Ting, J.P.Y.; Duncan, J.A.; Lei, Y. How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system. *Science* **2010**, *327*, 286–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
228. Lamkanfi, M.; Dixit, V.M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* **2014**, *157*, 1013–1022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
229. Awad, F.; Assrawi, E.; Jumeau, C.; Georjina-Lavialle, S.; Cobret, L.; Duquesnoy, P.; Piterboth, W.; Thomas, L.; Stankovic-Stojanovic, K.; Louvrier, C.; et al. Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0175336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
230. Lasithiotaki, I.; Tsitoura, E.; Samara, K.D.; Trachalaki, A.; Charalambous, I.; Tzanakis, N.; Antoniou, K.M. NLRP3/Caspase-1 inflammasome activation is decreased in alveolar macrophages in patients with lung cancer. *PLoS ONE* **2018**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
231. Pouniotis, D.S.; Plebanski, M.; Apostolopoulos, V.; McDonald, C.F. Alveolar macrophage function is altered in patients with lung cancer. *Clin. Exp. Immunol.* **2006**, *143*, 363–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
232. Lewis, A.M.; Varghese, S.; Xu, H.; Alexander, H.R. Interleukin-1 and cancer progression: The emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J. Transl. Med.* **2006**, *4*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Kong, H.; Wang, Y.; Zeng, X.; Wang, Z.; Wang, H.; Xie, W. Differential expression of inflammasomes in lung cancer cell lines and tissues. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.* **2015**, *36*, 7501–7513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
234. Haneklaus, M.; O'Neill, L.A.J. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. *Immunol. Rev.* **2015**, *265*, 53–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
235. Guo, H.; Callaway, J.B.; Ting, J.P.-Y. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 677–687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
236. Edye, M.E.; Lopez-Castejon, G.; Allan, S.M.; Brough, D. Acidosis drives DAMP-induced interleukin-1 secretion via a caspase-1-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
237. O'Neill, L.A.J. A broken krebs cycle in macrophages. *Immunity* **2015**, *42*, 393–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
238. Lampropoulou, V.; Sergushichev, A.; Bambouskova, M.; Nair, S.; Vincent, E.E.; Loginicheva, E.; Cervantes-Barragan, L.; Ma, X.; Huang, S.C.-C.; Griss, T.; et al. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 158–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
239. Jiang, S.; Yan, W. Succinate in the cancer-immune cycle. *Cancer Lett.* **2017**, *390*, 45–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
240. Weiss, J.M.; Davies, L.C.; Karwan, M.; Ileva, L.; Ozaki, M.K.; Cheng, R.Y.S.; Ridnour, L.A.; Annunziata, C.M.; Wink, D.A.; McVicar, D.W. Itaconic acid mediates crosstalk between macrophage metabolism and peritoneal tumors. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
241. Weinberg, S.E.; Sena, L.A.; Chandel, N.S. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity* **2015**, *42*, 406–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
242. Kris, M.G.; Johnson, B.E.; Berry, L.D.; Kwiatkowski, D.J.; Iafate, A.J.; Wistuba, I.I.; Varella-Garcia, M.; Franklin, W.A.; Aronson, S.L.; Su, P.-F.; et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA* **2014**, *311*, 1998–2006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
243. Mok, T.S.; Wu, Y.-L.; Thongprasert, S.; Yang, C.-H.; Chu, D.-T.; Saijo, N.; Sunpaweravong, P.; Han, B.; Margono, B.; Ichinose, Y.; et al. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 947–957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

244. Zhou, C.; Wu, Y.-L.; Chen, G.; Feng, J.; Liu, X.-Q.; Wang, C.; Zhang, S.; Wang, J.; Zhou, S.; Ren, S.; et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): A multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* **2011**, *12*, 735–742. [[CrossRef](#)]
245. Sequist, L.V.; Yang, J.C.-H.; Yamamoto, N.; O’Byrne, K.; Hirsh, V.; Mok, T.; Geater, S.L.; Orlov, S.; Tsai, C.-M.; Boyer, M.; et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 3327–3334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Douillard, J.-Y.; Ostoros, G.; Cobo, M.; Ciuleanu, T.; McCormack, R.; Webster, A.; Milenkova, T. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: A phase-IV, open-label, single-arm study. *Br. J. Cancer* **2014**, *110*, 55–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
247. Mok, T.S.; Wu, Y.-L.; Ahn, M.-J.; Garassino, M.C.; Kim, H.R.; Ramalingam, S.S.; Shepherd, F.A.; He, Y.; Akamatsu, H.; Theelen, W.S.M.E.; et al. Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 629–640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
248. Soria, J.-C.; Ohe, Y.; Vansteenkiste, J.; Reungwetwattana, T.; Chewaskulyong, B.; Lee, K.H.; Dechaphunkul, A.; Imamura, F.; Nogami, N.; Kurata, T.; et al. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
249. Millett, R.L.; Elkon, J.M.; Tabbara, I.A. Directed Therapies in Anaplastic Lymphoma Kinase-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res.* **2018**, *38*, 4969–4975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
250. Pasquini, G.; Giaccone, G. C-MET inhibitors for advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2018**, *27*, 363–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
251. Hirsch, F.R.; Scagliotti, G.V.; Mulshine, J.L.; Kwon, R.; Curran, W.J.; Wu, Y.-L.; Paz-Ares, L. Lung cancer: Current therapies and new targeted treatments. *Lancet* **2017**, *389*, 299–311. [[CrossRef](#)]
252. Montero, J.; Letai, A. Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 56–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
253. Kale, J.; Osterlund, E.J.; Andrews, D.W. BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 65–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
254. Hata, A.N.; Yeo, A.; Faber, A.C.; Lifshits, E.; Chen, Z.; Cheng, K.A.; Walton, Z.; Sarosiek, K.A.; Letai, A.; Heist, R.S.; et al. Failure to induce apoptosis via BCL-2 family proteins underlies lack of efficacy of combined MEK and PI3K inhibitors for KRAS-mutant lung cancers. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 3146–3156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
255. Kim, E.Y.; Jung, J.Y.; Kim, A.; Chang, Y.S.; Kim, S.K. ABT-737 Synergizes with Cisplatin Bypassing Aberration of Apoptotic Pathway in Non-small Cell Lung Cancer. *Neoplasia* **2017**, *19*, 354–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
256. Chiappori, A.A.; Kolevska, T.; Spigel, D.R.; Hager, S.; Rarick, M.; Gadgeel, S.; Blais, N.; Von Pawel, J.; Hart, L.; Reck, M.; et al. A randomized phase II study of the telomerase inhibitor imetelstat as maintenance therapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 354–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
257. Williams, S.C.P. Small nanobody drugs win big backing from pharma. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1355–1356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
258. Frink, R.E.; Peyton, M.; Schiller, J.H.; Gazdar, A.F.; Shay, J.W.; Minna, J.D. Telomerase inhibitor imetelstat has preclinical activity across the spectrum of non-small cell lung cancer oncogenotypes in a telomere length dependent manner. *Oncotarget* **2016**, *7*, 31639–31651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
259. Liu, W.; Yin, Y.; Wang, J.; Shi, B.; Zhang, L.; Qian, D.; Li, C.; Zhang, H.; Wang, S.; Zhu, J.; et al. Kras mutations increase telomerase activity targeting telomerase is a promising therapeutic strategy for Kras-mutant, NSCLC. *Oncotarget* **2017**, *8*, 179–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
260. Housman, G.; Byler, S.; Heerboth, S.; Lapinska, K.; Longacre, M.; Snyder, N.; Sarkar, S. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers* **2014**, *6*, 1769–1792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
261. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
262. Mantovani, A.; Sica, A. Macrophages, innate immunity and cancer: Balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* **2010**, *22*, 231–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
263. Herbst, R.S.; Soria, J.-C.; Kowanzet, M.; Fine, G.D.; Hamid, O.; Gordon, M.S.; Sosman, J.A.; McDermott, D.F.; Powderly, J.D.; Gettinger, S.N.; et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* **2014**, *515*, 563–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

264. Garon, E.B.; Rizvi, N.A.; Hui, R.; Leigh, N.; Balmanoukian, A.S.; Eder, J.P.; Patnaik, A.; Aggarwal, C.; Gubens, M.; Horn, L.; et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2018–2028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
265. Herbst, R.S.; Baas, P.; Kim, D.-W.; Felip, E.; Pérez-Gracia, J.L.; Han, J.-Y.; Molina, J.; Kim, J.-H.; Arvis, C.D.; Ahn, M.-J.; et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet* **2016**, *387*, 1540–1550. [[CrossRef](#)]
266. Reck, M.; Rodríguez-Abreu, D.; Robinson, A.G.; Hui, R.; Csőszi, T.; Fülöp, A.; Gottfried, M.; Peled, N.; Tafreshi, A.; Cuffe, S.; et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 1823–1833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
267. Curran, M.A.; Montalvo, W.; Yagita, H.; Allison, J.P. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4275–4280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
268. Hellmann, M.D.; Rizvi, N.A.; Goldman, J.W.; Gettinger, S.N.; Borghaei, H.; Brahmer, J.R.; Ready, N.E.; Gerber, D.E.; Chow, L.Q.; Jurgens, R.A.; et al. Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012): Results of an open-label, phase 1, multicohort study. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 31–41. [[CrossRef](#)]
269. Le, D.T.; Uram, J.N.; Wang, H.; Bartlett, B.R.; Kemberling, H.; Eyring, A.D.; Skora, A.D.; Luber, B.S.; Azad, N.S.; Laheru, D.; et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2509–2520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
270. McGranahan, N.; Furness, A.J.S.; Rosenthal, R.; Ramskov, S.; Lyngaa, R.; Saini, S.K.; Jamal-Hanjani, M.; Wilson, G.A.; Birkbak, N.J.; Hiley, C.T.; et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* **2016**, *351*, 1463–1469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
271. Lou, Y.; Diao, L.; Cuentas, E.R.P.; Denning, W.L.; Chen, L.; Fan, Y.H.; Byers, L.A.; Wang, J.; Papadimitrakopoulou, V.A.; Behrens, C.; et al. Epithelial-Mesenchymal Transition Is Associated with a Distinct Tumor Microenvironment Including Elevation of Inflammatory Signals and Multiple Immune Checkpoints in Lung Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3630–3642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
272. Koyama, S.; Akbay, E.A.; Li, Y.Y.; Aref, A.R.; Skoulidis, F.; Herter-Sprie, G.S.; Buczkowski, K.A.; Liu, Y.; Awad, M.M.; Denning, W.L.; et al. STK11/LKB1 Deficiency Promotes Neutrophil Recruitment and Proinflammatory Cytokine Production to Suppress T-cell Activity in the Lung Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 999–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
273. Speiser, D.E.; Ho, P.-C.; Verdeil, G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 599–611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
274. Ruffell, B.; Chang-Strachan, D.; Chan, V.; Rosenbusch, A.; Ho, C.M.T.; Pryer, N.; Daniel, D.; Hwang, E.S.; Rugo, H.S.; Coussens, L.M. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 623–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
275. Flavell, R.A.; Sanjabi, S.; Wrzesinski, S.H.; Licona-Limón, P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFβ. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 554–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
276. Choi, S.; Kim, H.-R.; Leng, L.; Kang, I.; Jorgensen, W.L.; Cho, C.-S.; Bucala, R.; Kim, W.-U. Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulatory T cell response of tumor-bearing mice. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 3905–3913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
277. Zhao, Q.; Kuang, D.-M.; Wu, Y.; Xiao, X.; Li, X.-F.; Li, T.-J.; Zheng, L. Activated CD69+ T Cells Foster Immune Privilege by Regulating IDO Expression in Tumor-Associated Macrophages. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 1117–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
278. Hughes, R.; Qian, B.-Z.; Rowan, C.; Muthana, M.; Keklikoglou, I.; Olson, O.C.; Tazzyman, S.; Danson, S.; Addison, C.; Clemons, M.; et al. Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 3479–3491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
279. Olson, O.C.; Kim, H.; Quail, D.F.; Foley, E.A.; Joyce, J.A. Tumor-Associated Macrophages Suppress the Cytotoxic Activity of Antimitotic Agents. *Cell Rep.* **2017**, *19*, 101–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
280. De Palma, M.; Lewis, C.E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 277–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

281. Arlauckas, S.P.; Garris, C.S.; Kohler, R.H.; Kitaoka, M.; Cuccarese, M.F.; Yang, K.S.; Miller, M.A.; Carlson, J.C.; Freeman, G.J.; Anthony, R.M.; et al. In vivo imaging reveals a tumor-associated macrophage-mediated resistance pathway in anti-PD-1 therapy. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
282. Noman, M.Z.; Desantis, G.; Janji, B.; Hasmim, M.; Karray, S.; Dessen, P.; Bronte, V.; Chouaib, S. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 781–790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
283. Gordon, S.R.; Maute, R.L.; Dulken, B.W.; Hutter, G.; George, B.M.; McCracken, M.N.; Gupta, R.; Tsai, J.M.; Sinha, R.; Corey, D.; et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* **2017**, *545*, 495–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
284. Russo, G.L.; Moro, M.; Sommariva, M.; Cancila, V.; Boeri, M.; Centonze, G.; Ferro, S.; Ganzinelli, M.; Gasparini, P.; Huber, V.; et al. Antibody-Fc/FcR Interaction on Macrophages as a Mechanism for Hyperprogressive Disease in Non-Small Cell Lung Cancer Subsequent to PD-1/PD-L1 Blockade. *Clin. Cancer Res.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## ARTICLE OPEN



# The prohibitin-binding compound fluorizoline inhibits mitophagy in cancer cells

Sonia Núñez-Vázquez<sup>1,2,3</sup>, José Saura-Esteller<sup>1</sup>, Ismael Sánchez-Vera<sup>1</sup>, Emma Guilbaud<sup>2,3</sup>, Ana M. Cosialls<sup>1</sup>, Gabriel Pons<sup>1</sup>, Jean-Ehrland Ricci<sup>2,3</sup>, Daniel Iglesias-Serret<sup>1,4</sup>, Sandrine Marchetti<sup>2,3,5</sup> and Joan Gil<sup>1,5</sup>✉

© The Author(s) 2021

Fluorizoline is a prohibitin-binding compound that triggers apoptosis in several cell lines from murine and human origin, as well as in primary cells from hematologic malignancies by inducing the integrated stress response and ER stress. Recently, it was described that PHB (Prohibitin) 1 and 2 are crucial mitophagy receptors involved in mediating the autophagic degradation of mitochondria. We measured mitophagy in HeLa cells expressing Parkin and in A549, a lung cancer cell line that can undergo mitophagy in a Parkin-independent manner, and we demonstrated that both fluorizoline and rocaglamide A, another PHB-binding molecule, inhibit CCCP- and OA-induced mitophagy. Moreover, we demonstrated that PHBs are mediating Parkin-dependent mitophagy. In conclusion, besides being a potent pro-apoptotic compound, we present fluorizoline as a promising new mitophagy modulator that could be used as anticancer agent.

*Oncogenesis* (2021)10:64; <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00352-9>

## INTRODUCTION

Mitochondria are crucial for multiple intracellular processes. These organelles are responsible for the generation of ATP through oxidative phosphorylation (OXPHOS) but they also control the intracellular calcium levels, regulate the innate immune response and control the cell death through the initiation of the intrinsic apoptotic pathway [1]. Thus, the selective removal of damaged or dysfunctional mitochondrial is crucial to maintain a proper cell homeostasis [2]. Mitophagy is the form of macroautophagy that ensures the elimination of damaged mitochondria by the lysosomes to maintain the integrity of the mitochondrial pool [3]. Diverse stimuli, including nutrient starvation, higher mitochondrial respiration activity, hypoxia, respiratory chain inhibitors, or iron deficiency can promote mitophagy as a protective mechanism against mitochondrial stress [4].

The best-described mitophagy pathway is driven by PINK1 (PTEN induced putative kinase 1) and Parkin, a RBR (RING-Between-RING) E3 ubiquitin (Ub) ligase. Under basal conditions, mitochondrial transmembrane potential allows the import and processing of PINK1 in the mitochondrial matrix by the protease PARL (Presenilins-associated rhomboid-like protein), leading to its constant degradation. Upon mitochondrial depolarization, PARL cannot longer process PINK1, which leads to its dimerization and autophosphorylation. Once activated and stabilized in the outer mitochondrial membrane (OMM), PINK1 enhances the activation and recruitment of Parkin, which results in the polyubiquitination of numerous OMM proteins that are recognized by the autophagy cargo adaptor p62 and OPTN [5].

Although the PINK1/Parkin signaling pathway is the mechanism of mitophagy most studied and well-characterized, other E3 Ub

ligases, such as ARIH1, MUL1, SIAH1 SMURF1, and GP78, have been described to cooperate with, or act alternatively, to Parkin activity downstream of PINK1 [6, 7]. Furthermore, mitophagy can also be mediated by Ub-independent receptor pathways. Several mitochondrial membrane proteins (e.g., PHB2, FUNDC1, BNIP3, NIX, BCL2L13, and FKBP8) and lipids (e.g., cardiolipin and ceramides) can act as mitophagy receptors [8].

Fluorizoline is a fluorinated thiazoline pro-apoptotic compound that induces apoptosis, in a p53-independent manner, in a wide range of cancer cell lines [9]. Moreover, fluorizoline also showed high apoptotic capacity in acute myeloid leukemia [10], chronic lymphocytic leukemia [11], and multiple myeloma [12] primary cancer cells. Fluorizoline directly binds and targets Prohibitin (PHB) 1 and 2 [9, 13], evolutionary conserved and ubiquitously expressed proteins, mainly localized in the inner mitochondrial membrane (IMM), where they interact with each other to form a macromolecular structure [14]. These PHB heteromeric ring-like complexes in the IMM participate in numerous processes in the mitochondria, including protein-quality control, OXPHOS chain synthesis and assembly, ROS formation or mitochondrial DNA organization [14, 15]. In addition, PHB2 was discovered as a novel mitophagy receptor involved in targeting mitochondria for autophagic degradation in mammals [16].

It was described that upon mitochondrial depolarization, PHB2 or PHB2/PHB1 complex directly binds to autophagosome-associated protein LC3 [16]. Furthermore, recently it was further described that upon mitochondrial depolarization, PHB2 binds to PARL, releasing PGAM5 in the process [17], which is responsible for retaining and stabilizing PINK1 on the OMM to initiate mitophagy [18]. Also, it was reported that PHB2 is required for

<sup>1</sup>Departament de Ciències Fisiològiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, Oncobell-IDIBELL (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Université Côte d'Azur, INSERM, C3M Nice, France. <sup>3</sup>Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer, Nice, France. <sup>4</sup>Facultat de Medicina, Universitat de Vic–Universitat Central de Catalunya (UVic–UCC), Vic, Barcelona, Spain. <sup>5</sup>These authors contributed equally: Sandrine Marchetti and Joan Gil. ✉email: [jgil@ub.edu](mailto:jgil@ub.edu)

Received: 26 March 2021 Revised: 26 August 2021 Accepted: 3 September 2021

Published online: 27 September 2021

cholestasis-induced mitophagy, where PHB2 brings LC3 to the damaged mitochondria by interacting with p62 and LC3 [19].

The impact of mitophagy on the cellular fate is controversial as the clearance of mitochondria can have diverse effects on tumor development, growth, and progression. Mitophagy can facilitate survival through the adaptation to stress by removing mitochondria that could potentially be permeabilized to induce cell death or, conversely, it can induce cell death due to the excessive removal of mitochondria [20]. On one hand, genetic inhibition of mitophagy pathways sensitizes cancer cells to apoptosis in response to anticancer treatments, supporting the pro-survival role of mitophagy in cancer cells [2]. In fact, enhanced mitophagy contributes to cisplatin and etoposide resistance in cancer cells [21, 22], while mitophagy impairment resensitizes drug-resistant cancer cells [22, 23]. On the other hand, dysfunctional mitochondria and increased mitochondrial ROS can promote tumorigenesis, cancer progression, metastasis, and drug resistance through DNA, lipid, and protein oxidation [2].

Nevertheless, there are several studies suggesting that mitophagy inhibitors in combination with conventional cancer treatment can markedly improve the effectiveness of chemotherapy [24]. For that reason, in this study, we investigated whether fluorizoline can modulate mitophagy by targeting PHBs.

## MATERIAL AND METHODS

### Cell culture

HeLa and A549 were supplied by the European Collection of Cell Culture (ECACC). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 ng/mL streptomycin. Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide. Cell cultures were periodically tested for mycoplasma contamination by PCR.

### Mito-mKeima mitophagy analysis

HeLa and A549 cells were infected with mito-mKeima (m-Keima) expressing lentiviral vector. The fluorescence profile of this biomarker is pH-dependent, making it a perfect biosensor of mitochondrial degradation by the lysosomes [25]. Excitation at 488 nm and emission at >620 nm was used to detect m-Keima in mitochondria in the cytosol and excitation at 561 nm and emission at >620 nm was used to detect mitochondria in lysosomes (Supplementary Fig. 1A). m-Keima was analyzed by flow cytometry using MACSQuant VYB and MACSQuant software (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

To calculate the percentage of mitophagy positive cells, 10,000 single events were acquired for each sample and subsequently gated the cells experiencing a shift to acidic m-Keima (Supplementary Fig. 1B).

### Short hairpin RNA

To generate the inducible *PHB2* knockdown in HeLa and A549 cells, lentiviral particles were generated by transfecting HEK 293T cells with the Tet-pLKO-puro vector from Addgene (Watertown, Massachusetts, USA) containing the *PHB2* short hairpin sequence 5'-GACAGAGAGGCCAAGGACCTCGAGGTCCTTGGCCCTCTCTGTC-3' under doxycycline promoter. Furtherly, HeLa and A549 cells were infected with these viral particles and selected with 2 µg/mL puromycin.

### Reagents

The synthesis of fluorizoline was performed as previously described [9]. Q-VD-OPh and bafilomycin A were from R&D systems (Minneapolis, Minnesota, USA). CCCP, Oligomycin, and Antimycin A were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Rocaglamide A was purchased from Enzo Life Sciences (Farmingdale, New York, USA).

### Cell viability

Cell viability was measured by measuring phosphatidylserine exposure by annexin V staining and analyzed by flow cytometry using FACSCanto™ and FACSDiva™ software (Becton Dickinson, NJ, USA). Cell viability was expressed as the percentage of annexin V-negative population, which

corresponds to the nonapoptotic cells. Cells were incubated with annexin binding buffer and annexin V for 15 min in the dark before analysis.

### Western blot

Whole-cell protein extracts were obtained by lysing cells with Laemmli sample buffer. Protein concentration was measured with the Micro BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA). 20–40 µg of protein extracts were subjected to reducing conditions, loaded onto a polyacrylamide gel, and then transferred to Immobilon-P membranes from Millipore (Billerica, Massachusetts, USA). One hour after blocking the nonspecific binding sites with 5% (w/v) non-fat milk in Tris-buffered saline with Tween® 20, membranes were incubated overnight at 4 °C with the following specific primary antibodies: β-actin (AC-15, Sigma-Aldrich), PHB1 (sc-28259, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), PHB2/REA (07-234, Millipore), VDAC1 (sc-8828, Santa Cruz), HSP60 (4870 S, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), GRP75 (sc-13967, Santa Cruz), MTCO2 (ab110258, Abcam, Cambridge, UK), PINK1 (6946, Cell Signaling). Antibody binding was detected using a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase, and the enhanced chemiluminescence detection system (Amersham, Little Chalfont, UK). Quantification of band intensities was conducted using Multi Gauge V3.0 software (FujiFilm Corporation). The relative density of each protein and condition was referred to the internal normalization control.

### Immunostaining

Cells were grown on coverslips before treatment. Cells were washed in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min, permeabilized with 0.1% TritonX-100 in PBS for 3 min, and blocked in 2% BSA in PBS for 30 min. Primary antibodies -TOM20 (sc-17764, Santa Cruz), PHB2 (ab182139, abcam), LC3 (14600-1-AP, Proteintech, Manchester, UK)- were used at 1:200 overnight at 4 °C, followed by secondary antibodies at 1:1000 and DAPI (0.5 µg/ml) for 1 h at room temperature. Anti-mouse Alexa Fluor 488 and anti-rabbit Alexa Fluor 647 were obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were mounted with Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA). Images were acquired with a Carl Zeiss model LSM880 confocal microscope and a APOchromat 63×/1.4 Oil M27 objective lens and they were collected using 405, 488, and 561 nm laser lines for excitation and appropriate emission filters. Images were analyzed with Image J Software. Pearson's coefficient was obtained with JACoP plugin [26].

### Quantitative RT-PCR

Total DNA was isolated from HeLa cells using the 'Blood & cell culture DNA mini kit' from QIAGEN (Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The relative DNA expression levels of APP and COX II were obtained by real-time quantitative PCR, using with SYBR green on the ABI Prism 7900 HT Fast Real-Time PCR System. APP (F: 5'-TTTTGTGTGCTCTCCAGGTCT-3', R: 5'-TGGTCACTGGTTGGTTGGC-3') and COX II (F: 5'-CGTCTGAAGGAGGAGGATCGTTG-3', R: 5'-TGGTAAGGAGGAGGATCGTTG-3'). PCR data were captured and analyzed using the Sequence Detector software (SDS version 2.2.2; Applied Biosystems).

### Statistical analysis

The results are shown as the mean ± standard error of the mean (SEM) of values obtained in three or more independent experiments. Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test (two-tailed) or ANOVA-Tukey by using GraphPad Prism 6.0c Software Inc (San Diego, CA, USA). Differences were considered significant at *p* values below 0.05 (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001).

## RESULTS

### Fluorizoline inhibits mitophagy in cancer cells overexpressing Parkin

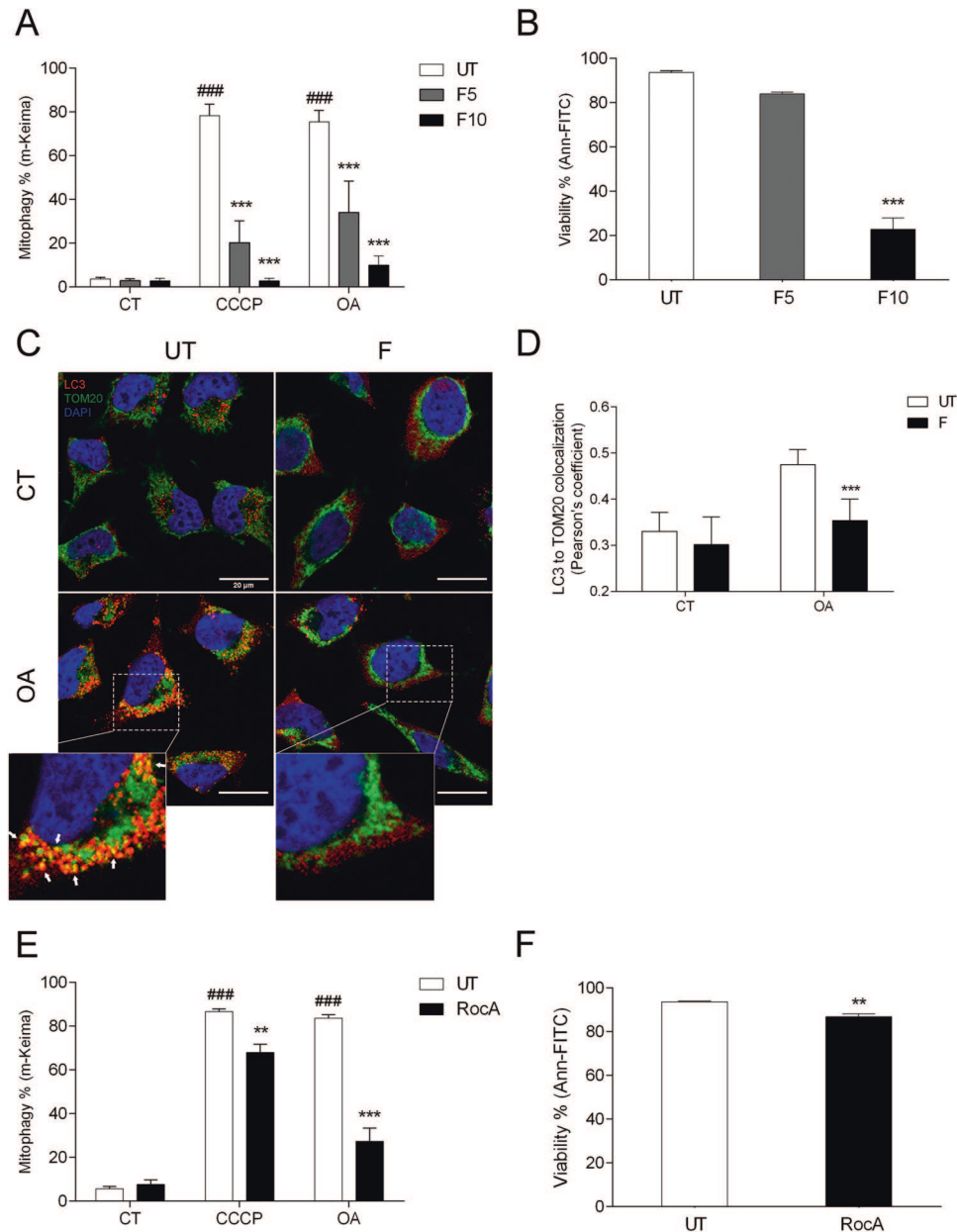
To study the effect of fluorizoline in Parkin-mediated mitophagy we performed the experiments in HeLa cells stably expressing Parkin. In order to measure mitophagy, the cells stably expressed mito-mKeima fluorophore, a biosensor of mitochondrial degradation by the lysosomes [27]. This cellular marker changes its fluorescence profile depending on the pH, which allows the measurement of m-Keima fluorescence excitation conversion from green (488 nm-cytosolic) to red (561 nm-mitochondrial)

using fluorescence-activated cell sorting (FACS) [25] (Supplementary Fig. 1).

We treated HeLa Parkin cells for 16 h with 10  $\mu$ M protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCp) or a combination of 1  $\mu$ M oligomycin and 1  $\mu$ M antimycin A (OA), to depolarize the mitochondria and induce mitophagy. The results showed that the addition of 5 or 10  $\mu$ M fluorizoline can block CCCp and OA-induced mitophagy (Fig. 1A). Strikingly, even the

lower dose of fluorizoline that does not induce a pronounced cell death can inhibit the mitophagy outcome (Fig. 1B).

Next, we studied the co-localization of LC3 and the mitochondrial marker TOM20 in HeLa Parkin cells upon mitophagy induction by 1  $\mu$ M OA, in the presence or absence of 10  $\mu$ M fluorizoline. Cells were treated with 20  $\mu$ M Q-VD-OPh, a caspase inhibitor to avoid the appearance of apoptotic bodies, and with 40 nM bafilomycin A, an inhibitor of the autophagosome-lysosome fusion that facilitates



**Fig. 1 Fluorizoline inhibits mitophagy in cancer cells overexpressing Parkin.** HeLa cells overexpressing Parkin (CT) were treated for 16 h with 10  $\mu$ M CCCp or 1  $\mu$ M oligomycin/1  $\mu$ M antimycin A (OA) in the absence (UT) or presence of 5 or 10  $\mu$ M fluorizoline (F) (A, B). HeLa Parkin cells treated with 20  $\mu$ M pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh and 40 nM bafilomycin (CT) were treated for 8 h with 1  $\mu$ M oligomycin/1  $\mu$ M antimycin (OA), in the absence (UT) or presence of 10  $\mu$ M fluorizoline (F). Cells were co-immunostained for DAPI (blue), TOM20 (green), and LC3 (red) and co-localization was analyzed by confocal microscopy. White arrows indicate the mitochondrial marker within the autophagosome. These are representative images of three independent experiments (C). The co-localization between LC3 and TOM20 was measured and is represented as the Pearson's coefficient ( $n = 3$ ) (D). HeLa cells overexpressing Parkin (CT) were treated for 16 h with 10  $\mu$ M CCCp or 1  $\mu$ M oligomycin/1  $\mu$ M antimycin A (OA), in the absence (UT) or presence of 500 nM rocaglamide A (RocA) (E, F). m-Keima was measured by flow cytometry and it is expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$  independent experiments) of the percentage of mitophagy positive cells (A, E). Viability was measured by flow cytometry and it is expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$  independent experiments) of the percentage of non-apoptotic cells (annexin V-negative) (B, F). ### $p < 0.001$  CT versus CCCp and OA-treated cells and \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  UT versus F or RocA-treated cells.

the accumulation of LC3-II in the cells. We checked that the addition of Q-VD-OPh did not modulate the effects of fluorizoline in the mitophagy process (Supplementary Fig. 2). Upon 8 h of mitophagy induction, we can observe a significant increase in the co-localization of LC3 with TOM20 (Fig. 1C, D). However, when fluorizoline is present this co-localization is lost, demonstrating its inhibitory role in the process.

In parallel, we decided to check whether other PHB binding molecules could also block mitophagy induction; thus, we tested the natural PHB-binding compound rocaglamide A [28]. Measuring the conversion of m-Keima, we observed that 500 nM rocaglamide A is able to block CCCP and OA-induced mitophagy (Fig. 1E). Similar to fluorizoline treatment, rocaglamide A was able to inhibit mitophagy in a dose that does not induce high levels of apoptosis (Fig. 1F).

#### Fluorizoline inhibits the removal of damaged mitochondria

To further characterize the ability of fluorizoline to prevent mitophagy we monitored the removal of damaged mitochondria by measuring the disappearance of mitochondrial markers.

First, we performed an immunofluorescence staining against the mitochondrial proteins TOM20 and PHB2 in HeLa Parkin cells treated with 20  $\mu$ M Q-VD-OPh. The loss of mitochondria in HeLa Parkin cells upon 1  $\mu$ M OA treatment was clearly observed as the signal of TOM20 and PHB2 significantly disappeared (Fig. 2A). On the contrary, the addition of 10  $\mu$ M fluorizoline during OA treatment significantly prevented the loss of TOM20 and PHB2 staining (Fig. 2B and Supplementary Fig. 3). Similar protective effects were observed with 500 nM rocaglamide A (Fig. 2A, B and Supplementary Fig. 3).

Then, we proceed to measure the disappearance of TOM20 and PHB2 by immunoblot, alongside several others mitochondrial markers, such as GRP75, VDAC1, MTCO2, and PHB1. HeLa Parkin cells were treated for 16 h with 10  $\mu$ M CCCP or 1  $\mu$ M OA while treated with 10  $\mu$ M fluorizoline or 500 nM rocaglamide A. We could confirm that both PHB binding compounds block the degradation of mitochondrial proteins induced by CCCP and OA (Fig. 2C, D). The specificity of these proteins to monitor mitophagy was confirmed when HeLa cells lacking Parkin were treated for 16 h with CCCP and OA and did not experience any modulations of these proteins (data not shown).

Next, we measured the removal of damaged mitochondria by measuring the degradation of mitochondrial DNA upon treatment. We chose COX II and amyloid precursor protein (APP) genes as indicatives of mitochondrial and nuclear DNA, respectively [29]. As expected, 10  $\mu$ M fluorizoline treatment prevented the degradation of mitochondrial DNA induced by 1  $\mu$ M OA (Fig. 2E), in a similar way that 500 nM rocaglamide A did (Fig. 2F).

Therefore, by measuring the disappearance of mitochondrial proteins and DNA, we can conclude that both PHB binding compounds, fluorizoline and rocaglamide A, inhibit the removal of damaged mitochondria in cancer cells.

#### Fluorizoline inhibits Parkin-independent mitophagy

Next, we studied whether fluorizoline could inhibit Parkin-independent mitophagy. We decided to use A549 lung carcinoma cells, in which mitophagy depends on the endogenous expression of the E3 ligase ARIH1 and does not express Parkin [21]. A549 cells were treated for 24 h with 10  $\mu$ M CCCP or 1  $\mu$ M OA in the presence or absence of 5  $\mu$ M or 10  $\mu$ M fluorizoline and we measured m-Keima shift. Indeed, the results showed that fluorizoline was also able to inhibit the mitophagy process in this cell line (Fig. 3A).

In addition, compared to HeLa cells, we observed that A549 cells were less sensitive to fluorizoline-induced apoptosis at the same doses (Fig. 3B), but they exhibit similar levels of mitophagy inhibition, which confirms that the inhibition observed is not a consequence of the pro-apoptotic effects of fluorizoline.

#### Fluorizoline prevents PINK1 stabilization in the OMM

Recently, it was reported that upon mitochondrial depolarization, PHB2 binds to PARL instead of interacting with PGAM5, therefore allowing PGAM5 to stabilize PINK1 in the OMM, to recruit Parkin, and to initiate the mitophagy process [17]. Therefore, we studied whether fluorizoline treatment decreases PINK1 protein levels.

Fluorizoline prevented the accumulation of PINK1 in HeLa Parkin cells induced by a 16 h treatment of 10  $\mu$ M CCCP and 1  $\mu$ M OA, accompanied by a stabilization of TOM20 and PHB2 protein levels (Fig. 4A). To confirm that fluorizoline was inhibiting mitophagy initial steps, we checked for PINK1 protein levels after a shorter treatment of CCCP and OA. We were able to observe PINK1 protein stabilization with CCCP and OA in HeLa Parkin cells (Fig. 4B, C) and with OA in A549 cells (Fig. 4D, E) after 6 h of treatment. In both cases, PINK1 protein accumulation was inhibited by 10  $\mu$ M fluorizoline and 500 nM rocaglamide A. As this process takes place at the beginning of the mitophagy process, TOM20 protein levels still remain stable (Fig. 4B). Thus, we confirmed both fluorizoline and rocaglamide A prevent PINK1 stabilization in the OMM upon mitochondria depolarization.

#### Effect of PHB depletion in Parkin-dependent and -independent mitophagy

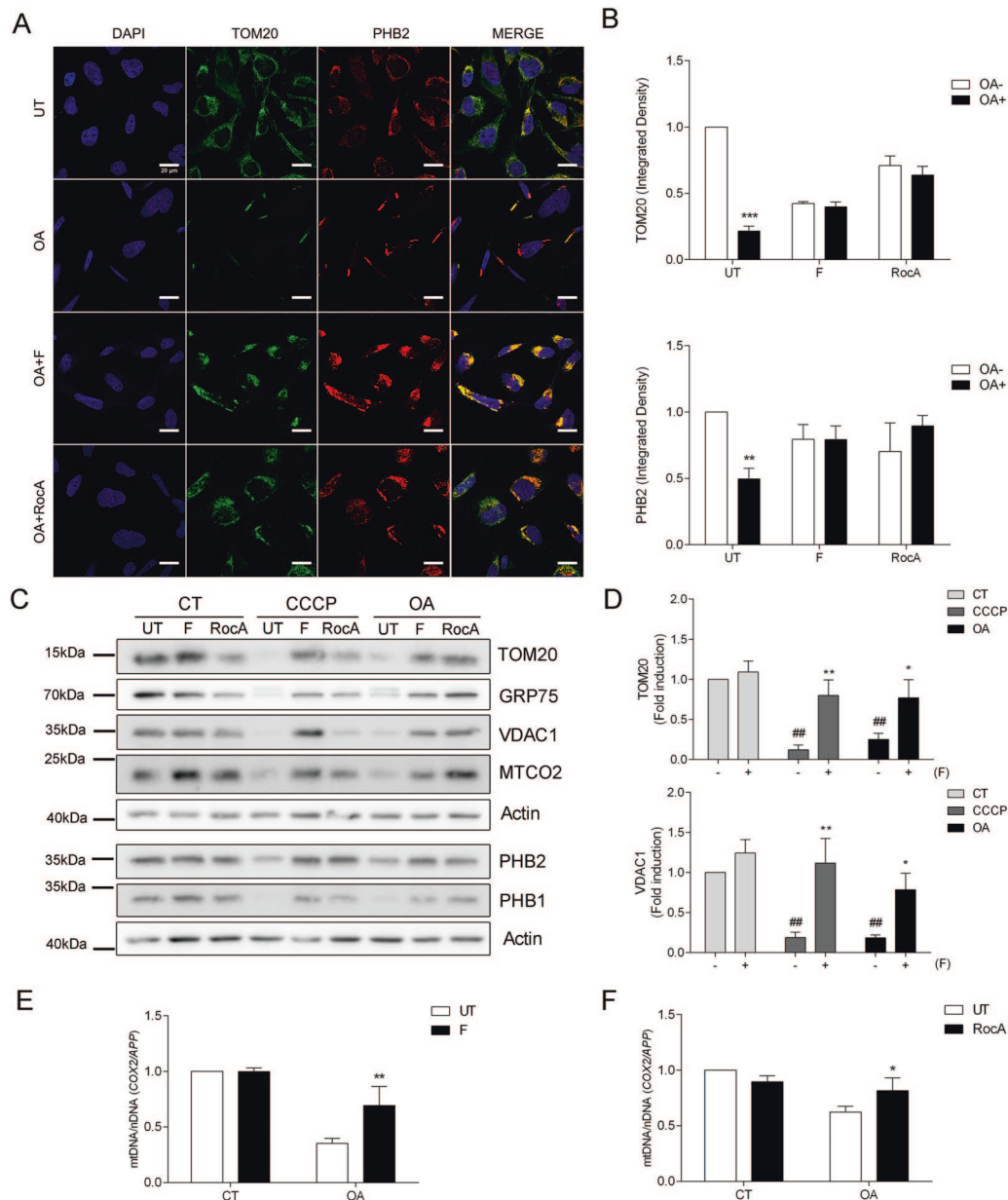
To further study the role of PHBs in the inhibition of mitophagy by fluorizoline, we infected HeLa Parkin cells with a short hairpin RNA (shRNA) against *PHB2* under the control of an inducible promoter regulated by doxycycline. Upon 72 h treatment with 200 ng/mL doxycycline, the induction of sh*PHB2* decreased the expression of PHB2 and PHB1 (Fig. 5A, C), as both PHBs are interdependent at the protein level [30, 31]. PHB depleted cells, when treated with 10  $\mu$ M CCCP and 1  $\mu$ M OA, were unable to undergo mitophagy, similarly to when cells were treated with 10  $\mu$ M fluorizoline (Fig. 5B). Moreover, the absence of PHBs had a similar effect than fluorizoline treatment when monitoring the removal of damaged mitochondria, as the levels of GRP75, VDAC1, and TOM20 remained stable upon CCCP and OA treatment (Fig. 5A, C).

Since most studies proving PHB2 involvement in mitophagy were reported in cells undergoing mitophagy in a Parkin-dependent manner, and considering that we had demonstrated that fluorizoline could also block Parkin-independent mitophagy, we wanted to check whether PHB2 was also essential to mediate mitophagy in A549 cells. sh*PHB2* A549 cells were treated for 24 h with 1  $\mu$ M OA, after a previous 72 h treatment with 200 ng/mL doxycycline to delete PHBs (Fig. 5D, E), and m-Keima measurement showed that A549 lacking PHBs could undergo mitophagy (Fig. 5F). Furthermore, both 10  $\mu$ M fluorizoline and 500 nM rocaglamide A were able to inhibit OA-induced mitophagy in PHB-depleted A549 cells at the same level than in control cells.

#### DISCUSSION

In this manuscript, we described that the PHB-binding compound fluorizoline can inhibit Parkin-dependent and -independent mitophagy. Moreover, while the presence of PHB is essential to undergo mitophagy in HeLa cells overexpressing Parkin, A549 cells appear to have alternative mechanisms to induce mitophagy, independently of PHB. Therefore, although fluorizoline was first thought to be inhibiting mitophagy by binding to PHB, the possibility of fluorizoline having other targets is left open. Despite this, we do not fully discard the possibility that PHB2 is in some level involved in the mitophagy process in A549. Rocaglamide A has already been described to inhibit mitophagy by targeting PHBs [17] and, although it is possible, it is very unlikely that fluorizoline and rocaglamide A share another target besides PHB that is also involved in mitophagy. Thus, the role of PHB in Parkin-independent mitophagy should be further analyzed.

Since it was first described by Levine and colleagues that PHB2 is an IMM mitophagy receptor that binds to LC3 upon



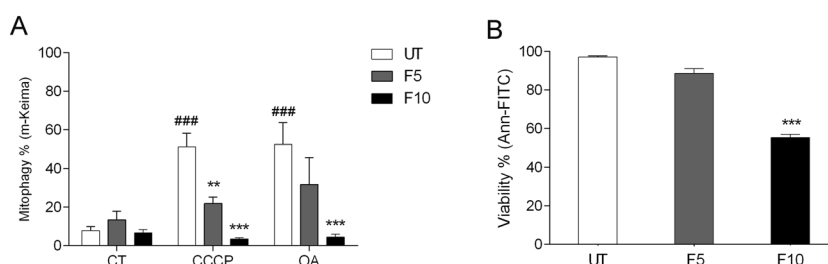
**Fig. 2** Fluorizoline inhibits the removal of damaged mitochondria. HeLa Parkin cells (CT) were treated with 20  $\mu$ M pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh (A, B, E, F) or not (C, D) while treated for 16 h with 1  $\mu$ M oligomycin/1  $\mu$ M antimycin (OA) or 10  $\mu$ M CCCP, in the absence (UT) or presence of 10  $\mu$ M fluorizoline (F) or 500 nM rocaglamide A (RocA). Cells were co-immunostained for DAPI (blue), TOM20 (green), and PHB2 (red) and co-localization was analyzed by confocal microscopy (A). The integrated density of TOM20 and PHB2 was quantified. Mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments) (B). Protein levels from whole-cell lysates were analyzed by western blot and actin was used as a loading control (C). TOM20 and VDAC1 protein expression levels were quantified. Mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments) (D). The genes for COX II and the amyloid precursor protein (APP) were amplified and measured by RT-qPCR as indicators of mitochondrial and nuclear DNA, respectively. Mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments) (E, F). These are representative images of three independent experiments (A, C). \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  CT versus OA-treated cells (B); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  UT versus F or RocA-treated cells (D–F); ## $p < 0.01$  CT versus CCCP and OA-treated cells (D).

mitochondrial depolarization [16], several studies have focused on the implication of PHB2 in this process. Recently, it was described that PHB2 promotes PINK1 stabilization in the OMM through the PARL-PGAM5-PINK1 axis [17]. In this study, they also tested the flavagline PHB ligands, FL3 and rocaglamide A, and they observed that those compounds inhibit PINK1/Parkin-mediated mitophagy. Both compounds were able to inhibit the elimination of mitochondria and the recruitment of Parkin and PINK1 at the OMM, at the same time that their treatment caused an increase in PARL protein levels. Based on this work, fluorizoline would prevent the PGAM5 proteolytic protection conferred by PHB and therefore,

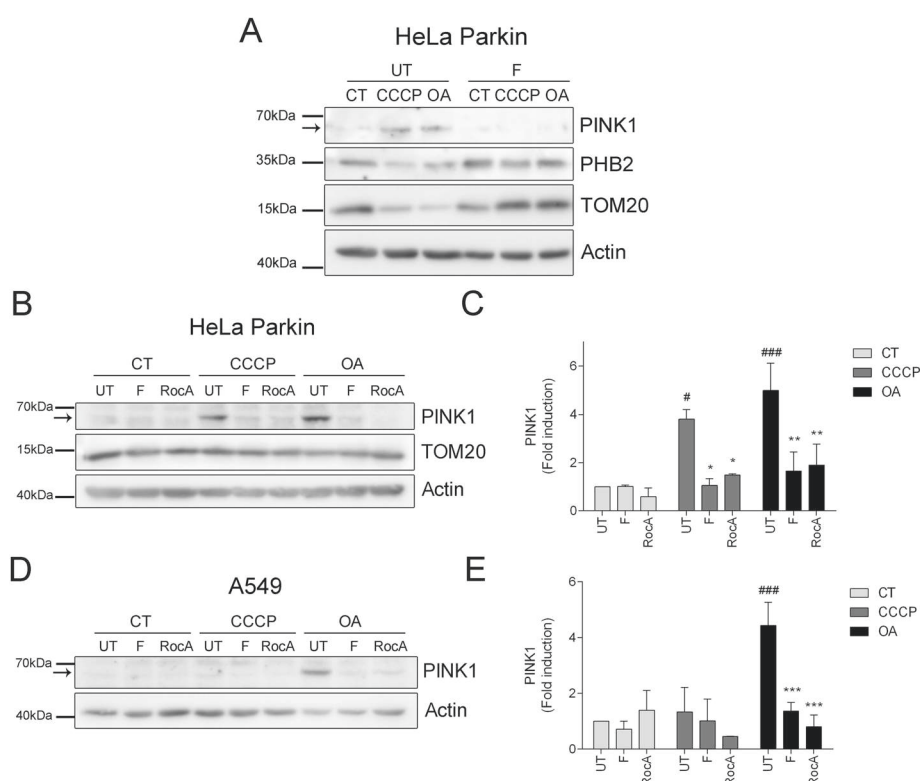
PARL would constantly process PGAM5, not allowing the stabilization of PINK1.

There are some contradictions in the literature about the role of PHB2 ligands regarding mitophagy. Although rocaglamide A enhances natural killer cell-mediated lysis through inhibition of autophagy [32], another study showed that rocaglamide A can also act as a mitophagy inducer in pancreatic cancer cells [33]. This cell type-dependent role of PHB2 ligands in mitophagy could be related to the dual role of mitophagy in cell death and survival.

Mitophagy and, more generally, autophagy is a pro-survival stress response; however, prolonged over-activation of the



**Fig. 3 Fluorizoline inhibits Parkin-independent mitophagy.** A549 cells (CT) were treated for 24 h with 10  $\mu$ M CCCP or 1  $\mu$ M oligomycin/1  $\mu$ M antimycin A (OA) in the absence (UT) or presence of 5 or 10  $\mu$ M fluorizoline (F). m-Keima was measured by flow cytometry and it is expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$  independent experiments) of the percentage of mitophagy positive cells (A). Viability was measured by flow cytometry and it is expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$  independent experiments) of the percentage of non-apoptotic cells (annexin V-negative) (B). ### $p < 0.001$  CT versus CCCP and OA-treated cells; \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  UT versus F-treated cells.



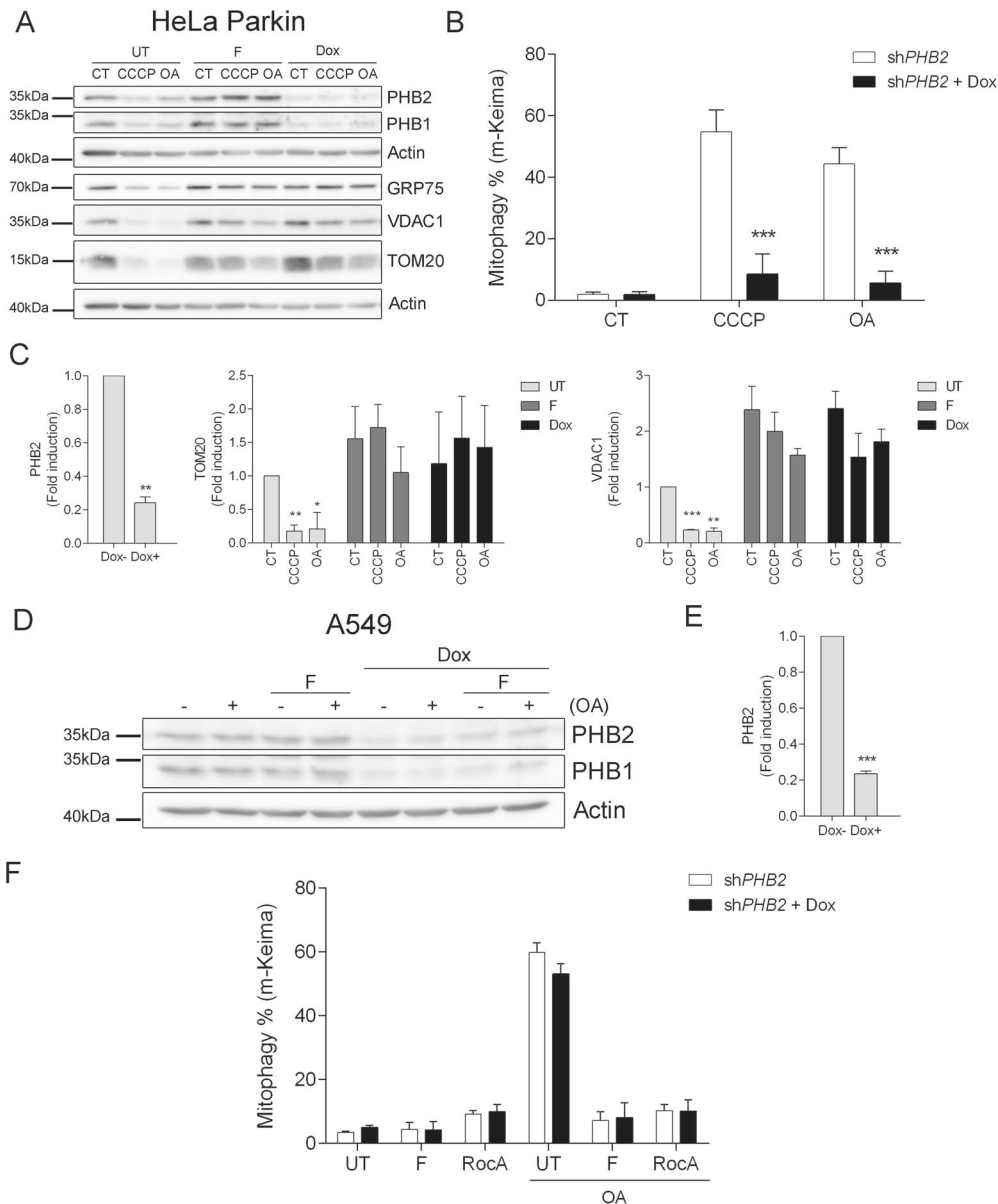
**Fig. 4 Fluorizoline prevents PINK1 stabilization in the OMM.** HeLa Parkin cells (CT) were treated for 16 h with 10  $\mu$ M CCCP or 1  $\mu$ M oligomycin/1  $\mu$ M antimycin A (OA) in the absence (UT) or presence of 10  $\mu$ M fluorizoline (F) (A). HeLa Parkin (B, C) and A549 (D, E) cells were treated for 6 h with or without 10  $\mu$ M CCCP or 1  $\mu$ M oligomycin/1  $\mu$ M antimycin A (OA) in the absence (UT) or presence of 10  $\mu$ M fluorizoline (F) or 500 nM rocaglamide A (RocA). Protein levels from whole-cell lysates were analyzed by western blot and actin was used as loading control. These are representative images of three independent experiments (A, B, D). PINK1 protein expression levels were quantified. Mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  independent experiments) (C, E). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  UT versus F or RocA-treated cells; # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$  CT versus CCCP and OA-treated cells.

autophagosomal/lysosomal pathway can lead to autophagic cell death [34]. A similar threshold is present to define the cellular outcome during the ISR and ER stress [35], both processes involved in the mechanism of fluorizoline-induced apoptosis [36]. While the stress response of these signaling pathways is pro-apoptotic in HeLa and HAP1 cells [36], it has a pro-survival role in HEK293T and U2OS cells [37]. Therefore, we hypothesize that the response to the ISR upon fluorizoline treatment might be coordinated with the inhibition or induction of mitophagy as a global adaptive response to prevent or to promote fluorizoline-induced apoptosis. In this hypothesis, the pro-apoptotic induction of the ISR by fluorizoline in HeLa cells would be accompanied by an inhibition of mitophagy, while the pro-survival activation of ISR

in HEK293T would be linked to an induction of mitophagy to prevent the apoptotic outcome of fluorizoline treatment.

Supporting this idea, it was demonstrated that inhibition of autophagy enhances ER stress-induced cisplatin cytotoxicity in HeLa cells [38]. Furthermore, mitophagy induction has been associated with drug resistance and the inhibition of autophagy can sensitize tumor cells to the cytotoxicity of anticancer drugs [39]. In addition, the UPR derived from ER stress can induce mitophagy to clear stress-damaged mitochondria [40].

This opens the possibility to use fluorizoline in combination with other chemotherapeutic treatments to avoid future resistances or to avoid ER stress pro-survival effects of anticancer drugs. There are several studies suggesting that mitophagy



**Fig. 5 Effect of PHB depletion in Parkin-dependent and -independent mitophagy.** HeLa Parkin shPHB2 cells (CT) were treated for 16 h with 10  $\mu$ M CCCP or 1  $\mu$ M oligomycin/1  $\mu$ M antimycin A (OA) in the absence (UT) or presence of 10  $\mu$ M fluorizoline (F), or after a 72 h 200 ng/mL doxycycline (Dox) treatment (**A**, **C**). HeLa Parkin shPHB2 cells (CT) were treated with 200 ng/mL doxycycline for 72 h and then treated with 10  $\mu$ M CCCP or 1  $\mu$ M oligomycin/1  $\mu$ M antimycin A (OA) for 16 h (**B**). A549 shPHB2 cells (CT), previously treated or not with 200 ng/mL doxycycline (Dox) for 72 h, were treated with 1  $\mu$ M oligomycin/1  $\mu$ M antimycin A (OA) for 24 h in the absence (UT) or presence of 10  $\mu$ M fluorizoline (F) or 500 nM rocaglamide A (RocA) (**D**, **F**). Protein levels from whole-cell lysates were analyzed by western blot and actin was used as a loading control. These are representative images of three independent experiments (**A**, **D**). m-Keima was measured by flow cytometry and referenced to their corresponding untreated controls and it is expressed as the mean  $\pm$  SEM ( $n=3$  independent experiments) of the percentage of mitophagy positive cells (**B**, **F**). PHB2, TOM20, and VDAC1 protein expression levels were quantified. Mean  $\pm$  SEM ( $n=3$  independent experiments) (**C**, **E**). \*\*\* $p < 0.001$  Dox-treated versus Dox-non treated cells (**B**); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  CT versus CCCP and OA-treated cells (**C**, **E**).

inhibitors in combination with conventional cancer treatment can markedly improve the effectiveness of chemotherapy [23, 41, 42]. However, it seems that both mitophagy inducers and inhibitors may be effective in anti-cancer therapy [20]. For instance, dihydroergotamine was shown to induce cell death in A549 cells by inducing mitophagy [43]. Also, mitochondrial fragmentation caused by the anti-cancer drug phenanthroline promotes mitophagy [44]. Moreover, mitophagy stimulated by low-intensity ultrasound therapy in the presence of curcumin induces cell death in nasopharyngeal carcinoma cells [45]. On the contrary, the inhibition of mitophagy can also represent an effective

strategy for therapy, as it has been demonstrated that it might enhance the cell death induced by several anticancer drugs. For instance, Drp1-GTPase MDIVI-1 inhibits mitophagy by disrupting the mitochondrial fragmentation process, which helps to overcome tumor cell resistance to cisplatin treatment [23]. Also, the mitophagy inhibitor liensinin sensitizes triple-negative human breast cancer cells to doxorubicin treatment [46].

Taken together, this study showed that pro-apoptotic PHB-binding compound fluorizoline can block the process of mitophagy in cancer cells. Furthermore, it also exposed the need to further analyze the role of mitophagy receptor PHB2 in

Parkin-independent mitophagy. In conclusion, besides a potent pro-apoptotic compound, we present fluorizoline as a promising new mitophagy modulator as an anticancer agent.

## REFERENCES

- Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and cancer. *Cell*. 2016;166:555–66.
- Miller DR, Thorburn A. Autophagy and organelle homeostasis in cancer. *Dev Cell*. 2021;56:906–18.
- Yao RQ, Ren C, Xia ZF, Yao YM. Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: a potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles. *Autophagy*. 2020;17:385–401.
- Montava-Garriga L, Ganley IG. Outstanding questions in mitophagy: what we do and do not know. *J Mol Biol*. 2020;432:206–30.
- Zachari M, Ktistakis NT. Mammalian mitophagosome formation: a focus on the early signals and steps. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:171.
- Villa E, Marchetti S, Ricci JE. No parkin zone: mitophagy without Parkin. *Trends Cell Biol*. 2018;28:882–95.
- Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology, and pathology. *Nat Cell Biol*. 2018;20:1013–22.
- Xie Y, Liu J, Kang R, Tang D. Mitophagy receptors in tumor biology. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:594203.
- Pérez-Perarnau A, Preciado S, Palmeri CM, Moncunill-Massagué C, Iglesias-Serret D, González-Gironès DM, et al. A trifluorinated thiazoline scaffold leading to pro-apoptotic agents targeting prohibitins. *Angew Chem*. 2014;53:10150–4.
- Pomares H, Palmeri CM, Iglesias-Serret D, Moncunill-Massagué C, Saura-Esteller J, Núñez-Vázquez S, et al. Targeting prohibitins induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. 2016;7:64987–65000.
- Cosíalls AM, Pomares H, Iglesias-Serret D, Saura-Esteller J, Núñez-Vázquez S, González-Gironès DM, et al. The prohibitin-binding compound fluorizoline induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through the upregulation of NOXA and synergizes with ibrutinib, 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside or venetoclax. *Haematologica*. 2017;102:1587–93.
- Cosíalls AM, Sánchez-Vera I, Pomares H, Perramon-Andújar J, Sanchez-Esteban S, Palmeri CM, et al. The BCL-2 family members NOXA and BIM mediate fluorizoline-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Biochem Pharm*. 2020;180:114198.
- Moncunill-Massagué C, Saura-Esteller J, Pérez-Perarnau A, Palmeri CM, Núñez-Vázquez S, Cosíalls AM, et al. A novel prohibitin-binding compound induces the mitochondrial apoptotic pathway through NOXA and BIM upregulation. *Oncotarget*. 2015;6:41750–65.
- Hernando-Rodríguez B, Artal-Sanz M. Mitochondrial quality control mechanisms and the PHB (prohibitin) complex. *Cells*. 2018;7:e238.
- Peng Y-T, Chen P, Ouyang R-Y, Song L. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis*. 2015;20:1135–49.
- Wei Y, Chiang WC, Sumpter R, Mishra P, Levine B. Prohibitin 2 is an inner mitochondrial membrane mitophagy receptor. *Cell*. 2017;168:224–38.
- Yan C, Gong L, Chen L, Xu M, Abou-Hamdan H, Tang M, et al. PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis. *Autophagy*. 2020;16:419–34.
- Sekine S, Kanamaru Y, Koike M, Nishihara A, Okada M, Kinoshita H, et al. Rhomboid protease PARL mediates the mitochondrial membrane potential loss-induced cleavage of PGAM5. *J Biol Chem*. 2012;287:34635–45.
- Xiao Y, Zhou Y, Lu Y, Zhou K, Cai W. PHB2 interacts with LC3 and SQSTM1 is required for bile acids-induced mitophagy in cholestatic liver. *Cell Death Dis*. 2018;9:160.
- Kulikov AV, Luchkina EA, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitophagy: link to cancer development and therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;482:432–9.
- Villa E, Proics E, Rubio-Patiño C, Obba S, Zunino B, Bossowski JP, et al. Parkin-independent mitophagy controls chemotherapeutic response in cancer cells. *Cell Rep*. 2017;20:2846–59.
- Yao N, Wang C, Hu N, Li Y, Liu M, Lei Y, et al. Inhibition of PINK1/Parkin-dependent mitophagy sensitizes multidrug-resistant cancer cells to B5G1, a new betulinic acid analog. *Cell Death Dis*. 2019;10:232.
- Qian W, Wang J, Roginskaya V, McDermott LA, Edwards RP, Stolz DB, et al. Novel combination of mitochondrial division inhibitor 1 (mdivi-1) and platinum agents produces synergistic pro-apoptotic effect in drug resistant tumor cells. *Oncotarget*. 2014;5:4180–94.
- Vara-Perez M, Felipe-Abrio B, Agostinis P. Mitophagy in cancer: a tale of adaptation. *Cells*. 2019;8:493.
- Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*. 2015;524:309–14.
- Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*. 2006;224:213–32.
- Katayama H, Kogure T, Mizushima N, Yoshimori T, Miyawaki A. A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery. *Chem Biol*. 2011;18:1042–52.
- Polier G, Neumann J, Thuaud F, Ribeiro N, Gelhaus C, Schmidt H, et al. The natural anticancer compounds rocaglamides inhibit the Raf-MEK-ERK pathway by targeting prohibitin 1 and 2. *Chem Biol*. 2012;19:1093–104.
- He J, Cooper HM, Reyes A, Di Re M, Kazak L, Wood SR, et al. Human C4orf14 interacts with the mitochondrial nucleoid and is involved in the biogenesis of the small mitochondrial ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:6097–108.
- Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, Geimer S, Löwer B, Wunderlich FT, et al. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev*. 2008;22:476–88.
- He B, Feng Q, Mukherjee A, Lonard DM, DeMayo FJ, Katzenellenbogen BS, et al. A repressive role for prohibitin in estrogen signaling. *Mol Endocrinol*. 2008;22:344–60.
- Yao C, Ni Z, Gong C, Zhu X, Wang L, Xu Z, et al. Rocaglamide enhances NK cell-mediated killing of non-small cell lung cancer cells by inhibiting autophagy. *Autophagy*. 2018;14:1831–44.
- Zhao C, He R, Shen M, Zhu F, Wang M, Liu Y, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy regulation by reactive oxygen species alleviates rocaglamide A-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Front Pharm*. 2019;10:968.
- Linder B, Kögel D. Autophagy in cancer cell death. *Biology*. 2019;8:82.
- Muñoz-Pinedo C, Martin SJ. Autosis: a new addition to the cell death tower of babel. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1319.
- Núñez-Vázquez S, Sánchez-Vera I, Saura-Esteller J, Cosíalls AM, Noisier A, Albericio F, et al. NOXA upregulation by the prohibitin-binding compound fluorizoline is transcriptionally regulated by integrated stress response-induced ATF3 and ATF4. *FEBS J*. 2021;288:1271–85.
- Saura-Esteller J, Sánchez-Vera I, Núñez-Vázquez S, Cosíalls AM, Gama-Pérez P, Bhosale G, et al. The prohibitin-binding compound fluorizoline activates the integrated stress response due to increased ER-stress in human cell lines. *Int J Mol Sci*. 2021;22:6117.
- Xu Y, Yu H, Qin H, Kang J, Yu C, Zhong J, et al. Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells. *Cancer Lett*. 2012;314:232–43.
- Hu YL, Jahangiri A, DeLay M, Aghi MK. Tumor cell autophagy as an adaptive response mediating resistance to treatments such as antiangiogenic therapy. *Cancer Res*. 2012;72:4294–9.
- Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci*. 2015;40:141–8.
- Gharanei M, Hussain A, Janneh O, Maddock H. Attenuation of doxorubicin-induced cardiotoxicity by mdivi-1: a mitochondrial division/mitophagy inhibitor. *PLoS One*. 2013;8:e77713.
- Wang J, Hansen K, Edwards R, Van Houten B, Qian W. Mitochondrial division inhibitor 1 (mdivi-1) enhances death receptor-mediated apoptosis in human ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;456:7–12.
- Chang SH, Lee AY, Yu KN, Park J, Kim KP, Cho MH. Dihydroergotamine tartrate induces lung cancer cell death through apoptosis and mitophagy. *Chemotherapy*. 2016;61:304–12.
- Park SJ, Shin JH, Kim ES, Jo YK, Kim JH, Hwang JJ, et al. Mitochondrial fragmentation caused by phenanthroline promotes mitophagy. *FEBS Lett*. 2012;586:4303–10.
- Wang X, Leung AW, Luo J, Xu C. TEM observation of ultrasound-induced mitophagy in nasopharyngeal carcinoma cells in the presence of curcumin. *Exp Ther Med*. 2012;3:146–8.
- Zhou J, Li G, Zheng Y, Shen HM, Hu X, Ming QL, et al. A novel autophagy/mitophagy inhibitor liensinine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy through DNMI1-mediated mitochondrial fission. *Autophagy*. 2015;11:1259–79.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Scientific and Technological Centers of the Bellvitge Campus at the University of Barcelona. This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación and ERDF (SAF2017-83178-R), the Fondation ARC, the Cancéropole PACA, the French Government (National Research Agency, ANR) through the 'Investments for the Future' programs LABEX SIGNALIFE ANR-11-LABX-0028-01 and IDEX UCJedi ANR-15-IDEX-01 and by La Ligue contre le Cancer. SN-V was recipient of a research fellowship from Universitat de Barcelona and Fondation pour la Recherche Médicale-FRM and an exchange fellowship from Fundació Universitaria Agustí Pedro i Pons from Universitat de Barcelona. JS-E and IS-V were recipients of research fellowships from the Ministerio de Ciencia e Innovación.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

SN-V, DI-S, JER, SM, and JG conceived and designed the experiments. SN-V carried out the experiments. JS-E, IS-V, EG, and AMC contributed to the interpretation of the results. EG aided with the acquisition and interpretation of the confocal microscopy images. GP designed and developed the *shPHB2* lentiviral particles. SN-V wrote the paper with the support from DI-S, JER, SM, and JG. All the authors revised the paper critically and approved the final version to be published.

## COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00352-9>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Joan Gil.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

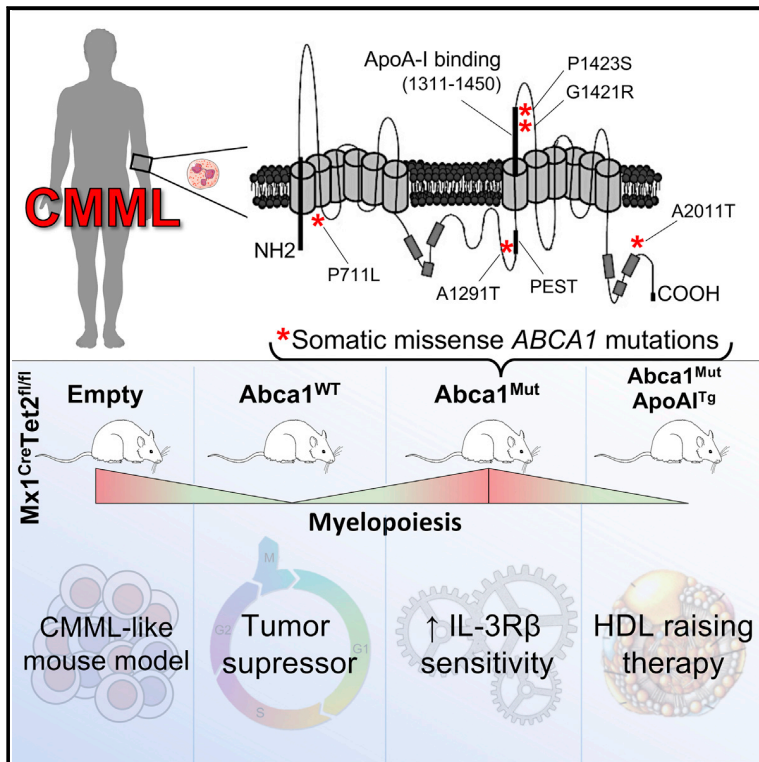
© The Author(s) 2021



# Cell Reports

## ABCA1 Exerts Tumor-Suppressor Function in Myeloproliferative Neoplasms

### Graphical Abstract



### Authors

Manon Viaud, Omar Abdel-Wahab, Julie Gall, ..., Ross L. Levine, Alan R. Tall, Laurent Yvan-Charvet

### Correspondence

yvancharvet@unice.fr

### In Brief

Viaud et al. show that *ABCA1* mutants identified in CMML patients diminish the tumor-suppressor functions of *ABCA1* and cooperate with *Tet2* loss to confer the hypersensitivity of myeloid progenitors to IL-3 receptor  $\beta$  canonical signaling, which can be prevented by raising HDL levels.

### Highlights

- *ABCA1* somatic mutations were identified in CMML patients
- *ABCA1* mutations fail to repress myeloproliferative neoplasms in *Tet2*-deficient mice
- *ABCA1* mutations sustain IL-3R $\beta$  signaling-driven myelopoiesis in *Tet2*-deficient HSPCs
- Overexpression of apoA-1 overcomes *ABCA1/TET2* co-mutant myeloproliferative neoplasms



Viaud et al., 2020, Cell Reports 30, 3397–3410  
 March 10, 2020 © 2020 The Author(s).  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.056>

CellPress

# ABCA1 Exerts Tumor-Suppressor Function in Myeloproliferative Neoplasms

Manon Viaud,<sup>1,4</sup> Omar Abdel-Wahab,<sup>2,4</sup> Julie Gall,<sup>1,4</sup> Stoyan Ivanov,<sup>1</sup> Rodolphe Guinamard,<sup>1</sup> Sophie Sore,<sup>1</sup> Johanna Merlin,<sup>1</sup> Marion Ayrault,<sup>1</sup> Emma Guilbaud,<sup>1</sup> Arnaud Jacquet,<sup>1</sup> Patrick Auberger,<sup>1</sup> Nan Wang,<sup>3</sup> Ross L. Levine,<sup>2</sup> Alan R. Tall,<sup>3</sup> and Laurent Yvan-Charvet<sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1065, Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Atip-Avenir, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Oncoage, 06204 Nice, France

<sup>2</sup>Human Oncology and Pathogenesis Program and Leukemia Service, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA

<sup>3</sup>Division of Molecular Medicine, Department of Medicine, Columbia University, New York, NY 10032, USA

<sup>4</sup>These authors contributed equally

<sup>5</sup>Lead Contact

\*Correspondence: [yvancharvet@unice.fr](mailto:yvancharvet@unice.fr)

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.056>

## SUMMARY

Defective cholesterol efflux pathways in mice promote the expansion of hematopoietic stem and progenitor cells and a bias toward the myeloid lineage, as observed in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). Here, we identify 5 somatic missense mutations in *ABCA1* in 26 patients with CMML. These mutations confer a proliferative advantage to monocytic leukemia cell lines *in vitro*. *In vivo* inactivation of *ABCA1* or expression of *ABCA1* mutants in hematopoietic cells in the setting of *Tet2* loss demonstrates a myelosuppressive function of *ABCA1*. Mechanistically, *ABCA1* mutations impair the tumor-suppressor functions of WT *ABCA1* in myeloproliferative neoplasms by increasing the IL-3R $\beta$  signaling via MAPK and JAK2 and subsequent metabolic reprogramming. Overexpression of a human apolipoprotein A-1 transgene dampens myeloproliferation. These findings identify somatic mutations in *ABCA1* that subvert its anti-proliferative and cholesterol efflux functions and permit the progression of myeloid neoplasms. Therapeutic increases in HDL bypass these defects and restore normal hematopoiesis.

## INTRODUCTION

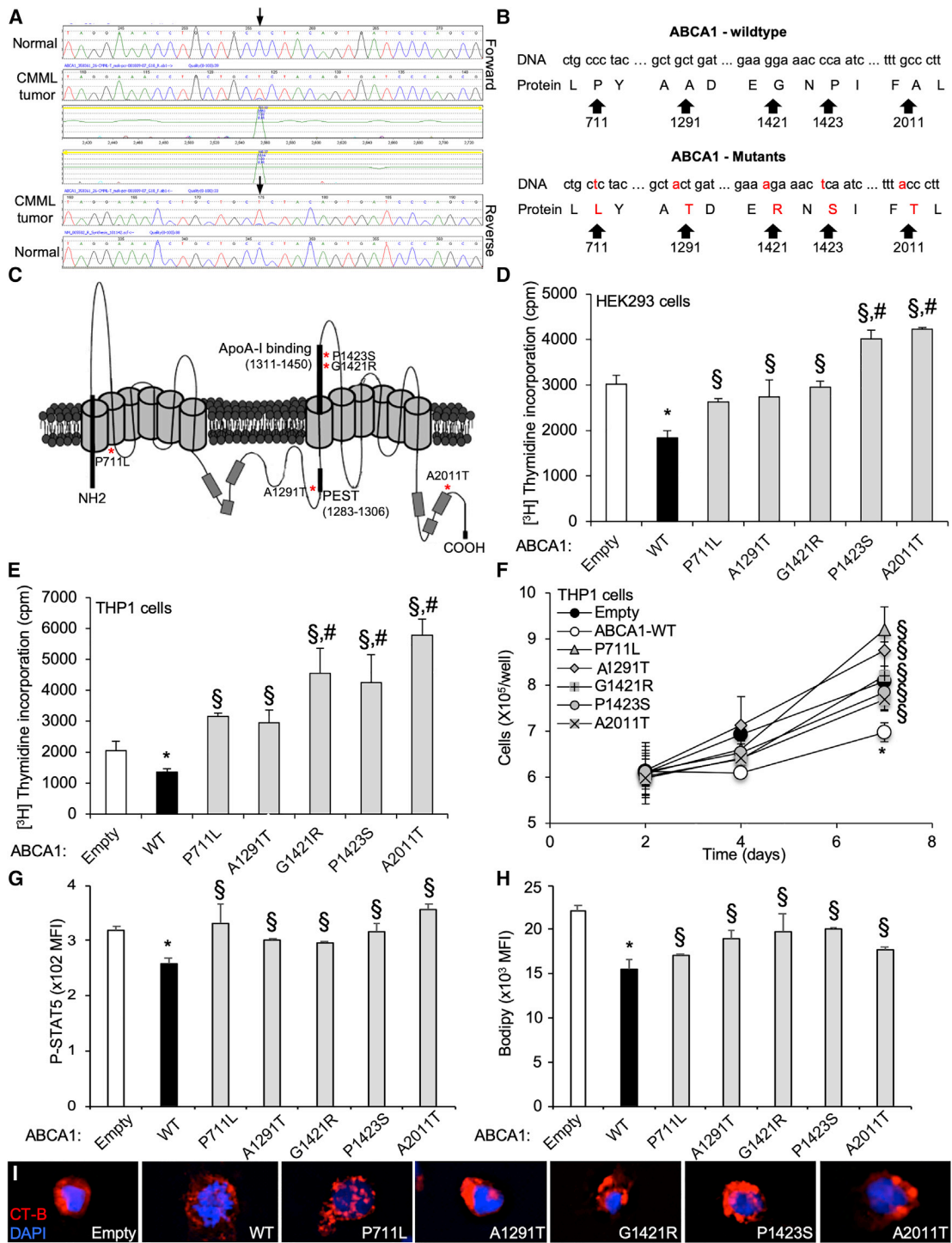
Most human adult cancers develop through a multistep acquisition of a wide range of somatic mutations that initiate or maintain self-renewal of the malignant clone. The elucidation of the somatic mutational landscape of many solid tumors and hematologic malignancies has occurred in the last decade (Sjöblom et al., 2006; Ley et al., 2013). These mutations are referenced in the Catalog of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) and The Cancer Genome Atlas (TCGA) and may provide potential insights into the mechanisms underlying cancer. In myeloid malignancies, hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) acquire specific combinations of leukemia disease alleles required to promote hematopoietic transformation (Shih et al.,

2015; Kunimoto et al., 2018). Recent studies have shown that mutations in a small number of genes, including loss-of-function mutations in ten-eleven translocation 2 (*TET2*) are common in the elderly and provide a proliferative advantage to hematopoietic stem cells (HSCs), giving rise to clonal hematopoiesis (Busque et al., 2012). Clonal hematopoiesis mutations are associated with an  $\sim$ 10-fold increase in the risk of developing a hematological malignancy, including myeloproliferative disorders and leukemias and a 2- to 3-fold risk of developing atherosclerotic cardiovascular disease (CVD).

Increased high-density lipoprotein (HDL) levels are well known to be associated with a reduced risk of CVD. A recent meta-analysis of randomized controlled trials of lipid-altering therapies revealed that for every 10-mg/dL increase in the plasma HDL-cholesterol level among trial participants, there was a 36% lower risk of cancer incidence during >625,000 person-years of follow-up and >8,000 incident cancers (Jafri et al., 2010). While not establishing causation, this association suggests that HDL may be linked to tumor cell biology in humans. The ability of HDL and its apolipoproteins to promote the efflux of cholesterol from cells depends in part on the ATP-binding cassette transporters *ABCA1* and *ABCG1*, but it can also be mediated by scavenger receptor B1 and passive efflux pathways (Tall and Yvan-Charvet, 2015). The reduced expression of cholesterol efflux mediators and the increased levels of cellular cholesterol have been associated with different solid tumors; however, it is unclear whether these are secondary changes or have a role in promoting cell proliferation (Bovenga et al., 2015; Clendening and Penn, 2012; Dang, 2012; Lin and Gustafsson, 2015; Mullen et al., 2016). Mice with defective cholesterol efflux in hematopoietic cells develop progressive myeloid expansion with an underlying dramatic HSPC expansion in the bone marrow (BM), an enhanced interleukin-3-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (IL-3-GM-CSF) signaling pathway, and marked extramedullary hematopoiesis (Murphy et al., 2011; Wang et al., 2014; Westerterp et al., 2012; Yvan-Charvet et al., 2010). We also demonstrated that HDL-raising therapies could limit *Mpl*-W515L and *Fit3*-ITD-driven myeloproliferative disorders (Gautier et al., 2013).

While these findings suggest a potential role for cholesterol efflux pathways in modulating the development of myeloid





**Figure 1. Identification of Loss of Function ABCA1 Mutants in CMML**

Forward (upper trace) and reverse (lower trace) sequence traces of ABCA1 gene demonstrating a heterozygous cytosine-to-thymine substitution (arrows) present in myeloid cell DNA from patients with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). The mutation is not present in buccal DNA from the same patient (upper trace). (A and B) DNA sequence (A) and protein translation (B) for both the wild-type (WT) and mutant ABCA1 alleles. The mutations result in amino acid substitution at codons 711, 1,291, 1,421, 1,423, and 2,011.

(C) Representative 3D structure of ABCA1 transporter. The asterisks represent localizations of ABCA1 mutants.

(legend continued on next page)

malignancies and leukemias, they have not established a causative role of specific somatic mutations in cholesterol efflux genes in these disorders. Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is typically a disease of the elderly with few treatment options. Recent studies in CMML patients have shown changes reminiscent of those observed in mice with defective cholesterol efflux in hematopoietic cells, including: (1) frequently mutated tumor-suppressor genes encoding regulators of GM-CSF signaling (RAS, CBL), (2) hypersensitivity of myeloid progenitors to GM-CSF, and (3) a proportion of “classical” CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes >94% (Itzykson et al., 2017). In addition, these patients often have mutations in genes associated with clonal hematopoiesis, including TET2 and ASXL1. In the present study, we have used high-throughput sequencing to identify mutations in *ABCA1* in CMML patient samples. Further studies in a mouse model of myeloproliferative neoplasms driven by hematopoietic Tet2 deficiency have shown that these somatic mutations abrogate the tumor-suppressor function of WT *ABCA1*, resulting in the failure to suppress canonical IL3-receptor  $\beta$  (IL-3R $\beta$ ) signaling-driven myelopoiesis. The loss of the myelosuppressive function of *ABCA1* mutants can be overcome by raising HDL levels through the overexpression of the human apolipoprotein A-1 (apoA-1) transgene.

## RESULTS

### Identification of *ABCA1* Somatic Mutations in CMML

Sequencing of full-length *ABCA1*, *ABCG1*, and *NR1H2/3* (liver X receptors [LXR]) in 26 CMML samples revealed a somatic mutational frequency of 19% of samples for *ABCA1* (n = 5) and 0% for *ABCG1* and *NR1H2/3*. All of the mutations were somatic missense mutations, with only 1 mutation observed in each patient sample (Figures 1A and S1A; Table S1). The identity of the paired samples was verified by Sequenom single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping, demonstrating that the likelihood of a match occurring by chance was  $<1 \times 10^{-13}$  (data not shown). These *ABCA1* mutations occur in evolutionarily conserved regions (Figures 1B and 1C). The *ABCA1* mutations have not been previously described, even though different *ABCA1* mutations have been identified in Tangier disease (Brunham et al., 2006; Sjöblom et al., 2006). Sequencing of other genes implicated in the pathogenesis of CMML in the same samples revealed that *ABCA1* mutations co-existed with known oncogenic mutations in JAK2, Flt3, and N-Ras (Emanuel, 2008). We noted that (1) of the 4 genes sequenced, somatic non-synonymous mutations were found in only 2 of the 4 genes and (2) the somatic nonsynonymous mutation rate for *ABCA1* was higher than the expected background silent mutation rate and higher than expected by chance alone by binomial tests

( $p = 3.6 \times 10^{-10}$  for *ABCA1*), suggesting that mutations in *ABCA1* do not represent passenger gene effects.

### Functional Analysis of *ABCA1* Mutations *In Vitro*

Given the key role of the *ABCA1*-dependent cholesterol efflux pathway in controlling myeloid expansion (Tall and Yvan-Charvet, 2015), we sought to test whether *ABCA1* CMML mutations affect cellular proliferation. We used site-directed mutagenesis to introduce each of these 5 somatic mutations individually into the *ABCA1* cDNA. To compare the ability of *ABCA1* mutants to control proliferation, we transiently transfected HEK293 cells with the *ABCA1* cDNAs. Overexpression of wild-type (WT)-*ABCA1* resulted in an  $\sim 1.7$ -fold decrease in cell proliferation compared with empty vector-transfected cells (Figure 1D). All of the mutants located in either the N- and C-terminal regions (P711L and A2011T), the PEST sequence (A1291T), or the apoA-1 binding region (G1421R and P1423S) exhibited a significant reduction in anti-proliferative activity (Figures 1C and 1D). We also tested the relevance of these *ABCA1* mutations in human THP-1 monocytic leukemia cell lines that express endogenous *ABCA1* (Figure S1B). *ABCA1-P711L*, *ABCA1-A1291T*, *ABCA1-G1421R*, *ABCA1-P1423S*, and *ABCA1-A2011T* displayed reductions in anti-proliferative activity, compared to *ABCA1-WT* in lentivirus-transduced cells (Figure 1E), which is consistent with observations in HEK293 cells. Although the proliferation rate of THP1 cells was slowed down by transient transfection, we showed a growth advantage of all mutations over a culture period of 1 week compared to WT-*ABCA1* expression (Figure 1F). Stable cell lines expressing *ABCA1-G1421R* and *ABCA1-A2011T* (Figure S1C) with a normal proliferation rate showed growth and proliferative advantages compared to *ABCA1-WT* (Figures S1D and S1E). We also observed an activation of the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) signaling pathway in *ABCA1* mutant-transduced cells compared to WT-*ABCA1*, as illustrated by the higher levels of pSTAT5 quantified by flow cytometry (Figure 1G). Because the assessment of cholesterol efflux capacity is not practical in suspension cells, we next tested the dependence of *ABCA1* mutations on their efflux capacity in differentiated THP-1 macrophages. In this setting, 3 of the 5 *ABCA1* mutations (*ABCA1-A1291T*, *ABCA1-G1421R*, and *ABCA1-P1423S*) showed a decrease in the ability of apoA-1 to promote cholesterol efflux compared with WT-*ABCA1* (Figure S1F). Nevertheless, quantification of BODIPY (bore-dipyromethene)-neutral lipid staining revealed higher neutral lipid accumulation in *ABCA1* mutant-transduced cells compared to WT-*ABCA1* (Figure 1H). The quantification of cellular cholesterol content confirmed these findings (Figure S1G). The increased proliferation of these cells was also associated with increased cholera

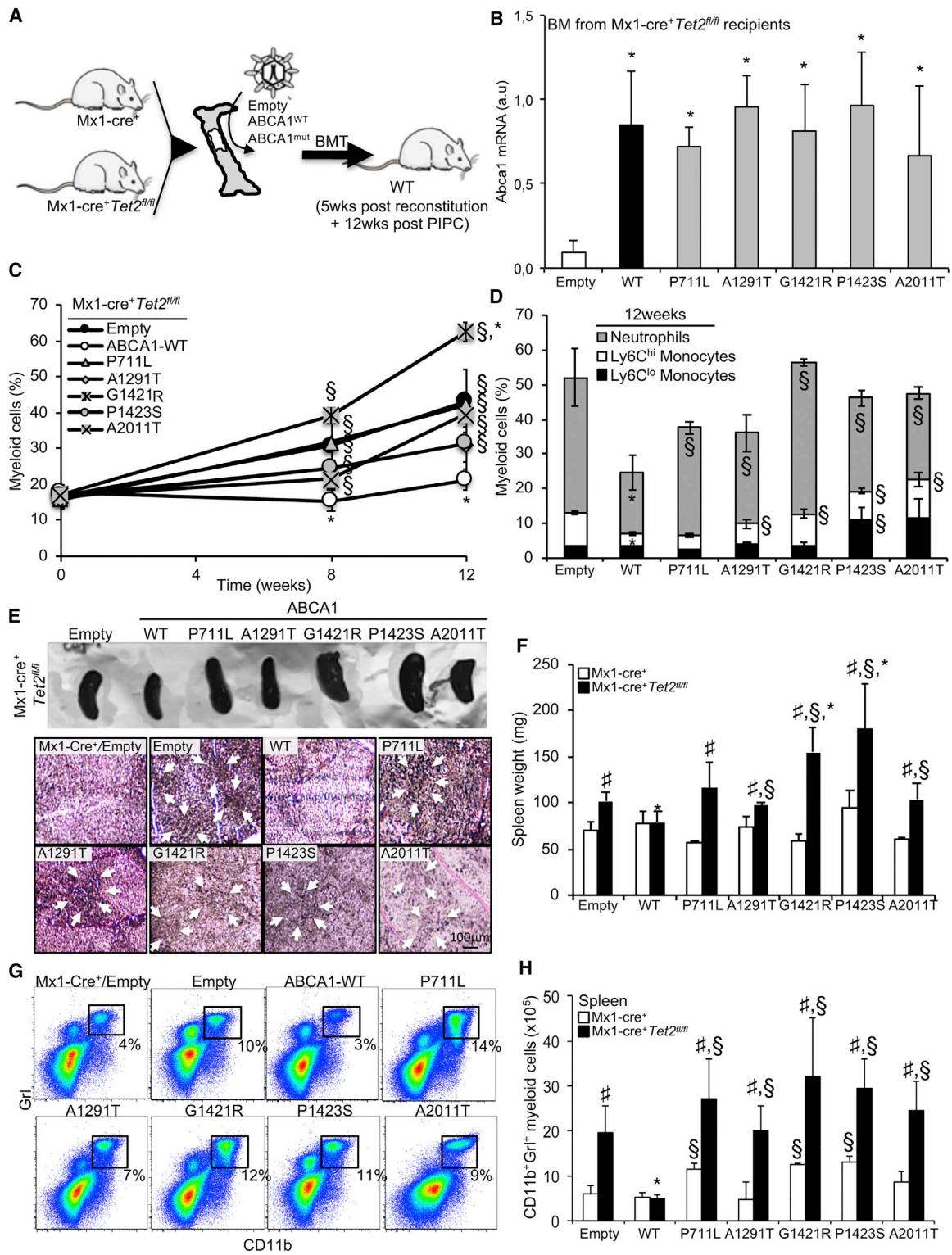
(D and E) [<sup>3</sup>H]-Thymidine proliferation assays (pulsed for 2 h) were performed in HEK293 cells transiently transfected with plasmid constructs expressing *ABCA1-WT* and *ABCA1* mutants or empty vector (D), or in THP-1 monocytic leukemia cells transduced for 72 h with lentiviral particles expressing *ABCA1-WT*, *ABCA1* mutants or empty vector (E).

(F) THP-1 cells transduced for 72 h with *ABCA1* mutants exhibit growth advantage over a 7-day period compared with *ABCA1-WT*.

(G and H) Expression of phosphoSTAT5 (G) and BODIPY staining (H) determined by flow cytometry in these cells.

(I) Confocal images of lipid raft staining in THP-1 cells transduced for 72 h with empty, *ABCA1-WT*, and *ABCA1* mutants.

Values are means  $\pm$  SEMs of at least 3 experiments performed in triplicate. \* $p < 0.05$  *ABCA1-WT* versus empty control. # $p < 0.05$  *ABCA1* mutants versus empty control. § $p < 0.05$  versus *ABCA1-WT*.



**Figure 2. Loss of Functional ABCA1 Reduces Tumor Suppression in Myelomonocytic Leukemia Induced by Tet Loss**

(A) Experimental overview. BM from Mx1-Cre<sup>+</sup> or Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> mice were transduced with lentiviral particles expressing ABCA1-WT, ABCA1 mutants, or empty vector before bone marrow transplantation (BMT) into lethally irradiated WT mice, and after a 5-week recovery period, the mice were injected with poly(I:C) and analyzed over a 12-week-period.

(legend continued on next page)

toxin subunit B (CTx-B) staining of *ABCA1* mutant-transduced cells compared to WT-*ABCA1* at the cell surface (*ABCA1-A1291T*, *ABCA1-G1421R*, and *ABCA1-P1423S*) or in intracellular endosomal-like structure (*ABCA1-P711L* and *ABCA1-A2011T*) (Figure 1I), suggesting the increased formation of cholesterol-rich lipid raft or perturbed intracellular cholesterol trafficking (Dietrich et al., 2001).

### ***ABCA1* Mutants Associated with CMML Fail to Suppress Myelopoiesis In Vivo**

Previous studies have suggested that the loss of *ABCA1* function alone is insufficient to promote prominent myelopoiesis in hypercholesterolemic mice (Yvan-Charvet et al., 2010). We hypothesized that the proliferative effects of *ABCA1* mutants observed in CMML may become more evident when combined with other CMML mutant alleles. Tet2 inactivation through loss-of-function mutation is commonly found in CMML (Bowman and Levine, 2017; Solary et al., 2014). Therefore, to assess the *in vivo* effects of *ABCA1* mutants, BM cells from WT or Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> mice (i.e., mice bearing the conditional Tet2 allele and the interferon-inducible Cre transgene) were transduced with pLKO-Puro-GFP lentiviral vectors containing WT-*ABCA1* or *ABCA1* mutants and transplanted into lethally irradiated C57BL/6J mice (Figure 2A). Animals were analyzed 5 weeks after BM reconstitution (T0) and at the indicated time point following polyinosinic:polycytidylic acid (PIPC) injection (Figure 2A). Consistent with earlier works (Moran-Crusio et al., 2011; Quivoron et al., 2011), we observed the loss of Tet2 expression in the BM of WT recipient mice transplanted with Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> BM compared to Mx1-Cre<sup>+</sup> BM (Figure S2A), and ablation of the gene was paralleled by a significant reduction in hydroxylation of 5-methylcytosine (5hmC) in a pool of peripheral blood cells, which reflect the enzymatic activity of TET2 (Figure S2B). Quantification of *Abca1* mRNA expression confirmed similar levels of overexpression of *ABCA1*-WT and mutants in the BM of Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> recipients (Figure 2B) and controls (data not shown). Despite similar leukocyte counts (Figure S2C), the overexpression of WT-*ABCA1* on a Tet2-deficient background caused a marked reduction in myeloid cells (Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup>) in blood over time (Figure 2C), reflecting mainly lower inflammatory Ly6C<sup>hi</sup> monocyte and neutrophil counts (Figures 2D and S2D). In contrast, *ABCA1* mutant-expressing animals on a Tet2-deficient background exhibited higher peripheral myeloid cells (both monocytes and neutrophils) compared to *ABCA1*-WT-transduced animals (Figures 2C, 2D, and S2D). These effects were not

observed when *ABCA1*-WT or mutants were transduced on a WT background (Figures S2E and S2F). T and B cell numbers and hematocrit and platelet counts were normal on both backgrounds (data not shown). These data indicate that *ABCA1* mutants impede the protective effect of *ABCA1*-WT in preventing myeloid expansion on a Tet2-deficient background. The 5 *ABCA1* mutations identified in CMML patients were found to be loss-of-function mutations, as demonstrated by their failure to suppress blood leukocyte counts in the setting of Tet2 deficiency.

### ***ABCA1* Mutants Fail to Prevent CMML-Associated Extramedullary Hematopoiesis and Splenomegaly**

The overexpression of *ABCA1*-WT suppressed the splenomegaly of animals transplanted with Tet2-deficient BM (Figures 2E and 2F). Despite a variability within the groups, this was statistically not observed in *ABCA1* mutant-transduced animals on a Tet2-deficient background (Figure 2F). Although the median survival of Tet2-deficient mice was estimated to be 560 days (Kunitomo et al., 2018), the Kaplan-Meier survival curve indicated that the survival of *ABCA1*-WT-transduced animals on a Tet2-deficient background is significantly better compared to empty vector-transduced animals and *ABCA1* mutant-transduced animals over a 140-day period (Figure S2G). Pathological examination revealed a robust infiltration of myeloid cells, including significant destruction of normal spleen architecture in *ABCA1* mutant-transduced animals on a Tet2-deficient background compared to *ABCA1*-WT transduced animals, similar to what was observed in empty vector-transduced animals (Figure 2E). Flow analysis of the spleen confirmed an increased proportion and number of CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> myeloid cells in *ABCA1* mutant-transduced animals on a Tet2-deficient background, and to some extent, on a WT background, compared to *ABCA1*-WT-transduced animals (Figures 2G, 2H, and S2H). An increased percentage of HSPCs (LSK cells [Lineage<sup>-</sup> Sca1<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup>]) was also observed in the spleens of *ABCA1* mutant-transduced animals compared to *ABCA1*-WT-transduced animals (Figure S2I). Thus, unlike WT *ABCA1*, specific *ABCA1* mutants associated with human CMML were unable to limit the increased extramedullary hematopoiesis and splenomegaly that are classical features of CMML.

### ***ABCA1* Mutants Fail to Suppress Expansion and Myeloid Bias of Tet2-Deficient HSPCs**

Tet2 loss or defective cholesterol efflux pathways leads to BM HSPCs and differentiation toward a myeloid lineage fate *in vivo*

(B) Modulation of *Abca1* mRNA expression levels in the BM of the aforementioned mouse models.

(C) Quantification of the percentage of peripheral blood myeloid cells determined by hematology cell counter over the course of 12 weeks after poly(I:C) injection in recipient mice transplanted with empty, *ABCA1*-WT, or *ABCA1* mutants expressing Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> BM.

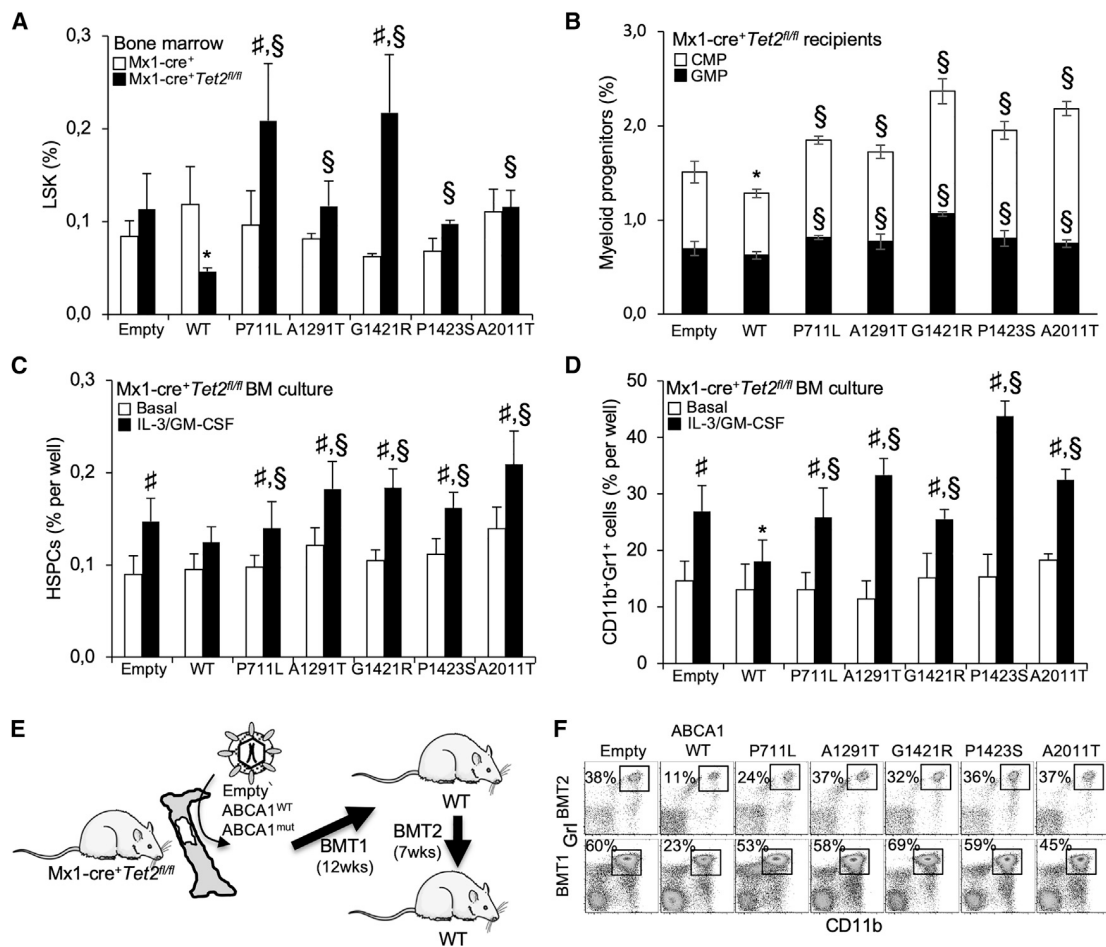
(D) Peripheral blood myeloid subsets (CD115<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> and CD115<sup>+</sup>Ly6C<sup>lo</sup> monocytes and CD115<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup> neutrophils) were also quantified in these mice at the indicated time point.

(E) Representative spleen (upper panel) and hematoxylin and eosin (H&E) staining of paraffin-embedded spleen sections from recipient mice transplanted with control or Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> BM expressing empty, *ABCA1*-WT, or *ABCA1* mutants (lower panel). Original magnification × 200. Arrows indicate extensive cellular infiltrate.

(F) Quantification of spleen weight of these mice.

(G and H) Representative dot plot (G) and quantification (H) of CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> myeloid cells determined by flow cytometry in the spleens of recipient mice transplanted with control or Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> BM expressing empty, *ABCA1*-WT, or *ABCA1* mutants.

The results are means ± SEMs of 5–9 animals per group. ND, not detectable. \*p < 0.05 versus empty control on a Tet2-deficient background. §p < 0.05 versus *ABCA1*-WT. #p < 0.05 and ##p < 0.001 versus Mx1-Cre<sup>+</sup> controls.



**Figure 3. ABCA1 Mutants Support Tet2-Deficient HSPC Expansion and Myeloid Lineage Commitment and Spreads CMML-like Disease in Serial BM Transplantation**

(A and B) Quantification of hematopoietic stem (A) and progenitor (B) cells in the BM of recipient mice transplanted with control or Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> BM expressing empty, ABCA1-WT, or ABCA1 mutants. Lineage(Lin)<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup> LSK cells are hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs); Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>hi</sup>FcγR<sup>hi</sup> are granulocyte-monocyte progenitors (GMPs); and Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>hi</sup>FcγR<sup>low</sup> are common myeloid progenitors (CMPs). The results are the means ± SEMs of 5–9 animals per group.

(C and D) The quantification of hematopoietic progenitors (C) and myeloid cells (D) in BM cultures isolated from Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> BM expressing empty, ABCA1-WT, or ABCA1 mutants and grown *ex vivo* for 72 h in liquid culture in the presence or absence of 6 ng/mL IL-3 and 2 ng/mL GM-CSF. The results are the means ± SEMs of experiments performed in triplicate.

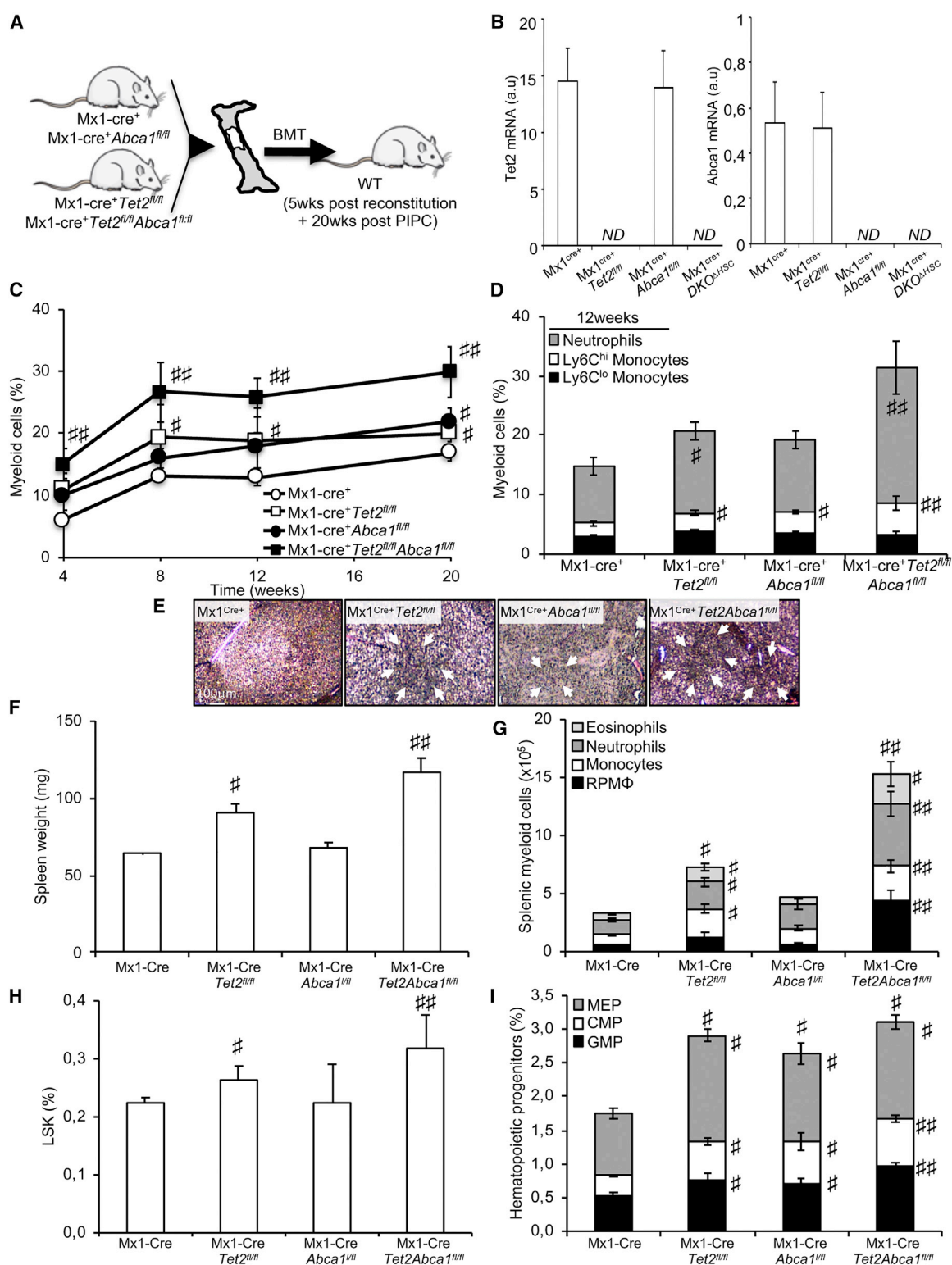
(E) Experimental overview. BM from WT and ABCA1 mutant-transduced animals on a Tet2-deficient background were serially transplanted into lethally irradiated WT mice and analyzed 7 weeks later.

(F) Quantification of the percentage of peripheral blood CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> myeloid cells was determined by flow cytometry at the end of the study period. The results are means ± SEMs.

\*p < 0.05 versus empty control transduced animals on a Tet2-deficient background. §p < 0.05 versus ABCA1-WT. #p < 0.05 and ##p < 0.001 versus Mx1-Cre<sup>+</sup> controls.

(Moran-Crusio et al., 2011; Quivoron et al., 2011; Yvan-Charvet et al., 2010). Analysis of the BM HSPCs showed a reduction in the LSK cells in ABCA1-WT-transduced animals on a Tet2-deficient background compared to empty control-transduced animals. This effect was lost in ABCA1 mutant-transduced animals (Figure 3A). Although ABCA1 mutants barely altered the percentage of BM megakaryocyte-erythrocyte progenitors (MEPs; Lineage<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>low</sup>FcγR<sup>low</sup>) (Figures S3A and S3B) and the granulocyte-monocyte progenitors (GMPs; Lineage<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>hi</sup>FcγR<sup>hi</sup>) and the common myeloid pro-

genitors (CMPs; Lineage<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>hi</sup>FcγR<sup>low</sup>) were significantly increased in ABCA1 mutant-transduced BM compared to ABCA1-WT-transduced BM both on WT (Figures S3A and S3B) and Tet2-deficient backgrounds (Figure 3B). To determine whether ABCA1 mutants engage HSPCs to differentiate into the myelomonocytic lineages, BM cells from ABCA1 mutant-transduced animals were cultured *ex vivo* in the presence of IL-3 and GM-CSF. BM cultures showed that ABCA1 mutants disengaged the suppressive effects of ABCA1 on HSPC expansion (Figure 3C) and myeloid lineage expansion (Figure 3D)



**Figure 4. ABCA1 Invalidation Propagates Myelopoiesis and Accelerates Extramedullary Hematopoiesis on a Tet2-Deficient Background**  
 (A) Experimental overview. BM from Mx1-Cre<sup>+</sup>, Mx1-Cre<sup>+</sup>Abca1<sup>fl/fl</sup>, Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup>, and Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup>Abca1<sup>fl/fl</sup> mice were transplanted into lethally irradiated WT mice, and after a 5-week recovery period, the mice were injected with poly(I:C) and analyzed over a 20-week period.  
 (B) Modulation of Abca1 and Tet2 mRNA expression levels in the BM of the aforementioned mouse models.

(legend continued on next page)

in the Tet2-deficient background. These findings suggest that in contrast to *ABCA1-WT*, *ABCA1* mutants allow Tet2-deficient HSPCs to proliferate and to favor myelopoiesis as a result of increased IL-3-GM-CSF signaling. Of note, in secondary transplants (Figure 3E), *ABCA1* mutant-transduced animals had a significantly higher percentage of peripheral Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> myeloid cells compared to *ABCA1-WT*-transduced animals (Figure 3F) and failed to suppress splenomegaly (Figure S3C) or splenic cholesterol accumulation (Figure S3D). These findings confirm that *ABCA1* inactivation not only confers a significant competitive advantage to Tet2-deficient HSPCs *in vivo* but also enhances a TET2-induced transplantable myeloproliferative disorder.

### ***ABCA1* Deficiency Cooperates with Tet2 Loss to Propagate Myeloid Transformation**

In parallel, we crossed Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> mice (Moran-Crusio et al., 2011; Quivoron et al., 2011) to Abca1<sup>fl/fl</sup> mice (Yvan-Charvet et al., 2010) to generate Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup>Abca1<sup>fl/fl</sup> (referred to subsequently as DKO<sup>ΔHSC</sup> [double knockout, DKO]) mice. BM cells from these mice were subsequently transplanted into lethally irradiated C57BL/6J mice (Figure 4A). Animals were analyzed 5 weeks after BM reconstitution (T0) and at the indicated time point following PIPC injection (Figure 4A). We confirmed the excision of both Tet2 and Abca1 mRNA expression in the BM of Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> mice and Mx1-Cre<sup>+</sup>Abca1<sup>fl/fl</sup> mice, respectively (Figure 4B). DKO<sup>ΔHSC</sup> mice also underwent a marked increase in peripheral myeloid cells compared to single Abca1 or Tet2-deficient mice (Figures 4C, 4D, and S4A). These findings show a cooperative effect between *ABCA1* and *Tet2* mutations on myeloid expansion. In addition, Abca1 deficiency exacerbated the splenomegaly of Tet2-deficient animals, while having no effect on its own (Figures 4E and 4F). DKO<sup>ΔHSC</sup> mice also exhibited higher myeloid cell infiltration compared to single-KO mice after pathological examination (Figure 4E), with an increased percentage and number of eosinophil, neutrophil, monocyte, and red pulp macrophages (RPMs) determined by flow cytometry (Figures 4G, S4B, and S4C). Thus, the complete deletion of *ABCA1* in Tet2-deficient mice increased spleen size and enhanced extramedullary myelopoiesis. Consistently, DKO<sup>ΔHSC</sup> mice showed an increased frequency of LSK cells compared with WT or Tet2-deficient mice (Figure 4H). There was also an additive effect of *ABCA1* and *TET2* deficiency in promoting BM myeloid progenitor expansion (Figure 4I). These data indicate that concurrent *ABCA1* deficiency and Tet2 loss in hematopoietic cells exacerbated myeloid transformation, supporting the finding that *ABCA1* mutations identified in CMML patients were loss-of-function mutations.

### **Cholesterol Accumulation Links *ABCA1* Mutants and Tet2 Loss to IL3-Rβ Signaling Hypersensitivity**

We next sought to identify the mechanisms responsible for the lack of tumor-suppressor function of *ABCA1* mutants in Tet2-deficient BM cells. Increased cholesterol accumulation and reduced expression of *ABCA1* have been repeatedly observed in cancer cells (Bovenga et al., 2015; Lin and Gustafsson, 2015). Thus, taking advantage of publicly available gene expression datasets (Kunimoto et al., 2018), we interrogated whether Tet2-deficient LSK, CMP, and GMPs cells could transcriptionally regulate cholesterol metabolic pathways. We did not observe a major transcriptional regulation of the genes involved in cholesterol metabolism (<10% overall changes), including LXR target genes and *ABCA1* in Tet2-deficient hematopoietic progenitors (Figure S5A). The functional behavior of these cells was next assessed by quantifying the neutral lipid accumulation in single-KO and DKO<sup>ΔHSC</sup> HSPCs by flow cytometry using BODIPY staining. An increase in cellular neutral lipid content in single-KO and DKO<sup>ΔHSC</sup> HSPCs and committed myeloid progenitors (i.e., GMP and CMP) was observed compared to controls (Figures 5A and 5B). The combined deficiency of Tet2 and Abca1 also led to a cumulative BODIPY-neutral lipid staining per cell (expressed as mean fluorescence intensity [MFI]) in myeloid progenitors compared to single-KO cells (Figure 5B) but not in HSPCs (Figure 5A). Consistently, the overexpression of WT-*ABCA1* reduced BODIPY staining in Tet2-deficient CMP progenitors, but not in Tet2-deficient HSPCs (Figures 5C and 5D). However, *ABCA1* mutants failed to reduce BODIPY staining on a Tet2-deficient background (Figures 5C and 5D) and to some extent on a control background (i.e., *ABCA1-A1291T*, *G1421R*, and *P1423S*) (Figure S5B). The anti-tumor activity of *ABCA1* could be linked to the inhibition of sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2) and cholesterol biosynthesis target genes, which has recently been linked to the reduced expression of cell growth-facilitating mevalonate products in a solid tumor (Moon et al., 2019). However, the accumulation of cholesterol in *ABCA1* mutant-transduced Tet2-deficient BM cells rather was associated with the reduced expression of genes in the mevalonate pathway (Figure 5E), which is a well-known feedback regulatory mechanism by which sterols accumulating in the endoplasmic reticulum (ER) limit the processing and expression of the target genes of SREBP-2 (Brown and Goldstein, 2009; Spann and Glass, 2013).

Given the activation of the IL3-Rβ canonical pathway in myeloid cells with a defective cholesterol efflux pathway (Yvan-Charvet et al., 2010) and the hypersensitivity of Tet2-deficient myeloid cells to GM-CSF (Kunimoto et al., 2018), we next assessed whether the myelosuppressive function of *ABCA1* on

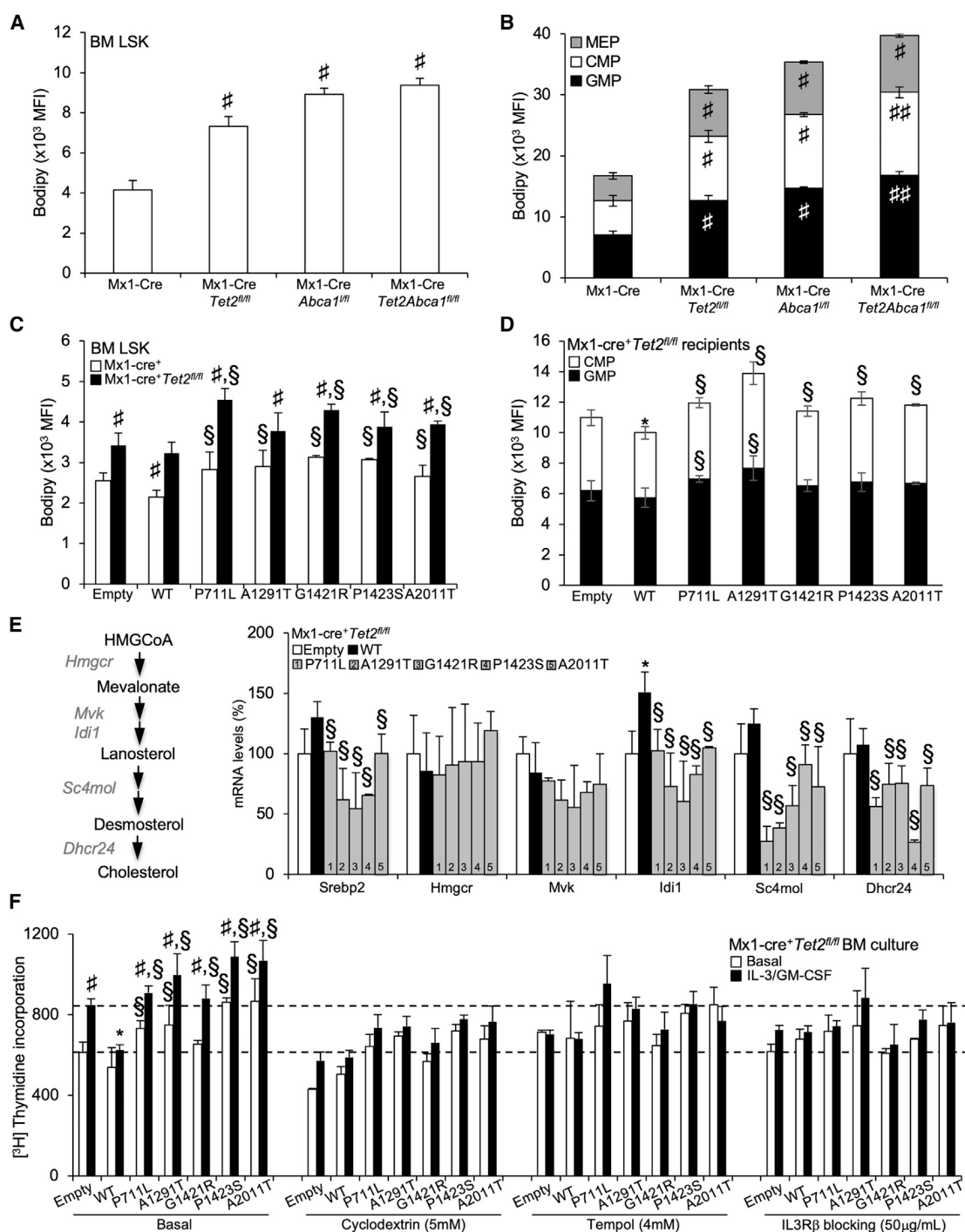
(C) Quantification of the percentage of peripheral blood myeloid cells determined by hematology cell counter over the course of 20 weeks after poly(I:C) injection in recipient mice transplanted with the BM from Mx1-Cre<sup>+</sup>, Mx1-Cre<sup>+</sup>Abca1<sup>fl/fl</sup>, Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup>, and Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup>Abca1<sup>fl/fl</sup> mice.

(D) Peripheral blood myeloid subsets (CD115<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> and CD115<sup>+</sup>Ly6C<sup>lo</sup> monocytes and CD115<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> neutrophils) were also quantified in these mice at the indicated time point.

(E) Representative H&E staining of paraffin-embedded spleen sections from these mice. Original magnification × 200. Arrows indicate extensive cellular infiltrate.

(F and G) Quantification of spleen weight (F) and myeloid subsets (eosinophils, neutrophils, monocytes, and red pulp macrophages [RPMs]) in the spleens (G) of recipient mice transplanted with the BM from Mx1-Cre<sup>+</sup>, Mx1-Cre<sup>+</sup>Abca1<sup>fl/fl</sup>, Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup>, and Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup>Abca1<sup>fl/fl</sup> mice.

(H and I) Quantification of hematopoietic stem (H) and progenitor (I) cells in the BM of these mice. Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup> LSK cells are HSPCs; Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>low</sup>FcγR<sup>low</sup> are megakaryocyte-erythrocyte progenitors (MEPs); Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>hi</sup>FcγR<sup>hi</sup> are GMP; and Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>hi</sup>FcγR<sup>low</sup> are CMPs. The results are the means ± SEMs of 5–7 animals per group. ND, not detectable. #p < 0.05 and ##p < 0.001 versus Mx1-Cre<sup>+</sup> controls.



**Figure 5. Cholesterol Accumulation Couples ABCA1 Invalidation and Tet2 Deficiency to IL-3 Receptor  $\beta$  Signaling Hypersensitivity**

(A–D) Quantification of BODIPY staining by flow cytometry expressed as mean fluorescence intensity (MFI) as a surrogate of cellular cholesterol neutral lipid per cell (A–D) in BM hematopoietic stem (A and C) and progenitor (B and D) cells (i.e., LSKs, MEPs, CMPs, and GMPs) of recipient mice transplanted with Mx1-Cre<sup>+</sup>, Mx1-Cre<sup>+</sup>Abca1<sup>fl/fl</sup>, Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup>, and Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup>Abca1<sup>fl/fl</sup> BM (A and B) or control and Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> BM expressing empty, ABCA1-WT, or ABCA1 mutants (C and D). Results are means  $\pm$  SEMs of 5–9 animals per group.

(E) mRNA expression of SREBP-2 and cholesterol biosynthesis target genes (Hmgcr, Mvk, Idi1, Sc4mol, and Dhcr24) from empty, WT, and ABCA1 mutant-transduced BM on a Tet2-deficient background isolated at the end of the study period. The expression of mRNA was normalized to m36B4. mRNA levels were expressed as percentage over WT whole BM cells.

(legend continued on next page)

a Tet2-deficient background could be attributed to its role in removing excess cellular cholesterol in committed myeloid progenitors. Excess cellular cholesterol was removed by treatment with cyclodextrin in *ABCA1* mutant-transduced Tet2-deficient BM cells cultured in the presence or absence of IL-3 and GM-CSF. We validated our *ex vivo* BM culture proliferation assay by showing that inhibition of the IL-3R $\beta$  signaling pathway using the IL-3R $\beta$  blocking antibody prevented BM proliferation in IL-3 and GM-CSF treatment (Figure 5F). We next showed that both the IL-3R $\beta$  blocking antibody and cyclodextrin prevented the proliferation of *ABCA1* mutant-transduced Tet2-deficient BM cells, similar to the effect of *ABCA1*-WT overexpression (Figure 5F), without affecting cell viability (data not shown). Consistently, western blot analysis showed higher levels of pErk1/2 or pJak2 in *ABCA1* mutant-transduced Tet2-deficient BM cells compared to *ABCA1*-WT-transduced cells (Figure S5C). mRNA expression analysis also revealed higher cyclin D1 and PU.1 gene expression in *ABCA1* mutant-transduced Tet2-deficient BM cells (Figure S5D). These genes are IL-3R $\beta$  signaling targets involved in proliferation and myeloid lineage commitment. In contrast, we did not observe changes in the expression of the key transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP $\alpha$ ) or in the negative regulators of RAS signaling, including dual-specificity phosphatase 1 (DUSP1) or sprouty-related, EEVH1 domain-containing protein 1 (Spred1) (Kunimoto et al., 2018). These findings suggest that the tumor-suppressor function of *ABCA1* relies on its capacity to modulate cholesterol-dependent IL-3R $\beta$  signaling and downstream mitogen-activated protein kinase (MAPK) and JAK2 signaling. We and others recently showed that reduced autophagy and enhanced mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production were 2 major metabolic events promoting HSPC expansion and myeloid commitment downstream of the IL-3R $\beta$  signaling pathway (Lum et al., 2005; Sarrazy et al., 2016). Thus, we estimated autophagic activity using the Cyto-ID probe by flow cytometry. Reduced autophagic activity was observed in *Tet2*- and *Abca1*-deficient myeloid progenitors (Figure S5E) and in *ABCA1* mutant-transduced CMP and GMP cells compared to *ABCA1*-WT-transduced BM both on WT and Tet2-deficient cells (Figure S5F). Finally, suppression of mitochondrial ROS with tempol prevented the basal proliferation and IL-3-GM-CSF hypersensitivity of *ABCA1* mutant-transduced Tet2-deficient BM cells (Figure 5F). These data confirm that *ABCA1* mutations impair the myelosuppressive function of *ABCA1* by increasing IL-3-GM-CSF hypersensitivity and downstream metabolic sequelae in Tet2-deficient myeloid progenitors.

#### Increased HDL Reverses Increased Myelopoiesis and Splenomegaly Caused by *ABCA1* Mutants

Given the ability of increased HDL to suppress HSPC myeloid lineage commitment and rescue the myeloproliferative disorder of mice with defective cholesterol efflux (Yvan-Charvet et al.,

2010), we hypothesized that raising HDL would alleviate some of the myeloproliferative phenotypes of *ABCA1* mutant-transduced Tet2-deficient animals. First, HDL treatment *ex vivo* reduced the proliferation rates of *ABCA1* mutant-transduced Tet2-deficient BM cells (Figure 6A). This was not the case with low-density lipoprotein (LDL) treatment (data not shown). HDL treatment also reduced BODIPY cholesterol staining (Figure 6B) of *ABCA1* mutant-transduced Tet2-deficient BM cells. We next explored the efficacy of the apoA-1 transgene to increase HDL levels *in vivo* (Figures 6C and 6D). Transduction of *ABCA1*-A1291T, G1421R, and A2011T was selected as the proof of concept and compared to BM transduced with empty vector or *ABCA1*-WT. Similar to *ABCA1*-WT-transduced BM cells, the human apoA-1 transgene prevented the peripheral myeloid expansion of mice transplanted with *ABCA1* mutant-transduced Tet2-deficient BM (Figure 6E) and also abolished their splenomegaly (Figure 6F). These data demonstrate that increased apoA-1 production and increased HDL show robust preclinical efficacy in myeloproliferative neoplasms driven by *ABCA1* and *TET2* mutants.

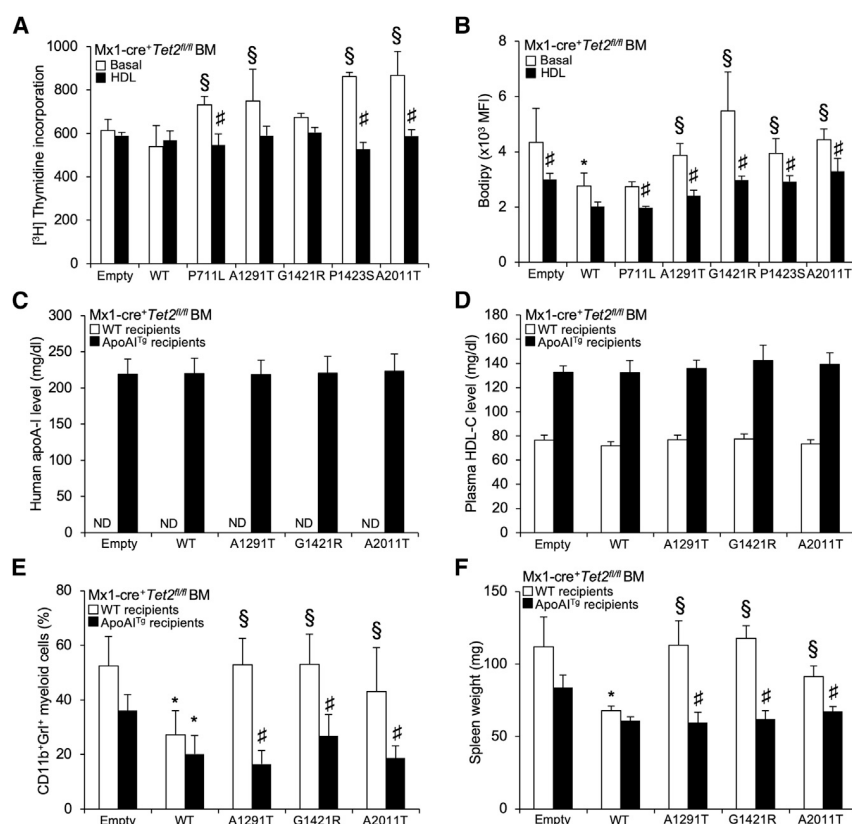
#### DISCUSSION

Here, we identified recurrent somatic mutations in the cholesterol exporter *ABCA1* in CMML patients. The expression of *ABCA1* mutants *in vitro* confers a growth and proliferative advantage *in vitro* compared to the expression of WT-*ABCA1*. The relevance of these mutations is underscored by the loss of the tumor-suppressor function of WT-*ABCA1* in the context of Tet2 deficiency. *ABCA1* deficiency also accelerated the myeloproliferative disorder of Tet2-deficient BM transplanted mice, as illustrated by increased myelopoiesis and extramedullary hematopoiesis. The myelosuppressive function of *ABCA1* was further illustrated by the failure of *ABCA1* mutants to limit a fully penetrant myeloproliferative disorder after serial transplantation. The underlying mechanism involves the accumulation of cellular cholesterol in myeloid progenitors, resulting in IL-3R $\beta$  signaling hypersensitivity with sustained ERK1/2 and JAK2 signaling and subsequent metabolic perturbations (e.g., reduced autophagy, enhanced mitochondrial ROS formation). In addition, the overexpression of the WT human apoA-1 transgene rescued the loss of the myelosuppressive function of *ABCA1* mutants. These findings provide further evidence that these effects were caused by defective cholesterol efflux and suggest a therapeutic application of HDL-raising therapies for CMML patients bearing *ABCA1* mutants.

The classical hallmarks of cancer are intimately intertwined with an assortment of metabolic processes that a tumor cell effectively hijacks to facilitate malignant transformation (Boroughs and DeBerardinis, 2015; Hanahan and Weinberg, 2011; Kroemer and Pouyssegur, 2008). Several studies, largely performed *in vitro*, suggest that altered cholesterol metabolism

(F) Proliferation rates were determined after 2 h [ $^3$ H]-thymidine pulse labeling in BM cells from empty, *ABCA1*-WT, and *ABCA1* mutant-transduced animals on a Tet2-deficient background that were grown for 72 h in liquid culture in the presence or absence of 6 ng/mL IL-3 and 2 ng/mL GM-CSF and the indicated chemical compounds. Results are means  $\pm$  SEMs of cultures from at least 3 independent mice.

\* $p < 0.05$  versus empty control-transduced animals on a Tet2-deficient background. § $p < 0.05$  versus *ABCA1*-WT. # $p < 0.05$  and ## $p < 0.001$  versus Mx1-Cre $^+$  controls.



**Figure 6. HDL Overcome Loss-of-Function ABCA1 Mutants and Limit the Myeloproliferative Disorder Induced by These Mutants in Tet2-Deficient Mice**

(A) Proliferation rates were determined after 2 h [<sup>3</sup>H]-thymidine pulse labeling in BM cells from empty, ABCA1-WT, and ABCA1 mutant-transduced animals on a Tet2-deficient background that were grown for 72 h in liquid culture in the presence or absence of 50 μg/mL polyethylene glycol (PEG)-HDL.

(B) The quantification of BODIPY staining was determined by flow cytometry in these cells and expressed as the MFI. The results are means ± SEMs of cultures from at least 3 independent mice. (C and D) Levels of human apoA-1 (hApoA-1) (C) and plasma HDL-cholesterol levels (D) were determined in WT or apoA-1 transgenic recipient mice transplanted with Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> BM transduced with lentiviral particles expressing ABCA1-WT or ABCA1 mutants or empty vector.

(E and F) Peripheral blood CD11b<sup>+</sup>Grit<sup>+</sup> myeloid subsets (E) and spleen weight (F) were quantified at the end of the study period (i.e., 7 weeks post-poly(I:C) injection that followed a 5-week recovery period post-BMT) in WT or apoA-1 transgenic recipient mice transplanted with Mx1-Cre<sup>+</sup>Tet2<sup>fl/fl</sup> BM transduced with lentiviral particles expressing ABCA1-WT or ABCA1 mutants or empty vector. Results are means ± SEMs of 4–5 animals per group.

\*p < 0.05 versus empty control-transduced animals on a Tet2-deficient background. §p < 0.05 versus ABCA1-WT. #p < 0.05 versus non-HDL-treated conditions or transduced animals on a non-ApoA1<sup>Tg</sup> background.

(i.e., enhanced cholesterol synthesis and reduced cholesterol efflux) is linked to the cellular transformation that is most likely to provide the essential building blocks required to maintain their aberrant survival and growth (Bovenga et al., 2015; Clendening and Penn, 2012; Dang, 2012; Lin and Gustafsson, 2015; Mullen et al., 2016). This synergistic metabolic regulation is a highly cooperative process that is thought to involve a transcriptional response of non-mutant genes (i.e., “cooperation response genes”) induced by oncogenic mutations, including the downregulation of the cholesterol exporter ABCA1 (Hirsch et al., 2010; McMurray et al., 2008). Conversely, short amphipathic α-helical peptides, the presumed mimetics of apoA-1 (the major apolipoprotein constitutive of HDL), inhibited ovarian tumor development (Su et al., 2010), synthetic HDL nanoparticles inhibited B cell lymphoma xenografts (Yang et al., 2013), and injection of human apoA-1 promoted tumor and metastases regression in mice inoculated with malignant melanoma cells (Zamanian-Daryoush et al., 2013). These findings indicate decreased ABCA1 efflux activity in a variety of solid tumors that may have pathological importance. However, efforts to identify causal somatic mutations in genes governing cholesterol efflux pathways have been limited so far to human colon cancer samples (Sjöblom et al., 2006; Smith and Land, 2012). Similar to solid tumors, early studies have associated hematological malignancy, especially chronic myelocytic leukemia, with perturbed cholesterol

metabolism (Dessi et al., 1995; Gilbert and Ginsberg, 1983). Hypercholesterolemia and defective hematopoietic cholesterol efflux pathways control many aspects of HSPC homeostasis in mice, including their proliferation and expansion, their myeloid lineage commitment, and their mobilization from the BM (Lacy et al., 2019; Soehnlein and Swirski, 2013; Tall and Yvan-Charvet, 2015). We also demonstrated that the overexpression of the human apoA-1 transgene prevented the myeloproliferation of mice bearing the Mpl-W515L or Flt3-ITD oncogenes (Gautier et al., 2013). The discovery of ABCA1 mutants in CMML samples with loss of myelosuppressive activity in cell culture and *in vivo* provides causal evidence of the role of ABCA1 efflux activity in myeloproliferative disorders.

Functional studies have suggested co-occurrence of specific combinations of leukemia disease alleles to drive myeloid transformation (Kunimoto et al., 2018; Shih et al., 2015). These mutations include genes that control signal transduction (e.g., somatic RAS mutations) and metabolic pathways (e.g., somatic isocitrate dehydrogenase [IDH] mutations) and those that regulate epigenetic modifications. One of the epigenetic modifiers most commonly mutated in myeloid malignancies is TET2 (Itzykson et al., 2017), which catalyzes the conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, leading to DNA demethylation (Tahiliani et al., 2009). These mutations are thought to largely arise spontaneously as a result of replicative stress in

aging HSCs providing the first-step acquisition of clonal expansion and a bias toward the myeloid lineage (Moran-Crusio et al., 2011; Quivoron et al., 2011), but they are not sufficient to induce myeloid transformation and IL-3R $\beta$  hypersensitivity (Itzykson et al., 2017). Our findings suggest that these *ABCA1* mutants, due to their loss of myelosuppressive functions, could play a pivotal role in providing a second hit, which cooperates with CH alleles to drive myeloid transformation.

Somatic mutations in *ABCA1* have not previously been described in leukemia; however, loss-of-function mutations in the *ABCA1* gene have previously been characterized in Tangier disease, a rare autosomal-recessive disorder (Kang et al., 2010). Apart from mutations located in the apoA-1 binding pocket, loss-of-function mutations have been located in the N- and C-terminal regions or the PEST sequence, involving several mechanisms such as mislocalization of *ABCA1* away from the cell surface, impaired dimerization, ER exit failure, or protein interaction-dependent destabilization and degradation, all leading to impaired cholesterol efflux (Kang et al., 2010). Thus, the proliferative advantage of some *ABCA1* mutants (*ABCA1-A1291T*, *ABCA1-G1421R*, and *ABCA1-P1423S*) over empty control could be attributed to a change in the dimerization with endogenous *ABCA1*, as previously observed in Tangier disease (i.e., dominant-negative effect) (Brunham et al., 2006; Kang et al., 2010). Engineered mutations in *ABCA1* have also revealed the additional regulation of receptor tyrosine kinase signaling by lipid-dependent and -independent export activity (Vaughan et al., 2009; Tang et al., 2009). Thus, future studies are necessary to pinpoint the molecular mechanism at the origin of the impaired *ABCA1* efflux activity or signal transduction and subsequent myelosuppressive functions of the newly identified *ABCA1* mutants.

Monocytosis and IL-3R $\beta$  hypersensitivity are hallmarks of CMML (Itzykson et al., 2017), and we previously showed that the accumulation of plasma membrane cholesterol in myeloid progenitors with defective cholesterol efflux pathways is the culprit of enhanced IL-3R $\beta$  signaling (Yvan-Charvet et al., 2010). However, *ABCA1* anti-tumor activity in murine hepatocellular carcinomas driven by p53 loss has recently been attributed to a distinct mechanism involving the inhibition of SREBP-2 maturation with the consequent reduced expression of cell growth-facilitating mevalonate products, which are intermediates in the cholesterol biosynthesis pathway (Moon et al., 2019). This mechanism is inconsistent with our data in the hematopoietic context, since reduced expression of SREBP-2 and cholesterol biosynthesis target genes were observed in *ABCA1* mutant-transduced leukemic cells, and the loss of the anti-proliferative activity of *ABCA1* mutants was overcome by HDL or cyclodextrin-mediated cholesterol efflux in cell culture and by increased HDL levels *in vivo*. HDL and cyclodextrin promote cholesterol efflux by non-*ABCA1* pathways, which should deplete cellular and ER cholesterol (Tall and Yvan-Charvet, 2015), leading to increased SREBP2 processing and increased cholesterol biosynthesis (Brown and Goldstein, 2009; Spann and Glass, 2013). Moreover, the overexpression of cholesterol efflux-promoting genes leads to the increased expression of SREBP-2 target genes (Wang et al., 2006). The reason for the apparent discrepancy between these studies is unknown, but

it could be related to the specific mutant alleles and tissue context being evaluated (Lee et al., 2013). The present study rather shows that the IL-3R $\beta$  hypersensitivity observed in the presence of *ABCA1* mutants metabolically reprograms myeloid cells downstream of receptor tyrosine kinase signaling activation, which is the culprit of mitochondrial ROS production, known to drive hyperproliferation and leukemic hematopoiesis (Vander Heiden et al., 2009; Abdel-Wahab and Levine, 2010).

Treatment for CMML remains challenging, since there are few validated therapeutic targets, and conventional cytotoxic drugs have limited activity. The only curative option to date is allogeneic stem cell transplantation. However, most patients are diagnosed at an advanced age and are not candidates for stem cell transplantation (Itzykson et al., 2017). Our data indicate that cooperative epigenetic remodeling by *TET2* loss and *ABCA1* mutants supports myeloid transformation, which may provide a rationale for mechanism-based therapy. Given the emerging association between HDL and cancer (Pirro et al., 2018), the identification of *ABCA1* mutations in CMML provides a potential target for therapeutic intervention with HDL-raising therapies such as infusions of reconstituted HDL, which are in phase III clinical trials for acute coronary syndrome. This could be repurposed for the treatment of myeloid malignancies with genetic inactivation of *ABCA1* function.

## STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
  - Primary CMML patient samples
  - Mice
  - Cell Line
- METHOD DETAILS
  - Genetic analysis of primary patient samples
  - Plasmids
  - Mice and treatments
  - Lentiviral BM transplantation
  - White blood cell counts-
  - Histopathology
  - HEK293 cell transfection and culture
  - Human THP-1 monocytic leukemia cells and treatments
  - BM harvest and treatment
  - [<sup>3</sup>H]-Thymidine proliferation assay
  - Isotopic cholesterol efflux assay
  - Cellular and tissue cholesterol content
  - Flow cytometry analysis
  - Cholera Toxin staining
  - Antibodies
  - RNA analysis
  - Analysis of DNA hydroxymethylation
  - Western Blotting
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- DATA AND CODE AVAILABILITY

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.056>.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Frédéric Larbret for assistance with flow cytometry and Dr. Véronique Corcelle for assistance in animal facilities. A PACA region PhD fellowship and the La Ligue Nationale Contre le Cancer support M.V. This work was supported by the Inserm Atip-Avenir program, the European Marie Curie Career Integration Grant (CIG-630926), and the Fondation ARC (ARC-R14027AA-RAC14007AAA) to L.Y.-C. This work was supported in part by NIH grants HL107653 and HL137663 and the Leducq Foundation to A.R.T., and by MSKCC Support Grant/Core Grant P30 CA008748.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.L.L., A.R.T., and L.Y.-C. conceived the project, designed the experiments, and wrote the manuscript. M.V., O.A.-W., and J.G. performed most of the molecular, histological, and *in vivo* experiments. S.I., R.G., S.S., J.M., M.A., and A.J. helped with the experimental design and assisted with the data analysis. P.A. and N.W. provided scientific advice and helped with the experimental design. L.Y.-C. also designed and supervised the study and obtained funding. All of the authors read, edited, and approved the manuscript.

## DECLARATION OF INTERESTS

R.L.L. is on the supervisory board of QIAGEN and is a scientific advisor to Loxo, Imago, C4 Therapeutics, and Isoplexis, each of which include an equity interest. He receives research support from and has consulted for Celgene and Roche, has received research support from Prelude Therapeutics, and has consulted for Astellas, Incyte, Janssen, Morphosys, and Novartis. He has received honoraria from Lilly and Amgen for invited lectures and from Gilead for grant reviews. The authors have filed a patent, EB19024, on the use of HDL-raising therapies in the treatment of myeloproliferative neoplasms.

Received: May 2, 2019

Revised: November 23, 2019

Accepted: February 12, 2020

Published: March 10, 2020

## REFERENCES

- Abdel-Wahab, O., and Levine, R.L. (2010). Metabolism and the leukemic stem cell. *J. Exp. Med.* *207*, 677–680.
- Boroughs, L.K., and DeBerardinis, R.J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat. Cell Biol.* *17*, 351–359.
- Bovenga, F., Sabbà, C., and Moschetta, A. (2015). Uncoupling nuclear receptor LXR and cholesterol metabolism in cancer. *Cell Metab.* *21*, 517–526.
- Bowman, R.L., and Levine, R.L. (2017). TET2 in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *7*, a026518.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2009). Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J. Lipid Res.* *50* (Suppl), S15–S27.
- Brunham, L.R., Singaraja, R.R., and Hayden, M.R. (2006). Variations on a gene: rare and common variants in ABCA1 and their impact on HDL cholesterol levels and atherosclerosis. *Annu. Rev. Nutr.* *26*, 105–129.
- Busque, L., Patel, J.P., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Provost, S., Hamilou, Z., Mollica, L., Li, J., Viale, A., Heguy, A., et al. (2012). Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat. Genet.* *44*, 1179–1181.
- Clendening, J.W., and Penn, L.Z. (2012). Targeting tumor cell metabolism with statins. *Oncogene* *31*, 4967–4978.
- Dang, C.V. (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* *26*, 877–890.
- Dessi, S., Batetta, B., Spano, O., Sanna, F., Tonello, M., Giacchino, M., Tessitore, L., Costelli, P., Baccino, F.M., Madon, E., et al. (1995). Clinical remission is associated with restoration of normal high-density lipoprotein cholesterol levels in children with malignancies. *Clin. Sci. (Lond.)* *89*, 505–510.
- Dietrich, C., Volovyk, Z.N., Levi, M., Thompson, N.L., and Jacobson, K. (2001). Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 10642–10647.
- Emanuel, P.D. (2008). Juvenile myelomonocytic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia* *22*, 1335–1342.
- Gautier, E.L., Westerterp, M., Bhagwat, N., Cremers, S., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Lütjohann, D., Randolph, G.J., Levine, R.L., Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2013). HDL and Glut1 inhibition reverse a hypermetabolic state in mouse models of myeloproliferative disorders. *J. Exp. Med.* *210*, 339–353.
- Gilbert, H.S., and Ginsberg, H. (1983). Hypocholesterolemia as a manifestation of disease activity in chronic myelocytic leukemia. *Cancer* *51*, 1428–1433.
- Gough, P.J., and Raines, E.W. (2003). Gene therapy of apolipoprotein E-deficient mice using a novel macrophage-specific retroviral vector. *Blood* *101*, 485–491.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hirsch, H.A., Iliopoulos, D., Joshi, A., Zhang, Y., Jaeger, S.A., Bulyk, M., Tschlis, P.N., Shirley Liu, X., and Struhl, K. (2010). A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. *Cancer Cell* *17*, 348–361.
- Itzykson, R., Duchmann, M., Lucas, N., and Solary, E. (2017). CMML: clinical and molecular aspects. *Int. J. Hematol.* *105*, 711–719.
- Jafri, H., Alsheikh-Ali, A.A., and Karas, R.H. (2010). Baseline and on-treatment high-density lipoprotein cholesterol and the risk of cancer in randomized controlled trials of lipid-altering therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* *55*, 2846–2854.
- Kang, M.H., Singaraja, R., and Hayden, M.R. (2010). Adenosine-triphosphate-binding cassette transporter-1 trafficking and function. *Trends Cardiovasc. Med.* *20*, 41–49.
- Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* *13*, 472–482.
- Kunimoto, H., Meydan, C., Nazir, A., Whitfield, J., Shank, K., Rapaport, F., Maher, R., Pronier, E., Meyer, S.C., Garrett-Bakelman, F.E., et al. (2018). Cooperative Epigenetic Remodeling by TET2 Loss and NRAS Mutation Drives Myeloid Transformation and MEK Inhibitor Sensitivity. *Cancer Cell* *33*, 44–59.e8.
- Lacy, M., Atzler, D., Liu, R., de Winther, M., Weber, C., and Lutgens, E. (2019). Interactions between dyslipidemia and the immune system and their relevance as putative therapeutic targets in atherosclerosis. *Pharmacol. Ther.* *193*, 50–62.
- Lee, B.H., Taylor, M.G., Robinet, P., Smith, J.D., Schweitzer, J., Sehayek, E., Falzarano, S.M., Magi-Galluzzi, C., Klein, E.A., and Ting, A.H. (2013). Dysregulation of cholesterol homeostasis in human prostate cancer through loss of ABCA1. *Cancer Res.* *73*, 1211–1218.
- Ley, T.J., Miller, C., Ding, L., Raphael, B.J., Mungall, A.J., Robertson, A., Hoadley, K., Triche, T.J., Jr., Laird, P.W., Baty, J.D., et al.; Cancer Genome Atlas Research Network (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* *368*, 2059–2074.
- Lin, C.-Y., and Gustafsson, J.-Å. (2015). Targeting liver X receptors in cancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 216–224.
- Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* *120*, 237–248.
- McMurray, H.R., Sampson, E.R., Compitello, G., Kinsey, C., Newman, L., Smith, B., Chen, S.-R., Klebanov, L., Salzman, P., Yakovlev, A., and Land, H. (2008). Synergistic response to oncogenic mutations defines gene class critical to cancer phenotype. *Nature* *453*, 1112–1116.
- Moon, S.-H., Huang, C.-H., Houlihan, S.L., Regunath, K., Freed-Pastor, W.A., Morris, J.P., Tschaharganeh, D.F., Kastenhuber, E.R., Barsotti, A.M., Culp-Hill,

- R., et al. (2019). p53 Represses the Mevalonate Pathway to Mediate Tumor Suppression. *Cell* 176, 564–580.e19.
- Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., et al. (2011). Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 20, 11–24.
- Mullen, P.J., Yu, R., Longo, J., Archer, M.C., and Penn, L.Z. (2016). The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 16, 718–731.
- Murphy, A.J., Akhtari, M., Tolani, S., Pagler, T., Bijl, N., Kuo, C.-L., Wang, M., Sanson, M., Abramowicz, S., Welch, C., et al. (2011). ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 4138–4149.
- Pikman, Y., Lee, B.H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B.L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., et al. (2006). MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* 3, e270.
- Pirro, M., Ricciuti, B., Rader, D.J., Catapano, A.L., Sahebkar, A., and Banach, M. (2018). High density lipoprotein cholesterol and cancer: marker or causative? *Prog. Lipid Res.* 71, 54–69.
- Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, C.K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., Do Cruzeiro, M., Delhommeau, F., Arnulf, B., Stern, M.-H., et al. (2011). TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 20, 25–38.
- Rubin, E.M., Krauss, R.M., Spangler, E.A., Verstuyft, J.G., and Cliff, S.M. (1991). Inhibition of early atherosclerosis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 353, 265–267.
- Sarrazy, V., Viaud, M., Westerterp, M., Ivanov, S., Giorgetti-Peraldi, S., Guinard, R., Gautier, E.L., Thorp, E.B., De Vivo, D.C., and Yvan-Charvet, L. (2016). Disruption of Glut1 in Hematopoietic Stem Cells Prevents Myelopoiesis and Enhanced Glucose Flux in Atheromatous Plaques of ApoE(-/-) Mice. *Circ. Res.* 118, 1062–1077.
- Shih, A.H., Jiang, Y., Meydan, C., Shank, K., Pandey, S., Barreyro, L., Antony-Debre, I., Viale, A., Socci, N., Sun, Y., et al. (2015). Mutational cooperativity linked to combinatorial epigenetic gain of function in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 27, 502–515.
- Sjöblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N., et al. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268–274.
- Smith, B., and Land, H. (2012). Anticancer activity of the cholesterol exporter ABCA1 gene. *Cell Rep.* 2, 580–590.
- Soehnlein, O., and Swirski, F.K. (2013). Hypercholesterolemia links hematopoiesis with atherosclerosis. *Trends Endocrinol. Metab.* 24, 129–136.
- Solary, E., Bernard, O.A., Tefferi, A., Fuks, F., and Vainchenker, W. (2014). The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia* 28, 485–496.
- Spann, N.J., and Glass, C.K. (2013). Sterols and oxysterols in immune cell function. *Nat. Immunol.* 14, 893–900.
- Su, F., Kozak, K.R., Imaizumi, S., Gao, F., Amneus, M.W., Grijalva, V., Ng, C., Wagner, A., Hough, G., Farias-Eisner, G., et al. (2010). Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 19997–20002.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., and Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930–935.
- Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 104–116.
- Tang, C., Liu, Y., Kessler, P.S., Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2009). The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *J. Biol. Chem.* 284, 32336–32343.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033.
- Vaughan, A.M., Tang, C., and Oram, J.F. (2009). ABCA1 mutants reveal an interdependency between lipid export function, apoA-I binding activity, and Janus kinase 2 activation. *J. Lipid Res.* 50, 285–292.
- Wang, N., Ranalletta, M., Matsuura, F., Peng, F., and Tall, A.R. (2006). LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1310–1316.
- Wang, M., Subramanian, M., Abramowicz, S., Murphy, A.J., Gonen, A., Witztum, J., Welch, C., Tabas, I., Westerterp, M., and Tall, A.R. (2014). Interleukin-3/granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor promotes stem cell expansion, monocytosis, and atheroma macrophage burden in mice with hematopoietic ApoE deficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 976–984.
- Westerterp, M., Gourion-Arsiquaud, S., Murphy, A.J., Shih, A., Cremers, S., Levine, R.L., Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2012). Regulation of hematopoietic stem and progenitor cell mobilization by cholesterol efflux pathways. *Cell Stem Cell* 11, 195–206.
- Yang, S., Damiano, M.G., Zhang, H., Tripathy, S., Luthi, A.J., Rink, J.S., Ugoikov, A.V., Singh, A.T.K., Dave, S.S., Gordon, L.I., and Thaxton, C.S. (2013). Biomimetic, synthetic HDL nanostructures for lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 2511–2516.
- Yvan-Charvet, L., Pagler, T., Gautier, E.L., Avagyan, S., Siry, R.L., Han, S., Welch, C.L., Wang, N., Randolph, G.J., Snoeck, H.W., and Tall, A.R. (2010). ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science* 328, 1689–1693.
- Zamanian-Daryoush, M., Lindner, D., Tallant, T.C., Wang, Z., Buffa, J., Klipfell, E., Parker, Y., Hatala, D., Parsons-Wingerter, P., Rayman, P., et al. (2013). The cardioprotective protein apolipoprotein A1 promotes potent anti-tumorigenic effects. *J. Biol. Chem.* 288, 21237–21252.

## STAR★METHODS

### KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
anti-IL3R antibody	R&D Systems	Cat# AF549; RRID:AB_355432
TCR- $\beta$ (H57-597)-FITC	eBioscience	Cat# 11-5961-82; RRID:AB_465323
F4/80 (BM8)-FITC	eBioscience	Cat# 11-4801-82; RRID:AB_465323
CD2 (RM2-5)-FITC	eBioscience	Cat# 11-0021-82; RRID:AB_464873
CD3e (145-2C11)-FITC	eBioscience	Cat# 11-0031-81; RRID:AB_464881
CD4 (GK1.5)-FITC	eBioscience	Cat# 11-0041-82; RRID:AB_464892
CD8b (Ly-3)-FITC	BioLegend	Cat# 126606; RRID:AB_961295
CD19 (eBio1D3)-FITC	eBioscience	Cat# 11-0193-82; RRID:AB_657666
CD45R (B220, RA3-6B2)-FITC	eBioscience	Cat# 14-0452-82; RRID:AB_467254
Gr-1 (Ly6G, RB6-8C5)-FITC	eBioscience	Cat# 11-5931-82; RRID:AB_465314
Cd11b (Mac1, M1/70)-FITC	eBioscience	Cat# 11-0112-41; RRID:AB_11042156
Ter119 (Ly76)-FITC	eBioscience	Cat# 11-5921-82; RRID:AB_465311
NK1.1 (Ly53, PK136)-FITC	eBioscience	Cat# 11-5941-82; RRID:AB_465318
c-Kit (CD117, ACK2)-APCeFluor780	eBioscience	Cat# 47-1172-82; RRID:AB_1582226
Sca- 1-Pacific blue	Biolegend	Cat# 108119; RRID:AB_493274
FcgRII/III-PE (CD16/32, 2.4G2)	Biolegend	Cat# 156606; RRID:AB_2800704
CD34 (RAM34)-AlexaFluor 647	Biolegend	Cat# 119314; RRID:AB_604089
CD135 (Flt3, A2F10)-PE	Biolegend	Cat# 135305; RRID:AB_1877218
CD150 (Slamf1, TC15-12F12.2)-PECy7	Biolegend	Cat# 115913; RRID:AB_439796
CD115 (AFS98)-APC	Biolegend	Cat# 135509; RRID:AB_2085222
CD45 (30-F11)-APCCy7	Biolegend	Cat# 103115; RRID:AB_312980
Ly6C/G or Gr-1 (RB6-8C5)-PercPCy5.5	BD Bioscience	Cat# 552093; RRID:AB_394334
ABCA1 Antibody	Abcam	Cat# ab18180; RRID:AB_444302
TET2 Antibody	Cell Signaling	Cat# 45010S; RRID:AB_2799277
Phospho-Jak2 (Tyr1008) (D4A8) Rabbit mAb	Cell Signaling	Cat# 8082; RRID:AB_10949104
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	Cat# 4377; RRID:AB_331775
<b>Bacterial and Virus Strains</b>		
pLKO lentiviral	Genecust	N/A
<b>Biological Samples</b>		
Peripheral blood	MSKCC	HSPCMSKCC06-107
Bone marrow	MSKCC	HSPCMSKCC06-107
Buccal swab	MSKCC	HSPCMSKCC06-107
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
poly:IC	Invivogen	tlrl-pic-5
5-fluorouracile	Sigma	F6627
IL-6, Mouse	Milteny Biotech	130-094-065
IL-3 Culture Supplement, Mouse	Corning	354040
Stem Cell Factor, Mouse	Milteny Biotech	130-094-079
polybrene	Sigma	TR-1003
4% paraformaldehyde	Sigma	1004968350
LipofectAMINE 2000	Invitrogen	11668030
GM- CSF	R&D Systems	415-ML-005
Methyl- $\beta$ -cyclodextrin	Sigma	C4555

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Tempol	EMD Millipore	581500, CAS 2226-96-2
Thymidine, [Methyl- <sup>3</sup> H]	PerkinElmer	NET027W001MC
Phorbol myristate acetate	Sigma	P8139
Apolipoprotein A-I from human plasma	Sigma	A0722
Bodipy-cholesterol probe	Life Technologies	D3922
Fixation Buffer (BD Cytotfix)	BD Bioscience	554655
Perm Buffer III	BD Bioscience	BD Bioscience
Cholera Toxin Subunit B, Alexa Fluor 594 conjugate	Invitrogen	C34777
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	ThermoFisher Scientific	D1306
Critical Commercial Assays		
Total Cholesterol colorimetric kits	Wako Chemicals	999-02601
MethylFlash Global DNA Hydroxymethylation (5-hmC) ELISA Easy Kit (Colorimetric)	Epigentek	P-1032-96
Experimental Models: Cell Lines		
HEK293 cells (human embryonic kidney)	ATCC	CRL-1573
THP-1 monocytes (human acute monocytic leukemia cell line)	ATCC	TIB-202
Experimental Models: Organisms/Strains		
WT mice	Jackson Laboratory	SN000664
Mx1-Cre mice (B6.Cg-Tg(Mx1-cre)1Cgn/J)	Jackson Laboratory	SN003556
Abca1fl/fl mice (B6.129S6-Abca1tm1Jp/J)	Jackson Laboratory	SN028266
Tet2fl/fl (B6;129S-Tet2tm1.1laai/J)	Jackson Laboratory	SN017573
Human apoA-1 transgenic (B6.Tg(ApoA1)1Rub/J)	Jackson Laboratory	SN 001927
Oligonucleotides		
See <a href="#">Table S1</a> for genetic analysis of primary patient samples	N/A	N/A
Software and Algorithms		
FlowJo software	Tree Star	<a href="https://www.flowjo.com">https://www.flowjo.com</a>
Other		
4–20% Criterion Tris-HCl Protein Gel, 12+2 well, 45 μl	BioRad	3450032
Fetal Bovine Serum, Heat Inactivated	Fischer scientific	12350273
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	ThermoFischer	15140122
RMPI 1640, no glutamine	ThermoFischer	31870074
L-Glutamine (200 mM)	ThermoFischer	25030024

**LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY**

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Dr. Laurent Yvan-Charvet ([yvancharvet@unice.fr](mailto:yvancharvet@unice.fr)).

There are restrictions to the availability of plasmid generated and stable cell lines due to the lack of an external centralized repository for its distribution and our need to maintain the stock. We are glad to share repository with reasonable compensation by requestor for its processing and shipping.

**EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

**Primary CMML patient samples**

All samples were collected on MSKCC protocol 06-107. Protocol 06-107 was most recently approved by the Human Subjects Protection Committee at the Memorial Sloan Kettering Cancer Center on July 09, 2019 and is fully HIPAA compliant. Peripheral blood and/or bone marrow samples were collected from 26 patients (men and women) with CMML; informed consent was obtained from all patients included in this study. Matched normal tissue in the form of a buccal swab was available for all patients.

## Mice

WT, *Mx1-Cre*<sup>+</sup> (B6.Cg-Tg(Mx1-cre)<sup>1Cgn/J</sup>), *Tet2*<sup>fl/fl</sup> (B6;129S-Tet2<sup>tm1.1laai/J</sup>), *Abca1*<sup>fl/fl</sup> (B6.129S6-*Abca1*<sup>tm1Jp/J</sup>) and human apoA-1 transgenic male mice (B6.Tg(ApoA1)<sup>1Rub/J</sup>), were obtained from the Jackson Laboratory between the age of 6 and 10 weeks. Human apoA-1 transgenic mice were selected based on the human apoA-1 levels in the range of 150-300mg/dL (ELISA do not detect mouse apoA-1) as previously described (Rubin et al., 1991; Yvan-Charvet et al., 2010). *Mx1-Cre*<sup>+</sup> *Tet2*<sup>fl/fl</sup> mice, *Mx1-Cre*<sup>+</sup> *Abca1*<sup>fl/fl</sup> mice and *Mx1-Cre*<sup>+</sup> *Tet2*<sup>fl/fl</sup> *Abca1*<sup>fl/fl</sup> littermate mice were used for this study. Animal procedures were conducted in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees at Mediterranean Center of Molecular Medicine (C3M). Mice were maintained on a 12h light/12h darkness lighting schedule. Animals had *ad libitum* access to both food and water.

## Cell Line

THP-1 cells (human acute monocytic leukemia cell line, TIB-202, ATCC) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

HEK293 cells (human embryonic kidney, CRL-1573, ATCC) were grown in DMEM containing 10% FBS and cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

## METHOD DETAILS

### Genetic analysis of primary patient samples

Genomic DNA was extracted from viably frozen peripheral blood granulocytes and buccal swabs. High-throughput DNA sequence analysis was used to screen for mutations in ABCA1, ABCG1, NR1H2, and NR1H3. All DNA samples were whole genome amplified using  $\Phi$ 29 polymerase to ensure sufficient material was available for sequence analysis. M13-appended gene-specific primers were designed to amplify and sequence all coding exons of all isoforms of the above-mentioned genes. Primer sequences and the genomic coordinates of all amplicons sequenced are included in Table S1. Bidirectional sequence traces were analyzed for missense and nonsense mutations using Mutation Surveyor (Softgenetics, Inc., State College, PA), and all traces were reviewed manually and with Mutation Surveyor for the presence of frameshift mutations. Mutations were annotated according to the predicted effects on coding sequence using NM\_005502.2, NM\_004915.3, NM\_007121.4, and NM\_001130101.1 as the reference sequence for ABCA1, ABCG1, NR1H2, and NR1H3 respectively. Non-synonymous mutations were first compared to published SNP data (dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) such that previously annotated SNPs were not considered pathogenic mutations. Missense mutations not in the published SNP database were annotated as somatic mutations based on either on reported data demonstrating these are somatic mutations or sequence analysis of that demonstrated these mutations were present in tumor and not in matched normal DNA. All somatic mutations were validated by resequencing non-amplified source DNA for the particular amplicon where the mutation was noted. Genomic DNA from paired samples was verified to belong to the same patient by genotyping of the specimens for 42 highly polymorphic single-nucleotide polymorphisms using mass-spectrometry based genotyping as described previously. In order to determine whether the genes in which non-synonymous mutations were identified were mutated at a rate higher than expected by chance alone, we first calculated the rate of non-synonymous mutations in the sequenced genes. We then performed binomial test in R (<http://www.r-project.org/>) to compare the rate of non-synonymous mutations in the genes identified in this study with the expected background rate of  $0.22 - 2.5 \times 10^{-6}$  synonymous mutations identified in several prior large-scale sequencing studies<sup>2-10</sup> as well as the expected ratio of silent:non-silent mutations (0.31-0.41) from the same studies.

### Plasmids

Mouse ABCA1 cDNA, with a homology of 97% to human ABCA1 cDNA, was used to generate P711L, A1291T, G1421R, P1423S and A2011T mutant cDNAs and cloned into pLKO lentiviral vectors to genetically perturb cells by lentiviral infection and avoid cross reactivity.

### Mice and treatments

Bone marrow (BM) transplantation into lethally irradiated WT recipients and serial BM transplantation studies were performed as previously described (Yvan-Charvet et al., 2010). After 5 weeks of reconstitution, mice were *i.p* injected with poly:IC (250  $\mu$ g/ injection with a cumulative dose of 750  $\mu$ g/mice, Invivogen) to induce gene deletion/recombination. Mice were used between 3 and 5 months after the injections of poly:IC depending of the experiment to allow the development of myeloproliferative neoplasms (Moran-Crusio et al., 2011).

### Lentiviral BM transplantation

The lentiviral BM transplant assay was performed as previously described (Gautier et al., 2013). In brief, *Mx1-Cre*<sup>+</sup> and *Mx1-Cre*<sup>+</sup> *Tet2*<sup>fl/fl</sup> mice were injected with 5-fluorouracile (3mg/mice of 5-FU, F6627, Sigma) 3 days before the experiment to enrich HSPCs within the BM. Control, ABCA1-WT and ABCA1 mutant lentiviral particles (pLKO lentiviral vector containing a MSCV-IRES-EGFP sequence, Genecust) were titrated and used to transduce *Mx1-Cre*<sup>+</sup> or *Mx1-Cre*<sup>+</sup> *Tet2*<sup>fl/fl</sup> cells. BM cells were cultured for 24 h in transplantation media (RPMI + 10% FBS + 6 ng/ml IL-3 (Corning), 10 ng/ml IL-6, and 10 ng/ml stem cell factor (Milteny Biotech))

and treated with lentiviral particles (MOI of 5 in the presence of polybrene (Sigma)). After washing, the cells were used for BM transplantation into lethally irradiated WT or human apoA-1 transgenic recipient mice as indicated in the figure legends. The transduction efficiency ranged from 70%–90% in LSK cells before implantation as previously described (Gough and Raines, 2003; Pikman et al., 2006; Westerterp et al., 2012). After 5 weeks of reconstitution, mice were *i.p.* injected with poly:IC (250  $\mu$ g/ injection with a cumulative dose of 750  $\mu$ g/mice, Invivogen) to induce gene deletion/recombination. Mice were used between 3 and 5 months after the injections of poly:IC depending of the experiment.

#### White blood cell counts-

Leukocytes, differential blood counts, platelets and erythrocytes were quantified from whole blood using a hematology cell counter (HEMAVET® 950).

#### Histopathology

Mice were euthanized and tissues were harvested and fixed in 4% paraformaldehyde. Spleen was serially paraffin sectioned using a Microm HM340E microtome (Microm Microtech, Francheville France) and stained with H&E for morphological analysis as previously described (Yvan-Charvet et al., 2010).

#### HEK293 cell transfection and culture

HEK293 cells at a density of  $10^6$  cells/well were transiently transfected with similar amounts of control empty vector (pcDNA 3.1<sup>+</sup>), ABCA1-WT or mutant cDNA using LipofectAMINE 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Then, cells were incubated for different times in DMEM containing 10% FBS before treatments as indicated in the figure legends.

#### Human THP-1 monocytic leukemia cells and treatments

Non-adherent THP-1 monocytes were transduced at MOI of 5 with control, ABCA1-WT and ABCA1 mutant lentiviral particles (pLKO lentiviral vector containing a CMV promoter, Genecust) in the presence of polybrene (Sigma) and used 3 days later for experiments as described in the figure legends. THP1 cells were treated for 16 hours with puromycin 24 hours after transfection to improve the transient transduction/transfection efficiency up to 60% to 80% (data not shown), which slowed down the proliferation rate of these cells. In some experiments, stable overexpressing ABCA1-WT and ABCA1 mutants THP-1 macrophages were generated after lentiviral transduction and GFP selection of a puromycin resistant pLKO vector containing ABCA1 gene.

#### BM harvest and treatment

Briefly, femurs were flushed with ice-cold PBS and centrifugated for 5min at 1,000rpm to extract BM cells. After red blood cell lysis, over 90% of BM cells were CD45-positive cells of hematopoietic origin (Westerterp et al., 2012). Primary BM cells were resuspended in IMDM (GIBCO) containing 10% FCS (STEMCELL Technologies) and cultured for 1 h in tissue culture flasks to remove adherent cells, including macrophages. The transduction rate of control, ABCA1-WT and ABCA1 mutant lentiviral particles was determined after BM transplantation as described above. Suspended cells were then normalized to the same concentration and cultured for 72 h in the presence of 6 ng/mL IL-3 and 2ng/mL GM-CSF (R&D Systems). In some experiments, the cyclodextrin (Sigma) was used at the final concentration of 5 mM, tempol (EMD Millipore) at 4 mM and anti-IL3R $\beta$  AF549 antibody (R&D Systems) at 50  $\mu$ g/mL.

#### [<sup>3</sup>H]-Thymidine proliferation assay

For proliferation assays, cells were pulsed for 2 h with 2  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H]-thymidine, and the radioactivity incorporated into the cells was determined by standard procedures using a liquid scintillation counter.

#### Isotopic cholesterol efflux assay

THP-1 monocytes were treated with 100 nmol/L PMA (Phorbol myristate acetate) for 24 hour to facilitate differentiation into macrophages and cultured for 24 h in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) containing 2  $\mu$ Ci/ml of [<sup>3</sup>H]-cholesterol. Cholesterol efflux was performed for 6 h in 0.2% BSA DMEM containing 15  $\mu$ g/mL apoA-I. The cholesterol efflux was expressed as the percentage of the radioactivity released from the cells in the medium relative to the total radioactivity in cells plus medium (Yvan-Charvet et al., 2010).

#### Cellular and tissue cholesterol content

Total lipids were extracted with chloroform/methanol from total cell lysates. Cholesterol mass in cells was determined using colorimetric kits (Wako Chemicals).

#### Flow cytometry analysis

BM cells, peripheral blood and splenocytes were collected from leg bones, blood and spleen cells after manual flushing or grinding, lysis to remove red blood cells and filtering through a 40- $\mu$ m cell strainer as previously described (Yvan-Charvet et al., 2010). For peripheral blood leukocytes analysis, 100  $\mu$ L of blood were collected into EDTA tubes before red blood cell lysis and filtration. Freshly isolated BM, spleen and blood cells were stained with the appropriate antibodies for 30 min on ice. Cellular cholesterol content was

quantified using the Bodipy-cholesterol probe (Life Technologies). Phosphoflow staining was performed according to the manufacturer's instruction (BD Biosciences). HSPC and hematopoietic progenitor subsets and myeloid cell populations were analyzed by flow cytometry using an LSR Fortessa (Becton Dickinson) or sorted with a FACSAria II instrument (Becton Dickinson). All gating strategies are depicted in the Figures. Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star).

### Cholera Toxin staining

After a wash in complete growth medium, THP-1 transduced monocytes were stained 15min at 37°C, in 1 µg/ml working solution of Cholera Toxin Subunit B, Alexa Fluor 594 conjugate (Invitrogen, C34777). Cells were then stained with 1ng/ml working solution of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and washed 3 times in PBS1X. Immunostaining of cells was read on a Nikon Confocal A1R microscope.

### Antibodies

TCR-β (H57-597), F4/80 (BM8), CD2 (RM2-5), CD3e (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD8b (53-6.7), CD19 (eBio1D3), CD45R (B220, RA3-6B2), Gr-1 (Ly6G, RB6-8C5), Cd11b (Mac1, M1/70), Ter119 (Ly76) and NK1.1 (Ly53, PK136)-FITC were all from eBioscience and used for lineage determination. c-Kit (CD117, ACK2)-APCeFluor780 from eBioscience, Sca-1-Pacific blue from Biolegend, FcγRII/III-PE (CD16/32, 2.4G2), CD34 (RAM34)-AlexaFluor 647, CD135 (Flt3, A2F10)-PE, CD150 (Slamf1, TC15-12F12.2)-PECy7 were from Biolegend and used to quantify HSPCs and progenitor subsets. Peripheral leukocytes were stained with CD115 (AFS98)-APC, CD45 (30-F11)-APCCy7 and Ly6C/G or Gr-1 (RB6-8C5)-PercPCy5.5 from eBioscience and BD Biosciences, respectively.

### RNA analysis

Total RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR were performed as described previously (Yvan-Charvet et al., 2010). m36B4 RNA expression was used to account for variability in the initial quantities of mRNA.

### Analysis of DNA hydroxymethylation

Global 5-hmC levels in genomic DNA isolated from blood cells were evaluated by ELISA, following manufacturer's instructions (MethylFlash Global DNA Hydroxymethylation ELISA Easy Kit).

### Western Blotting

The expression of ABCA1, TET2, phospho JAK2 and ERK were measured in BM cell by western blot analysis. Briefly, cell extracts were electrophoresed on 4%–20% gradient SDS-PAGE gels and transferred to 0.22-µm nitrocellulose membranes. The membrane was blocked in Tris-buffered saline, 0.1% Tween20 containing 5%(w/v) nonfat milk (TBST-nfm) at room temperature (RT) for 1h and then incubated with the primary antibody (TET2, phospho JAK2 and ERK antibodies from Cell Signaling and ABAC1 antibody from Abcam) in TBST-nfm at RT for 4h, followed by incubation with the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. Proteins were detected by ECL chemiluminescence (Pierce). Intensity of each protein strips was quantified using ImageJ software.

## QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Data are shown as mean ± SEM. Statistical significance was performed using two-tailed parametric Student's t test or by one-way analysis of variance (ANOVA, 4-group comparisons) with a Bonferroni multiple comparison post-test according to the dataset (GraphPad software, San Diego, CA). Results were considered as statistically significant when  $p < 0.05$ . All the statistical details of experiment can be found in the figure legends.

## DATA AND CODE AVAILABILITY

The datasets supporting the current study have not been deposited in a public repository because of a pending patent at the time of submission but are available from the corresponding author on request.





## Emma Guilbaud

09/07/1995

Nationality: French

### Professional address:

INSERM Unit 1065

Molecular Medicine Department, Nice, France

**e-Mail:** [eguilbaud@unice.fr](mailto:eguilbaud@unice.fr)

**LinkedIn:** <https://www.linkedin.com/in/emma-guilbaud-254218181/>

## Research Experience

**2018-2021: PhD Student** - INSERM Unit 1065, Molecular Medicine Department, Nice, France

### **Project 1: Cholesterol efflux pathways hinder Kras-driven non-small cell lung cancer**

*Manuscript under submission, available upon request.*

**Laurent Yvan-Charvet, PhD, Head of team 13 “Metabolism and Cancer”**

- Integrated transcriptional analyses of metabolic perturbations in NSCLC patients
- Characterization of ABCA1/ABCG1-dependent cholesterol efflux in cancer cells in genetically engineered mouse model of lung cancer
- Investigation of the macrophage cholesterol flux through bone marrow transplantation during lung cancer progression
- Cholesterol removal in lung cancer regression

### **Project 2: PINK1-dependent mitophagy in lung cancer**

*Collaborative project, under preparation.*

**Jean-Ehrland Ricci, PhD, Head of team 3 “Metabolism, Cancers and Immune Responses”, with Sandrine Marchetti**

- Regulation of the mitophagy machinery in lung cancer cell lines: A549, LLC-1, KP cells
- Role of Pink1-dependent mitophagy in cancer progression using allograft mouse models
- Investigation of the mitophagy's role on immune surveillance *in vivo*
- Characterization of the sensitivity of mitophagy-deficient cancer cells upon chemotherapy and immunotherapy treatment

**2018 (6 months): Master 2 training** - INSERM Unit 1065, Molecular Medicine Department, Nice, France

**Laurent Yvan-Charvet, PhD, Head of team 13 “Metabolism and Cancer”**

Project title: Targeting cholesterol metabolism alterations in immune and cancer cells during lung cancer development.

**2017 (5 months): Master 1 training** - CNRS 7277 – INSERM 1091, Institute of Biology at Valrose, Nice, France

**Dr Maximilian Fürthauer “Membrane trafficking and developmental signalling in animal development”**

Project title: Role of the ESCRT complex during melanosomal biogenesis in zebrafish.

## Education

**2018-2021: PhD in Clinical and Therapeutic Research, Thesis defense in October 2021**

Scholarship of excellence from the Ministry of Research and Higher Education

ED85 University Côte d'Azur – Nice, France

**2016-2018 MSc degree in Genetics, Summa Cum Laude**

Specialty: Genetics, Immunology and Developmental biology, University Côte d'Azur – Nice, France

**2013-2016 BSc degree in Genetics, Summa Cum Laude**

Specialty: Molecular Biology and Genetics, University Côte d'Azur – Nice, France

## Technical Skills

### Cellular and Molecular Biology

- Transient transfection of siRNA
- Adenovirus protein over-expression
- Nanoblades production and infection (Cas9 RNP)
- Confocal microscopy (Nikon A1R, Zeiss)
- Tissue and cell immunofluorescence imagery
- Flow cytometry (BD FACs Canto, MACSQuant)
- Mitophagy monitoring; mito-Keima and mito-QC
- Cholesterol efflux
- Single-Cell RNA sequencing

### Animal Models and Cell Lines

“Experimental animal user research training course”  
UCA – Nice, France 2017

#### Mouse

- Genetically engineered mouse model
- Allograft mouse model
- Intraperitoneal and subcutaneous injection
- Bone marrow transplantation

#### Zebrafish

- Microinjection into zebrafish embryos

#### Cells

LLC-1, KP, A549, HeLa

### Informatics

- Excel
- ApE
- ImageJ
- FlowJo, MACS Quantify
- Phantasus, Cytoscape

### Languages

- French (native)
- English (fluent)

## Publications

**Guilbaud, E.**, Illié, M., Ivanov, S., Sarrazy, V., Vaillant, N., Ayrault, M., Castiglione, A., Rignol, G., Brest, P., Bazioti, V., Zaitsev, K., Lebrigand, K., Magnone, V., Bertolotto, C., Marchetti, S., Goldberg, I., Huby, T., Westerterp, M., Gautier, E. L., Mari, B., Barbry, P., Hofman, P., Yvan-Charvet, L. Cholesterol efflux pathways hinder KRAS-driven lung tumor progenitor cell expansion, *Manuscript under submission, available upon request.*

**Guilbaud, E.**, Nunez-Vazquez, S., Meola, P., Paul-Bellon, R., Vaillant, N., Chiche, J., Verhoeyen, E., Boscagli, C., Lacas-Gervais, S., Marchetti, S., Ricci, J-E. PINK1-dependent mitophagy restrains tumor growth: is it linked to the regulation of immuno-surveillance? *Manuscript under preparation.*

Nunez-Vazquez, S., Saura-Esteller, J., Sanchez-Vera, I., **Guilbaud, E.**, Cosialls, A, M., Pons, G., Ricci, J-E., Iglesias-Serret, D., Marchetti, S., Gil, J. The prohibitin-binding compound fluorizoline inhibits mitophagy in cancer cells. *Accepted in Oncogenesis July 2021*

Bazioti, V., La rose, A. M., Maassen, S, Bianchi, F., de Boer, R., **Guilbaud, E.**, Flohr-Svendson, A., Marmolejo Garza, A., Koster, M., Pranger, A., Langelaar-Makkinje, M., de Bruin, A., van de Sluis, B., Kohan, A., Yvan-Charvet, L., van den Bogaart, G., Westerterp, M. T-cell Abca1 and Abcg1 cholesterol efflux pathways suppress T-cell apoptosis and senescence and increase atherosclerosis in middle-aged Ldlr<sup>-/-</sup> mice. *Under submission at Nat Comm*

Viaud, M., Abdel-Wahab, O., Gall, J., Ivanov, S., Guinamard, R., Sore, S., Merlin, J., Ayrault, M., **Guilbaud, E.**, Jacquet, A., Auberger, P., Wand, N., Levine, R. L., Tall, A. R., Yvan-Charvet, L. ABCA1 Exerts Tumor-Suppressor Function in Myeloproliferative Neoplasms, *Cell Reports*, (2020) 30(10), pp. 3397-3410.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.056.

**Guilbaud, E.**, Gautier, E. L. and Yvan-Charvet, L. Macrophage Origin, Metabolic Reprogramming and IL-1 Signaling: Promises and Pitfalls in Lung Cancer, *Cancers*, (2019). 11(3), p. 298. doi: 10.3390/cancers11030298.

## Conferences

Lung Cancer Workshop, OncoAge. "Cholesterol efflux pathway and lung adenocarcinoma", *Oral presentation*  
Nice, France, 8<sup>th</sup> November 2019

"System Biology" formation, organized by Maxim Artyomov, *Training*  
Nice, France, 23-25 September 2019

3<sup>rd</sup> Edition of Metabolism and Cancer congress of Canceropôle PACA,

1<sup>st</sup> Join Meeting on Lung Cancer, MD Anderson Cancer Center and OncoAge,  
Nice, France, 5-7 September 2018

14<sup>th</sup> conference of the French Atherosclerosis Society (NSFA),  
Biarritz, France, 20-22 June 2018

