

Université de Montréal

Étude de la régulation des profils métaboliques par la méthyltransférase
Enhancer of Zeste Homologue 2 dans le cancer du sein triple négatif

Par

Myriame St-Arnaud

Université de Montréal, Faculté de pharmacie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade M. Sc. en sciences
pharmaceutiques, option pharmacogénomique

Décembre 2022

© Myriame St-Arnaud, 2022

Université de Montréal
Université de Montréal, Faculté de pharmacie

Ce mémoire intitulé

**Étude de la régulation des profils métaboliques par la méthyltransférase
Enhancer of Zeste Homologue 2 dans le cancer du sein triple négatif**

Présenté par

Myriame St-Arnaud

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Rami Al Batran

Président-rapporteur

Dre Geneviève Deblois

Directrice de recherche

Dre Julie Lessard

Membre du jury

Résumé

Étude de la régulation des profils métaboliques par la méthyltransférase Enhancer of Zeste Homologue 2 dans le cancer du sein triple négatif

Les cancers du sein triple-négatifs (CSTN) présentent un taux élevé de récurrence dû à la résistance aux chimiothérapies. Les adaptations du métabolisme cellulaire dans les CSTN contribuent à la résistance thérapeutique. Des changements du métabolisme de la glycolyse ou des acides aminés, peuvent permettre aux cellules de CSTN de s'adapter rapidement en situation de stress. Toutefois, de nouvelles vulnérabilités peuvent être exposées chez les cellules du CSTN au cours de ces adaptations métaboliques.

La méthyltransférase *Enhancer of Zeste Homologue 2* (EZH2) est connue pour son rôle dans l'identité cellulaire et la régulation de l'expression génique. Récemment, il a été montré qu'EZH2 joue un rôle dans la reprogrammation cellulaire des CSTN et contribue au développement de la résistance à la chimiothérapie. Mais les implications de cette reprogrammation sur le métabolisme des cellules CSTN, ne sont pas encore clairement identifiées. Ce projet a pour but d'étudier si les modifications épigénétiques résultant de l'activité d'EZH2 contribuent à la régulation du métabolisme cellulaire et permet les adaptations métaboliques dans les CSTN.

Dans cette étude, nous utilisons les molécules UNC1999 et EPZ-4638, deux inhibiteurs sélectifs de l'activité enzymatique d'EZH2. Par des approches génomiques, transcriptomiques et métabolomiques, nous montrons que l'inhibition pharmacologique d'EZH2 induit des changements métaboliques caractérisés par une perturbation de la glycolyse et une résistance accrue à la privation de glucose. Nous observons aussi une augmentation de la dépendance à la glutamine et une utilisation accrue de la glutamine intracellulaire lors de l'inhibition d'EZH2. Ces vulnérabilités constituent des cibles potentielles pour un traitement concomitant avec le UNC1999.

Finalement, nous proposons un mécanisme impliquant le facteur de transcription *Estrogen Related Receptor-alpha* (ERR α) comme médiateur contribuant à l'effet métabolique résultant de l'inhibition d'EZH2 dans les CSTN. Les données préliminaires présentées dans ce mémoire proposent pour la première fois que les inhibiteurs d'EZH2 pourraient être utilisés pour induire des vulnérabilités métaboliques qui pourraient potentiellement être exploitées dans les CSTN.

Mots clés: Cancer du sein triple négatif, EZH2, métabolisme, épigénétique, glutamine, UNC1999, EPZ-4638, vulnérabilités métaboliques, cibles thérapeutiques.

Abstract

Investigating the Regulation of Metabolic Profiles by Enhancer of Zeste Homologue 2 in Triple Negative Breast Cancer

Triple-negative breast cancers (TNBC) have a high rate of recurrence due to resistance to chemotherapy. Adaptations of cellular metabolism in TNBCs contribute to therapeutic resistance. Changes in glycolysis or amino acid metabolism may allow TNBC cells to adapt rapidly under stress. However, new and potentially targetable vulnerabilities may be exposed in TNBC cells during these metabolic adaptations.

Methyltransferase Enhancer of Zest Homologue 2 (EZH2) is known for its role in cell identity and regulation of gene expression. Recently, EZH2 was shown to play a role in the cellular reprogramming of TNBCs and to contribute to the development of resistance to chemotherapy. But the implications of this reprogramming on the TNBC metabolism are not yet clearly identified. This project aims to investigate whether epigenetic modifications resulting from EZH2 activity contribute to the regulation of cellular metabolism and enable metabolic adaptations in TNBCs.

In this study, we use the molecules UNC1999 and EPZ-4638, two selective inhibitors of the enzymatic activity of EZH2. Using genomic, transcriptomic and metabolomic approaches, we show that pharmacological inhibition of EZH2 induces metabolic changes characterized by disruption of glycolysis and increased resistance to glucose starvation. We also observe an increase in glutamine dependence and increased use of intracellular glutamine upon inhibition of EZH2. We show that these vulnerabilities are potential targets for concurrent treatment with UNC1999. Finally, we propose a mechanism proposing that the transcription factor Estrogen Related Receptor-alpha ($ERR\alpha$) contributes to the metabolic effect resulting from EZH2 inhibition in TNBCs. The preliminary data presented in this thesis propose for the first time that EZH2 inhibitors could be used to induce metabolic vulnerabilities that may potentially be exploited in TNBC.

Keywords: Triple-negative breast cancer, EZH2, metabolism, epigenetics, glutamine, UNC1999, EPZ-4638, metabolic vulnerabilities, therapeutic targets.

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction	15
1.1) Le cancer du sein.....	15
1.1.1) Le développement du cancer du sein.....	15
1.1.2) Types de cellules des glandes mammaires et développement du cancer du sein.....	15
1.1.3) Statistiques du cancer du sein au Canada.....	16
1.1.4) Sous-types de cancer du sein.....	17
1.1.4.1) Classification des sous-types cliniques.....	17
1.1.4.2) La classification moléculaire.....	18
1.1.5) Traitements cliniques pour le cancer du sein.....	20
1.1.5.1) Chimiothérapie générale.....	20
1.1.5.2) Thérapies ciblées selon chaque sous-type clinique.....	21
1.2) Métabolisme des cellules de cancer du sein.....	23
1.2.1) Un préambule au métabolisme cellulaire.....	23
1.2.2) Altérations du métabolisme dans le cancer du sein.....	23
1.2.3) Principales voies métaboliques altérées dans les cancers du sein.....	25
1.2.4) La plasticité du métabolisme du cancer et les modifications épigénétiques.....	30
1.3) L'épigénétique dans les cancers.....	31
1.3.1) Les fondements de l'épigénétique.....	31
1.3.2) Altérations épigénétiques versus génétiques.....	32
1.3.3) Les enzymes épigénétiques.....	32
1.3.4) Comment l'épigénétique régule l'identité cellulaire.....	33
1.3.5) Altérations épigénétique dans le cancer.....	34
1.3.6) Cibler des enzymes épigénétiques dans les cancers.....	38
1.3.7) EZH2 dans le cancer du sein.....	39
1.3.7.1) Mécanisme d'action.....	40
1.3.7.2) L'expression d'EZH2 dans les cancers du sein et son potentiel en tant que cible thérapeutique.....	41
Chapitre 2 : Rationnel, hypothèses et objectifs	43
2.1) Mise en contexte.....	43
2.2) Hypothèses et objectifs.....	43
2.3) Approches expérimentales.....	44

2.3.1) Premier objectif de recherche : Caractériser les voies métaboliques altérées à la suite de l'inhibition de l'activité d'EZH2.....	44
2.3.2) Deuxième objectif de recherche : Identifier les mécanismes transcriptionnels et épigénétiques impliqués dans cette régulation	45
2.3.3) Déterminer les vulnérabilités métaboliques et épigénétiques résultant de ces reprogrammations et pouvant être exploitées pour freiner la prolifération des CSTN.	46
Chapitre 3 : Matériel et méthodes	47
3.1) Culture et récolte cellulaire.....	47
3.2) Réactifs	48
3.3) Analyses statistiques	49
3.4) Essais de viabilité et de prolifération.....	50
3.5) Séquençage de l'ARN.....	50
3.6) Extraction de protéines, immunobuvardages et analyses	51
3.7) Métabolomique	52
3.7.1) Analyses des métabolites intracellulaires de modèles de CSTN.....	52
3.7.2) Traçage de la glutamine	53
Chapitre 4 : Résultats	54
4.1) L'expression de la méthyltransférase EZH2 est augmentée dans les cancers du sein de sous-type Basal.....	54
4.2) L'expression accrue de la méthyltransférase EZH2 est associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs du sein du sous-type Basal.	56
4.3) L'inhibition de l'activité d'EZH2 impacte peu la prolifération de lignées cellulaires CSTN de sous-type Basal.....	57
4.4) L'inhibition d'EZH2 affecte des voies métaboliques dans les modèles de CSTN.....	59
4.5) L'inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2 perturbe le métabolisme du glucose dans les cellules du CSTN.....	62
4.6) L'inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2 augmente la consommation de glutamine et change son utilisation dans les cellules CSTN.....	65
4.7) L'inhibition d'EZH2 change la sensibilité des cellules du CSTN aux modulations du métabolisme du glucose et de la glutamine.....	68
4.8) Le facteur de transcription <i>Estrogen-Related Receptor-alpha</i> (ERR α) contribue en partie aux changements métaboliques résultant de l'inhibition d'EZH2 dans les cellules du CSTN.	70
Chapitre 5 : Discussion	74
5.1) EZH2 joue un rôle important dans le cancer du sein triple négatif.	75

5.1.1) Les niveaux d'EZH2 (et non EZH1) sont associés à un mauvais pronostic dans les cancers du sein de sous-type triple-négatifs	75
5.1.2) Le rôle d'EZH2 dans le contrôle du métabolisme cellulaire dans un contexte PRC2-dépendant et PRC2-indépendant.	75
5.2) La méthyltransférase EZH2 joue un rôle dans la régulation du métabolisme des CSTN..	76
5.2.1) La régulation de la glycolyse par EZH2 dans les CSTN.....	76
5.2.2) L'augmentation de la dépendance à la glutamine à la suite de l'inhibition pharmacologique d'EZH2 dans les CSTN	77
5.2.3) La régulation des voies métaboliques alimentées dépendantes à la glutamine par EZH2 dans les CSTN	77
5.2.4) La régulation d'autres voies métaboliques à la suite de l'inhibition d'EZH2 dans les CSTN	78
5.2.5) L'importance d'étudier les changements métaboliques dans différents modèles.	78
5.3) La régulation mécanistique et transcriptionnelle des changements métaboliques en réponse à l'inhibition d'EZH2.....	79
5.4) L'utilisation des inhibiteurs d'EZH2 pour bloquer la progression des tumeurs du CSTN.	80
Chapitre 6 : Conclusion	81
Bibliographie	82

Liste des figures

Figure 1.1: Modèle de la progression tumorale.....	16
Figure 1.2: Schéma des voies métaboliques souvent altérées dans le cancer du sein.....	25
Figure 1.3: Modification post-traductionnelles des queues d'histones dans le cancer du sein.....	34
Figure 1.4 : Fonction dite "canonique" d'EZH2 au sein du PRC2.....	39
Figure 4.1: L'expression de la méthyltransférase EZH2 est augmentée dans les cancers du sein de sous-type Basal.....	54
Figure 4.2: L'expression accrue de la méthyltransférase EZH2 est associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs du sein du sous-type Basal.....	56
Figure 4.3: L'inhibition de l'activité d'EZH2 a peu d'impact sur la prolifération des lignées cellulaire CSTN de sous-type Basal.....	57
Figure 4.4: L'inhibition d'EZH2 affecte des voies métaboliques dans les modèles de CSTN.....	59
Figure 4.5: L'inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2 perturbe le métabolisme du glucose dans les cellules du CSTN.....	63
Figure 4.6: L'inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2 augmente la consommation de glutamine et module son utilisation dans les cellules du CSTN.....	66
Figure 4.7: L'inhibition d'EZH2 change la sensibilité des cellules du CSTN aux modulations du métabolisme du glucose et de la glutamine.....	68
Figure 4.8: Le facteur de transcription <i>Estrogen-Related Receptor-alpha</i> (ERR α) contribue, en partie, aux changements métaboliques résultant de l'inhibition d'EZH2 dans les cellules du CSTN.....	71
Figure 4.9: Schéma représentant les conclusions principales des résultats obtenus pour ce projet de recherche.....	72

Liste des tableaux

Tableau 1 : Anticorps utilisés pour ce projet.....47

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées pour les PCR dans ce projet.....48

Liste des abréviations

2-HG:	2-hydroxyglutarate
A:	Adénine
ACLY:	ATP citrate lyase
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AMPK:	Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate
ARN:	Acide ribonucléique
Asp:	Aspartate
ATP:	Adénosine triphosphate
BET:	Bromodomaine et domaine extra terminal
BRCA1:	<i>Breast Cancer Gene 1</i>
BRCA2:	<i>Breast Cancer Gene 2</i>
BSO:	Buthionine Sulfoximine
C:	Cytosine
CAC:	Cycle de l'acide citrique
CARM1:	<i>Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1</i>
ChIP-seq:	Immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage
Cit:	Citrate
cMYB:	Facteur de transcription cMYB
CPRC:	Cancer(s) de la prostate résistant(s) à la castration
CSTN:	Cancer(s) du sein triple-négatif(s)
DNMT:	Méthyltransférase(s) de l'ADN
DNMT1:	Méthyltransférase 1 de l'ADN
DNMT3A:	Méthyltransférase 3A de l'ADN
DNMT3B:	Méthyltransférase 3B de l'ADN
DNMTi:	Inhibiteur de méthyltransférase de l'ADN
DOT1L:	Perturbateur de la méthyltransférase du <i>Silencing-1-Like</i> télomérique
E2:	Œstradiol
EGFR2:	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor erb-b2 receptor tyrosine kinase</i>
ER+:	Cancer(s) du sein positif(s) pour le récepteur d'œstrogène
ERRα:	<i>Estrogen Related Receptor alpha</i> (Gène)
ERα:	Récepteur alpha de l'œstrogène (Facteur de transcription)
ESR1:	Récepteur aux œstrogènes 1
EZH1:	<i>Enhancer of Zeste Homologue 1</i>
EZH2:	<i>Enhancer of Zeste Homologue 2</i>
FA:	<i>Fatty Acids</i>
FDA:	<i>Food and Drug Association</i>
FISH:	Hybridation <i>in situ</i> par fluorescence
FOXA1:	<i>Forkhead Box A1</i>
Fum:	Fumarate

GATA3:	<i>GATA Binding Protein 3</i>
GATA4:	<i>GATA Binding Protein 4</i>
GLS:	Glutaminase
GLUT:	Famille de transporteurs de glucose
GLUT-1:	Transporteur de glucose 1
H3K27me3:	Triméthylation du résidu lysine 27 sur l'histone 3
H3K4ac:	Lysine 4 mono-acétylée de l'histone 3
H3K4me3:	Triméthylation du résidu lysine 4 sur l'histone 3
H3K9me3:	Triméthylation du résidu lysine 9 sur l'histone 3
H4K12ac:	Lysine 12 mono-acétylée de l'histone 4
H4K16ac:	Lysine 16 mono-acétylée de l'histone 4
HAT:	Acétylase(s) des queues d'histones
HDAC:	Désacétylase(s) des queues d'histones
HDM:	Déméthylase(s) des queues d'histones
HER2+:	Cancer(s) du sein amplifié(s) pour HER2
HK:	Hexokinase
HMT:	Méthyltransférase(s) des queues d'histones
Ict:	Isocitrate
IHC:	Immunohistochimie
LSD1:	<i>Lysine-Specific Demethylase 1</i>
Mal:	Malate
MPT:	Modifications post-traductionnelles
NADH:	Nicotinamide adénine dinucléotide avec hydrogène
NADPH:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OAA:	Oxaloacétate
OGDH:	déshydrogénase de l' α KG
OXPHOS:	Phosphorylation oxydative
PAM50:	<i>Prediction Analysis of Microarray</i>
PARP:	Poly(ADP-ribose) polymérase
PHGDH:	3-phosphoglycérate déshydrogénase
PK:	Pyruvate kinase
PPP:	Voies des pentoses phosphates
PR:	Progestérone
PRC2:	Complexe répressif <i>Polycomb 2</i>
PRMT:	Famille des protéines arginine méthyltransférases
PRMT1:	Protéine arginine méthyltransférase 1
RA:	Récepteur(s) d'androgène(s)
ROS:	Espèces réactives de l'oxygène
RTK:	Kinase(s) du récepteur tyrosine
SAM:	S-adénosyl méthionine
STAT3:	Transducteur de signal et activateur du gène de transcription 3

Suc:	Succinate
SWI/SNF:	Commutation défectueuse/saccharose non-fermentale
TCA:	Cycle de l'acide tricarboxylique
TEM:	Transition(s) épithéliale-mésenchymateuse(s)
TNBC:	<i>Triple Negative Breast Cancer</i>
XBP1:	<i>X-Box Binding Protein 1</i>
αKG:	alpha-cétoglutarate
G6P:	Glucose-6-Phosphate
F-1,6-BP:	Fructose-1,6,-Bisphosphate
2,3-BPG:	<i>2,3-Bisphosphoglyceric acid</i>
PRPP:	<i>Phosphoglyceribosyl pyrophosphate</i>
IMP:	Inosine monophosphate
GCI:	<i>Goodman Cancer Institute</i>
FBS:	Sérum bovin fœtal Gibco
siESRRA:	ARN d'interférence pour ERR α
siC:	ARN d'interférence de contrôle
DMSO:	Sulfoxyde de diméthyle
SDS:	Sodium de dodécylsulfate
qPCR:	Réactions de polymérase en chaîne quantitative
TBS:	<i>Tris-buffered Saline</i>
IRIC:	Institut de recherche en immunologie et cancérologie
TCGA:	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
ARNm:	ARN messenger
RSEM:	<i>RNA-sequencing by Expectation Maximization</i>
OS:	<i>Overall Survival</i>
HR:	<i>Hazard Ratio</i>
C29:	Composé 29
SLC6A1:	<i>Solute Carrier Family 6 member 1</i>
GLUL:	<i>Glutamate Amonia Lygase</i>
LDHB:	<i>Lactate Dehydrogenase B</i>
NES:	<i>Normalized Enrichment Score</i>
GSEA:	<i>Gene Set Expression Analysis</i>
FDR:	<i>False Discovery Rate</i>
EGD:	Expression génique différentielle
PDX:	Xénogreffe dérivée de patient (<i>Patient Derived Xenographs</i>)
LC-MS:	Chromatographie en phase liquide et spectroscopie de masse (<i>ions pairing</i>)
DMEM:	Milieu de culture Eagle modifié de Dulbecco
R5P:	Ribose-5-Phosphate
R-1,5-P:	Ribose-1,5-Bisphosphate
xCT:	Récepteur intégral membranaire contre-transporteur

Remerciements

Ce travail ne serait complet sans que je fasse mention spéciale aux personnes qui m'ont accompagnée, guidée et encouragée tout au long de mes études au deuxième cycle. Ce fut tout un défi. J'ai appris à me connaître, j'ai développé plusieurs atouts et habitudes de travail qui me suivront dans ma carrière future ainsi que ma vie personnelle et surtout, j'ai éprouvé du plaisir à contribuer du mieux que je le pouvais à l'avancée de la recherche en pharmacologie.

Premièrement, je tiens à remercier profondément ma directrice de recherche, Dre Geneviève Deblois, qui a toujours su me diriger dans la bonne direction avec ses questions pertinentes, ses propos judicieux et nos conversations quotidiennes. Je suis redevable à son approche familière, son expertise, son entregent, sa patience et sa compréhension. Dre Deblois su accomplir son rôle de mentore dans mon cheminement et plus encore. Je lui serais toujours reconnaissante d'avoir eu un impact si positif dans mon développement académique, professionnel et aussi personnel.

Je remercie également toute l'équipe de recherche du Dre Deblois. Je m'attarde particulièrement à ma collègue Marina Fukano, qui m'a aidée à développer une bonne éthique de travail, m'a accompagnée dans la planification et l'exécution de plusieurs grosses expériences et surtout m'a permis d'apprécier le travail d'équipe même en temps de pandémie mondiale.

Un grand remerciement final à mes complices de vie, dont ma grande sœur Geneviève, qui a su m'encourager en me questionnant constamment sur mes avancées et mes conclusions, mais aussi en me faisant rire et me rassurant quand j'étais dans un creux. Je remercie aussi mon compagnon de vie, Max, qui m'apportait à la station de métro à 6h tous les matins afin que je puisse être à l'heure au laboratoire et s'assurait aussi que je mange bien en me faisant des bons repas. Merci à vous de toujours m'encourager dans mes idées de projets quelques fois farfelus!

Contributions spéciales

Ce travail est le fruit d'une collaboration avec Marina Fukano (candidate au doctorat), Gabriel Alzial (candidat au doctorat), l'association du Dre Deblois avec le *Rosalind & Morris Goodman Cancer Institute*, ainsi que les plateformes de génomique et de bio-informatique de l'Institut de recherche en immunologie et oncologie.

Dans cet ouvrage, toutes les expériences ont été effectuées par moi à l'exception des expériences ou parties d'expériences ci-dessous, auxquelles les personnes suivantes ont collaboré :

Marina Fukano a effectué les tests de croissances des tumeurs de modèles murins. Elle a aussi contribué aux extractions et analyses des expériences de métabolomique de ce projet.

Marina Fukano, Gabriel Alzial ont contribué à l'extraction des métabolites pour l'expérience le traçage de la glutamine C¹³ dans les cellules Hs-578T. L'analyse de métabolomique des résultats a été réalisée par la plateforme de métabolomique du *Goodman Cancer Institute* de l'Université McGill (Marianna Da Silva et Daina Avisonis). Les analyses de séquençage d'ARN et l'analyse d'expression génique a été effectuée par les plateformes de génomique et de bio-informatique de l'Institut de recherche en immunologie et oncologie.

Tout ce projet fut réalisé sous la supervision et les conseils du Dre Geneviève Deblois.

Chapitre 1 : Introduction

1.1) Le cancer du sein

1.1.1) Le développement du cancer du sein

Le cancer du sein n'est pas une seule maladie, mais plutôt un terme chapeau utilisé pour regrouper tous les cancers qui ont leur origine dans les tissus mammaires (Polyak 2007). De plus, le cancer du sein est une maladie très hétérogène en raison de la diversité des aberrations génétiques que l'on retrouve dans les cellules d'origine (Bedard et al. 2013). Cette hétérogénéité représente l'un des principaux défis dans le traitement du cancer du sein et fait toujours l'objet d'importantes investigations. Les événements déclencheurs du cancer du sein sont principalement génétiques (Lo and Sukumar 2008). La prolifération de cellules mammaires contenant des aberrations génétiques peut résulter en une tumeur, chaque cycle cellulaire ouvrant la porte à de nouvelles altérations génétiques ainsi qu'à d'autres types de mutations. Le cancer du sein se développe initialement et prend place dans les tissus mammaires sous forme de *carcinome canalaire in situ*. Si elles ne sont pas diagnostiquées et/ou non traitées, ces lésions peuvent éventuellement métastaser dans les tissus adjacents et distants.

1.1.2) Types de cellules des glandes mammaires et développement du cancer du sein

Les carcinomes canaux et lobulaires représentent les types de cancers du sein les plus fréquemment diagnostiqués. La plupart des cancers du sein surviennent lors de la transformation des cellules épithéliales ou myoépithéliales situées dans le lobule terminal des canaux collecteurs des glandes mammaires. Une telle transformation cellulaire entraîne une prolifération incontrôlée de cellules épithéliales, avec une couche myoépithéliale et une membrane basale intactes, donnant lieu à un *carcinome canalaire in situ* (Boix-Montesinos et al. 2021). L'invasion des tissus voisins due à l'affaiblissement de la membrane basale et de la couche de cellules myoépithéliales permet la progression vers le stade de *carcinome canalaire invasif*. Une progression continue de la tumeur conduira au stade *métastatique du cancer du sein*, caractérisé par la perte de la couche de cellules myoépithéliales et de la membrane basale. À ce stade, l'angiogenèse permet aux cellules tumorales d'envahir les vaisseaux sanguins et les sites distaux tels que le foie, le cerveau, les os et les poumons. (**Figure 1.1**) Le cancer du sein métastatique est considéré comme une maladie incurable,

d'où la nécessité de développer des marqueurs de diagnostic précoce et des thérapies efficaces pour prévenir les rechutes métastatiques.

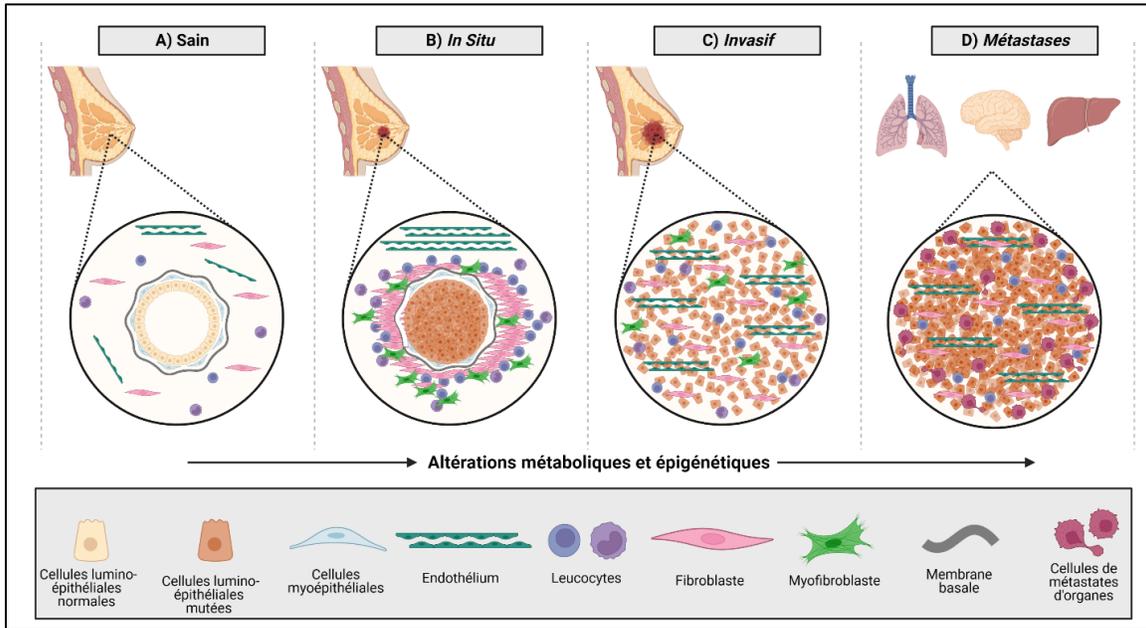


Figure 1.1 : Modèle de la progression tumorale mammaire *inspiration* (Polyak 2007).

A) Les *conduits mammaires sains* renferment la membrane basale et une couche de cellules épithéliales et myoépithéliales luminales. Leur stroma est constitué de divers leucocytes, fibroblastes et cellules endothéliales. **B)** Le stade *In Situ* se caractérise par des défauts génétiques qui affectent les cellules épithéliales. La dégradation de la membrane basale entraîne une diminution des cellules myoépithéliales. La composition du stroma change également. Le nombre de fibroblastes, de myofibroblastes, de lymphocytes et de cellules endothéliales augmente. **C)** La dégradation de la membrane basale et la perte de cellules myoépithéliales entraînent des *carcinomes invasifs*. **D)** À ce stade, les cellules tumorales peuvent envahir les tissus environnants et migrer vers des organes distants, entraînant des *métastases*.

1.1.3) Statistiques du cancer du sein au Canada

Le cancer du sein est le deuxième cancer le plus diagnostiqué chez les Canadiennes après les cancers de la peau autres que les mélanomes (Public Health Agency of Canada n.d.). Chaque année, le cancer du sein représente jusqu'à 25 % de tous les nouveaux diagnostics de cancer chez les Canadiennes. Bien que moins fréquent, le cancer du sein peut également survenir chez les hommes, avec environ 260 cas de cancers du sein chez les hommes pour les 27 700 cas de cancer du sein chez les femmes au Canada par année (Siegel, Miller, and Jemal 2020). On estime que 5 400 femmes et 55 hommes décéderont de cette maladie cette année. Heureusement, l'augmentation des connaissances sur le cancer du sein résultant de la recherche a conduit à une meilleure compréhension globale de cette maladie. Les thérapies ciblées développées pour traiter des sous-

types spécifiques de cancers du sein ont amélioré le taux de survie net pour 5 ans des femmes canadiennes à 89 % et celui des hommes canadiens à 76 % (Siegel, Miller, and Jemal 2020).

1.1.4) Sous-types de cancer du sein

Le cancer du sein peut être classé en différents sous-types, basés soit sur des marqueurs histopathologiques, qui fournissent la classification des *sous-types cliniques*, soit sur des profils transcriptionnels, qui donnent lieu à la classification des *sous-types moléculaires*.

1.1.4.1) Classification des sous-types cliniques

La méthode classique de sous-typage du cancer du sein repose sur des marqueurs histopathologiques pour la détection de protéines bien définies qui caractérisent chaque sous-type de cancer du sein. Elle fournit ce qu'on appelle la classification clinique qui guidera la prise en charge thérapeutique. Trois sous-types cliniques principaux existent pour le cancer du sein, qui sont définis par la présence de trois marqueurs protéiques différents.

Le cancer du sein positif pour le récepteur d'œstrogène (ER+). Les tumeurs du sein ER+ (aussi appelées tumeurs du sein hormono-positives) sont caractérisées par l'expression du récepteur alpha de l'œstrogène (ER α), généralement évaluée par immunohistochimie (IHC). Le sous-type de cancer du sein ER+ représente entre 60 et 70 % de tous les cas de cancer du sein (Clarke et al. 2003). ER α est un facteur de transcription faisant partie de la famille des récepteurs nucléaires qui, lors de son activation par son ligand œstrogène (œstradiol, E2) régule l'expression des gènes qui contrôlent la prolifération des cellules. Les tumeurs de sous-type ER+ présentent un meilleur pronostic, en partie grâce à des approches thérapeutiques efficaces incluant l'hormonothérapie, où des inhibiteurs ciblant l'activité ou la stabilité d'ER α (anti-œstrogène), ou la synthèse d'œstradiol (inhibiteurs de l'aromatase) peuvent être administrés pour bloquer la prolifération des cellules cancéreuses. La progestérone (PR) est une cible de ER α et lorsque PR est exprimé, cela indique une forte activité de ER α . Les patients-es atteints-es d'un cancer du sein ER+/PR+ ont généralement un meilleur pronostic car les tumeurs présentent une réponse plus favorable aux anti-œstrogènes (Onitilo et al. 2009).

Cancer du sein amplifié pour HER2 (HER2+). L'amplification du gène *Human Epidermal Growth Factor Receptor erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (EGFR2)* est observée dans jusqu'à 20 % des cancers du sein et est associée à un phénotype agressif (Gajria and Chandarlapaty 2011). Le

gène *ERBB2* code pour le récepteur transmembranaire HER2 qui est une kinase du récepteur de la tyrosine (RTK) qui stimule les voies de signalisation de facteurs de croissance dans les cellules mammaires normales (Gajria and Chandarlapaty 2011). L'amplification du gène *ERBB2* est généralement détectée en clinique par IHC ou par *hybridation in situ par fluorescence* (FISH). Les patients-es diagnostiqués-es avec ce sous-type de cancer du sein présentent un pronostic moins favorable que les patients-es du sous-type ER+ (Alabdulkareem et al. 2018). Les approches thérapeutiques typiques pour les patients-es HER2+ comprennent des traitements avec des anticorps ciblant le domaine extracellulaire d'*HER2* comme le trastuzumab, qui empêche sa dimérisation et l'activation de la signalisation en aval, ou des inhibiteurs de son activité RTK comme le lapatinib (Romond et al. 2005). La combinaison du trastuzumab ou des inhibiteurs de la RTK avec la chimiothérapie a augmenté les taux de survie du cancer du sein HER2+ à un stade précoce à une survie globale de 80 % à 85 % (Siegel, Miller, and Jemal 2020).

Cancer du sein triple-négatif (CSTN). Les tumeurs du sein triple négatif représentent 12 à 15 % de tous les cancers du sein. Ce sous-type clinique est un sous-type défini par défaut puisqu'il est négatif pour l'amplification de HER2, et pour l'expression de ER et PR, tel qu'évalué par IHC et FISH, d'où le nom de cancer du sein triple négatif (CSTN). Ce sous-type est le plus agressif de tous, avec des taux de rechute s'élevant jusqu'à 60% post-chimiothérapie et une survie globale plus faible (Toss and Cristofanilli 2015). Parce qu'il est négatif pour les trois marqueurs cliniques du cancer du sein, il ne peut être traité avec aucune des thérapies ciblées mentionnées précédemment. Jusqu'à ce jour, aucune cible thérapeutique généralisée n'a été identifiée pour ce sous-type de cancer du sein. Par conséquent, les patients-es du CSTN sont principalement traités-es avec des agents de chimiothérapie, (discuté plus en détail dans la section 1.1.5 ci-dessous) (Furlanetto and Loibl 2020). Cependant, malgré une réponse initiale favorable à la chimiothérapie, de nombreux patients-es développent une résistance à ces thérapies, contribuant au mauvais pronostic de cette maladie. Cela souligne le besoin urgent d'identifier de nouveaux biomarqueurs exploitables et des cibles thérapeutiques efficaces pour ce sous-type clinique de cancer du sein.

1.1.4.2) La classification moléculaire

Malgré l'amélioration des taux de survie dû à l'utilisation de thérapies ciblées choisies en fonction de la classification des sous-types cliniques, des récurrences sont encore observées chez les patients-es atteints-es d'un cancer du sein, ce qui suggère qu'une meilleure compréhension de la

classification des tumeurs du sein et le développement de traitements thérapeutiques améliorés est nécessaire. Un autre système de classification, appelé classification moléculaire, basé sur les signatures d'expression génique a initialement été développé en 2000 par *Perou et al.* et consiste en une analyse par grappes hiérarchiques de l'expression génique issue de tumeurs mammaires de patientes de cancer du sein. Cette analyse a conduit à une liste de gènes intrinsèques qui a permis de souligner l'existence de quatre sous-types moléculaires de cancer du sein : Luminal, Normal-like, HER2 et Basal (Perou et al. 2000). Ils ont observé que chacun de ces sous-types moléculaires était associé à différents pronostics pour les patients-es, avec le type Basal au plus faible taux de survie, tandis que le sous-type luminal montrait les meilleurs résultats. Il a été suggéré plus tard que le sous-type normal était issu de cellules épithéliales et immunitaires normales incluses dans les échantillons de patients-es (Dai et al. 2015). Le sous-groupe luminal a ensuite été subdivisé en deux sous-types appelés luminal A et luminal B ; ce dernier étant associé à de moins bons résultats cliniques (Sørli et al. 2001). En 2009, *Parker* et ses collègues ont développé le *Prediction Analysis of Microarray* (PAM50), un classificateur efficace comprenant 50 gènes, qui a réanalysé les sous-groupes précédents et qui contribue maintenant à définir les quatre principaux sous-types moléculaires intrinsèques actuellement connus sous le nom de luminal A, luminal B, HER2-enrichi et de type basal (Parker et al. 2009).

Les sous-types moléculaires Luminaux Le sous-groupe moléculaire Luminal est caractérisé par la signature d'expression luminale et comprend l'expression du gène ER α (récepteur aux œstrogènes 1 (*ESR1*)) et de ses gènes cibles (Toss and Cristofanilli 2015), dont *GATA Binding Protein 3* (*GATA3*), *Forkhead Box A1* (*FOXA1*), *X-box Binding Protein 1* (*XBPI*) et le facteur de transcription *cMYB* (*cMYB*) (Cancer Genome Atlas Network 2012).

Le sous-type moléculaire enrichi en HER2 montre une expression significative de plusieurs récepteurs tyrosine kinases en plus de l'expression du gène ERBB2 et des gènes co-amplifiés (Miller, Balko, and Arteaga 2011).

Le sous-type moléculaire de type basal est caractérisé par l'expression de gènes des tissus mammaires basaux/myoépithéliaux normaux (Toss and Cristofanilli 2015). La relation entre le CSTN et les tumeurs de type basal est considérable, car plusieurs tumeurs triple-négatives sont incluses dans le sous-type de type basal. Pourtant, tous les CSTN ne sont pas identifiés comme des tumeurs de type basal par expression génique, et toutes les tumeurs de type basal n'appartiennent

pas au sous-type clinique CSTN. (Lehmann et al. 2011). Cependant l'enrichissement considérable des CSTN dans le sous-type Basal fait en sorte que c'est deux types de nomenclatures sont souvent confondues à tort.

La classification moléculaire des tumeurs du sein représente bien l'hétérogénéité des sous-types inter-tumorales du cancer du sein et pourrait aussi aider à révéler l'hétérogénéité intra-tumorale, qui est moins évidente, lorsqu'elle est appliquée au séquençage de gènes au niveau unicellulaire (Norum, Andersen, and Sørli 2014). Par conséquent, la classification moléculaire peut être utilisée avec la classification clinique pour aider à améliorer le diagnostic et prédire quels-elles patients-es bénéficieront d'un traitement spécifique.

1.1.5) Traitements cliniques pour le cancer du sein

1.1.5.1) Chimiothérapie générale

Les centaines de médicaments utilisés pour traiter différents cancers peuvent être divisées en agents ciblant des mécanismes de proliférations généraux et en médicaments ciblés développés pour cibler une caractéristique spécifique d'un groupe de tumeurs (Baldo and Pham 2013). Parmi ces composés, on retrouve des agents à base de platine qui sont des agents alkylants générant la polymérisation de l'ADN et provoquant des aberrations chromosomiques et des mutations génétiques (Thurston and Pysz 2021). Les taxanes sont des inhibiteurs de microtubules, et possèdent ainsi un mécanisme d'action général et un effet étendu, en inhibant la division cellulaire mitotique (Bharti et al. 2018). Les anthracyclines sont des agents intercalant de l'ADN et ont aussi un mécanisme d'action général. De nombreux agents de chimiothérapie ont des effets secondaires indésirables en raison de leur mécanisme d'action plutôt large (Thurston and Pysz 2021). Comme aucune cible thérapeutique commune aux CSTN n'est connue, ce sous-type de tumeurs est habituellement traité avec des agents de chimiothérapie. La chimiothérapie peut aussi être ajoutée aux traitements d'immunothérapie dans les CSTN ou aux thérapies anticancéreuses ciblés dans les autres sous-types pour augmenter leur efficacité. Bien que les tumeurs du CSTN présentent habituellement une réponse initiale favorable à la chimiothérapie, la résistance est fréquente et survient rapidement chez les patientes, d'où l'importance de d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

1.1.5.2) Thérapies ciblées selon chaque sous-type clinique

L'identification des mutations conductrices et des voies de signalisation altérées dans les tumeurs de patients-es atteints-es d'un cancer du sein a conduit au développement clinique de plusieurs agents ciblés moléculaires efficaces (Higgins and Baselga 2011). Les thérapies ciblées sont souvent ajoutées à la chimiothérapie pour augmenter la réponse au traitement, contrer la résistance thérapeutique aux agents de chimiothérapie et minimiser les effets secondaires chez les patients-es.

Tumeurs ER+ Le traitement ciblé du sous-type ER+ consiste en des inhibiteurs du récepteur ER, tels que le tamoxifène qui bloque son activité (Robert 1997), et les inhibiteurs de l'aromatase, comme le fulvestrant (Sammons, Kornblum, and Blackwell 2019) et le létrozole (Finn et al. 2016) qui empêche la synthèse de l'œstradiol, le ligand d'ER α . Le taux de succès de ce traitement ciblé est en relation avec le niveau d'expression et d'activité d'ER α . L'utilisation de ces agents a eu pour conséquence de diminuer de façon significative les taux de récurrence du cancer du sein sur une période de cinq ans pour les patients-es avec des ganglions axillaires positifs (Fowble et al. 1996). Malheureusement, toutes les tumeurs ER+ ne répondent pas aux anti-œstrogènes et aux inhibiteurs de l'aromatase. L'absence du récepteur aux œstrogènes ou sa faible activité sont les mécanismes de résistance *de novo* aux agents antihormonaux les plus courants (Clarke et al. 2003).

Tumeurs HER2+ Le pronostic des patients-es atteints-es du cancer du sein HER2+ est moins favorable que celui des patients-es atteints-es de tumeurs ER+ (Vu and Claret 2012). Le trastuzumab et le lapatinib sont les traitements de référence pour les patients-es atteints-es d'un cancer du sein HER2+ (Higgins and Baselga 2011). Le trastuzumab est un anticorps monoclonal recombinant dirigé contre le domaine extracellulaire IV de HER2 (Sørlie et al. 2001). Il a été reconnu comme un complément positif à la chimiothérapie des cancers du sein métastatiques qui surexpriment HER2, en augmentant le temps de progression de la maladie et, en contribuant à une plus longue durée de réponse au traitement et à un taux de mortalité plus faible à un an (Slamon et al. 2001). Le lapatinib est un inhibiteur de la tyrosine-kinase qui a été développé et approuvé à partir d'études de deuxième génération dans les maladies métastatiques comme alternative pour les patients-es atteints-es d'un cancer du sein HER2+ qui ne pouvaient pas ou plus bénéficier du trastuzumab (Ryan et al. 2008). Certaines tumeurs ne répondent pas à ces thérapies ciblées en

raison d'une résistance acquise par l'activation de voies de signalisation alternatives ou d'un blocage de l'interaction récepteur-anticorps par exemple (Lu et al. 2001).

Tumeurs triple-négatives Les tumeurs mammaires triples négatives sont celles dont le pronostic est le plus mauvais des trois sous-types cliniques (P. Sharma 2016) dû à l'absence de cible thérapeutique commune pour ce sous-type. La classification moléculaire et le profilage des tumeurs revêtent une importance particulière pour ce sous-type. Par exemple, le profilage des CSTN a permis d'identifier qu'un sous-groupe de tumeurs CSTN possèdent la mutation du gène Breast Cancer Gene-1 ou -2 (*BRCA1*, *BRCA2*). Ces tumeurs peuvent être ciblées avec des inhibiteurs de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) en concomitance avec la chimiothérapie. (Tutt et al. 2010). Les inhibiteurs de PARP, tels que l'olaparib et le talazoparib, avec la chimiothérapie sont devenus un traitement ciblé pour un sous-groupe de cancer du sein CSTN (M. Shen et al. 2020). La nécessité de poursuivre les recherches pour identifier de nouvelles thérapies ciblées pour les CSTN ou pour des sous-groupes de CSTN est donc un enjeu important dans la recherche en cancer du sein.

Chirurgie La chirurgie qui consiste à retirer les tissus cancéreux du sein, et parfois des ganglions lymphatiques adjacents, pour prévenir les métastases est également un traitement pour les patients-es atteints-es d'un cancer du sein. Une tumorectomie consiste en une chirurgie mammaire conservatrice qui sauve la majeure partie du sein. Une mastectomie consiste à retirer tout le sein. Le fait qu'un-e patient-e subisse une tumorectomie ou une mastectomie dépend de nombreux facteurs tels que la réactivité de la tumeur au traitement, les risques de récurrence du cancer du sein et des raisons personnelles ("Mastectomy" 2021).

Radiothérapie (Kuhl 2015) La radiothérapie est un ajout alternatif au régime de traitements des patients-es atteints-es du cancer du sein. Les cellules cancéreuses sont brisées à l'aide de rayons X à haute énergie, de protons ou d'autres particules. L'ajout de la radiothérapie à la chirurgie s'est avéré réduire les taux de récurrence locale de plus de 30 % sans radiothérapie, à moins de 5 % à 10 ans. La prescription de la radiothérapie dépend du profil tumoral de la tumeur du sein, par conséquent, cette approche n'est pas adaptée à tous-tes les patients-es.

En résumé, malgré les énormes progrès qui ont été faits dans les traitements des tumeurs du sein au cours des dernières décennies, la résistance aux thérapies représente encore un enjeu

qui impacte les taux de rémission de cette maladie, en particulier pour les CSTN, et justifie la recherche pour identifier d'autres cibles thérapeutiques efficaces.

1.2) Métabolisme des cellules de cancer du sein

1.2.1) Un préambule au métabolisme cellulaire

Selon l'Institut national du cancer, le métabolisme cellulaire est la somme de tous les changements chimiques qui se produisent dans une cellule par lesquels l'énergie et les composants de base sont fournis pour les processus essentiels, y compris la synthèse de nouvelles molécules ainsi que la décomposition et l'élimination des autres. La synthèse de nouvelles molécules se produit par des réactions anaboliques, qui consomment de l'énergie, alors que la dégradation des molécules se produit par des réactions cataboliques, qui libèrent de l'énergie (The Editors of Encyclopedia Britannica 2021). Ensemble, ces réactions s'équilibrent pour servir trois objectifs principaux aux cellules. Premièrement, elles fournissent l'énergie nécessaire aux processus cellulaires sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) à partir des nutriments. Deuxièmement, le métabolisme cellulaire produit de nombreuses macromolécules, telles que les acides aminés, les acides gras, les acides nucléiques et certains glucides, à partir des nutriments. Finalement, les réactions anaboliques et cataboliques sont utilisées pour l'élimination des déchets métaboliques. Par conséquent, le métabolisme est un phénomène clé dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Il répond aux besoins bioénergétiques de base des cellules et contrôle également la disponibilité des métabolites, à travers différentes voies métaboliques.

1.2.2) Altérations du métabolisme dans le cancer du sein

La reprogrammation métabolique est considérée comme une caractéristique clé de plusieurs cancers incluant le cancer du sein (El-Sahli and Wang 2020). Les voies métaboliques des cellules cancéreuses, incluant les cellules de cancer du sein, s'adaptent pour répondre à 3 principales demandes métaboliques particulières aux cellules de cancer. Le métabolisme cellulaire des cellules de cancer s'adapte pour : 1) Répondre à une demande énergétique plus importante; 2) Assurer la production de biomasse nécessaire pour satisfaire les besoins accrus en cause à une prolifération augmentée et 3) Répondre à l'augmentation des besoins en détoxification de déchets métaboliques en comparaison aux cellules normales (Pavlova, Zhu, and Thompson 2022). Certaines adaptations métaboliques peuvent servir à fournir des métabolites spécifiques comme substrat pour différentes voies métaboliques contribuant à la production d'énergie ou de biomasse.

Par exemple, il a été montré que la glutamine peut être redirigée vers différentes voies métaboliques comme le cycle de Krebs pour la formation d'intermédiaires impliqués dans la biomasse et la respiration oxydative, ou vers la formation de glutathion (qui sert d'antioxydant) ou d'acides nucléiques dans les cellules de cancer (Y.-P. Wang and Lei 2017). Un autre exemple est l'augmentation de l'expression protéique de l'enzyme glycolytique phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH) qui entraîne un changement dans l'utilisation du glucose et est liée à une augmentation des métastases dans les études cliniques sur le cancer du sein (Pollari et al. 2011). Ces modifications du métabolisme des cellules cancéreuses influencent le comportement des cellules non transformées dans le paysage tumoral en soutirant énormément de nutriments à ces cellules saines, provoquant leur mort cellulaire. Au fur et à mesure que la tumeur se développe, son apport en nutriment change selon la vascularisation, impactant ainsi le profil métabolique des cellules cancéreuses (Fukano, Park, and Deblais 2021).

Ainsi, de nombreuses voies métaboliques peuvent être altérées dans le cancer du sein, selon l'environnement cellulaire dans lequel le cancer du sein tient son origine et se développe. Par exemple, certains métabolites servent de substrat pour la génération d'énergie et de biomasse, mais aussi à la régulation de l'expression des gènes et des protéines. Ces mêmes métabolites peuvent également influencer le comportement des cellules non transformées à proximité de la tumeur. Au fur et à mesure qu'elles se développent et se métastasent, les tumeurs peuvent aussi affecter et être affectées par la distribution des nutriments dans le corps. (Pavlova, Zhu, and Thompson 2022). Parmi les voies métaboliques altérées dans le cancer du sein, on retrouve plusieurs voies liées au métabolisme du carbone central (**Figure 1.2**), qui inclut le métabolisme du glucose (la glycolyse), le cycle de Krebs, (cycle de l'acide tricarboxylique (TCA)), de la glutamine (glutaminolyse), et le métabolisme des acides gras (El-Sahli and Wang 2020). Ces reprogrammations seront discutées à la section 1.2.3.

Des voies métaboliques altérées conduisent également à des voies de signalisation altérées, car la disponibilité des métabolites nécessaires pour effectuer la cascade de signalisation peut également être dérégulée (Ward and Thompson 2012). Un exemple bien connu dans le cancer du sein est la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. Il s'agit d'une voie de signalisation majeure qui régule la disponibilité des nutriments, des hormones et des facteurs de croissance (Paplomata and O'Regan 2014). Il a été établi que la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR joue un rôle très

important dans la croissance et la prolifération des cellules tumorales du sein et peut modifier le métabolisme cellulaire et à la fois être modulée par l'abondance des métabolites (Ortega et al. 2020).

Il est également intéressant de noter que la reprogrammation métabolique ne se produit pas toujours à cause de mutations génétiques, mais souvent à cause de changements dans l'expression des gènes qui régulent le métabolisme cellulaire, dus à des modifications épigénétiques. Ce sujet sera abordé dans la section 1.3 de ce mémoire.

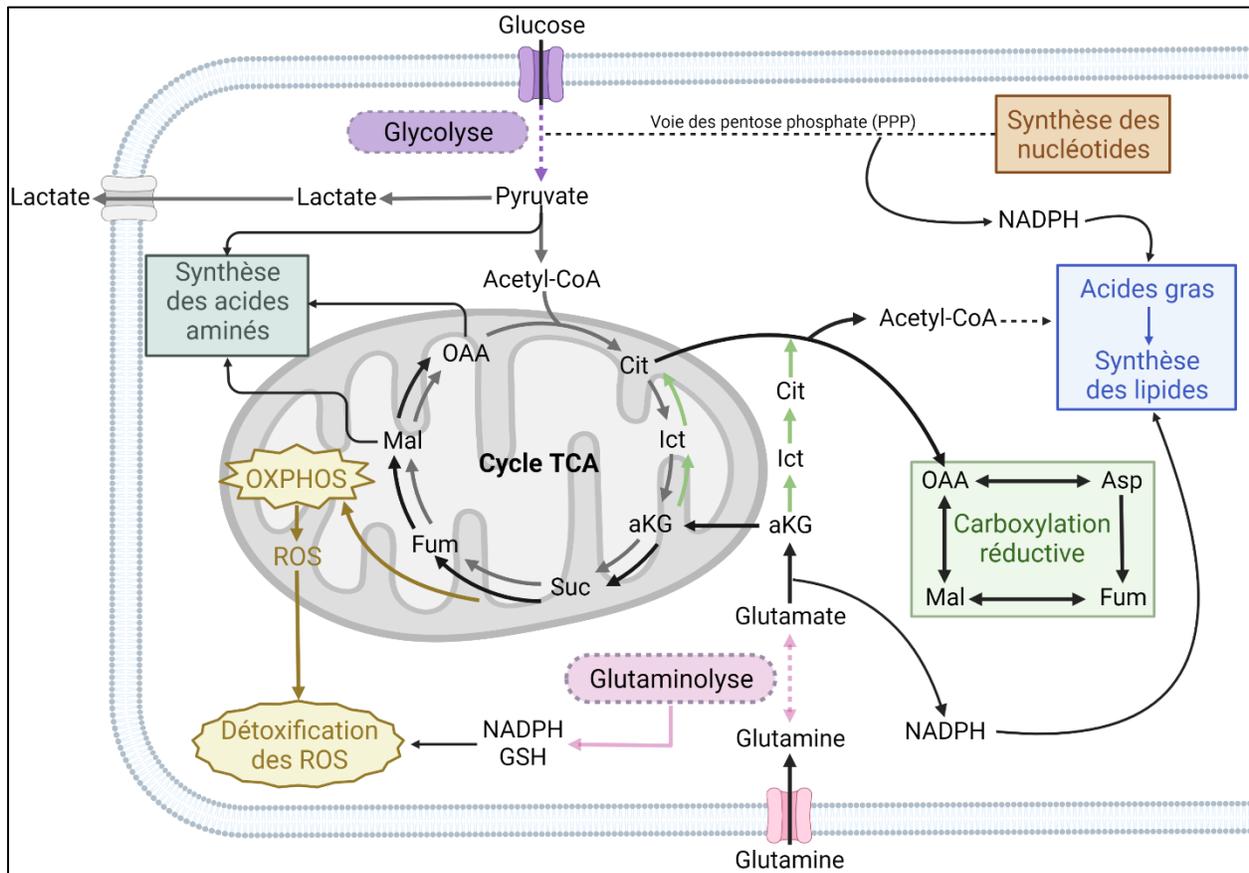


Figure 1.2 : Schéma des voies métaboliques souvent altérées dans le cancer du sein inspiré par (L. Wang, Zhang, and Wang 2020). Abréviations des métabolites: Cit, Citrate; Ict, Isocitrate; aKG, Alpha-cétoglutarate; Suc, Succinate; Fum, Fumarate; Mal, Malate; OAA, Oxaloacétate; Asp, Aspartate; ROS, Espèces réactives de l'oxygène; GSH, Glutathion. Abréviations de processus: OXPPOS, Phosphorylation oxydative; Cycle TCA, Cycle de l'acide tricarboxylique.

1.2.3) Principales voies métaboliques altérées dans les cancers du sein

Des études protéomiques, transcriptomiques et de métabolomique de tumeurs du sein ont détecté des changements dans plusieurs voies métaboliques dans les tumeurs comparativement aux cellules saines, incluant les voies associées au métabolisme central du carbone, incluant une

augmentation des niveaux d'enzymes et des protéines impliquées dans la glycolyse, le cycle TCA, la glutaminolyse, la biosynthèse des acides gras, la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et les voies des pentoses phosphates (PPP) (E. I. Chen et al. 2007; Richardson et al. 2008).

Glycolyse : La glycolyse est une voie métabolique centrale qui se ramifie vers d'autres voies par ses métabolites intermédiaires. L'ensemble de la cascade de réactions entraînant l'oxydation du glucose en pyruvate consomme 2 molécules d'ATP mais en produit 4 molécules, 2 nicotinamides adénine dinucléotide (NAD) + hydrogène (H) ($\text{NAD} + \text{H} = \text{NADH}$) et 2 pyruvates par molécule de glucose. La glycolyse fournit de l'énergie en milieu anaérobie et aérobie. Dans des conditions aérobiques, le pyruvate entre dans le cycle TCA et subit une phosphorylation oxydative (OXPHOS) conduisant à la production nette de 32 molécules d'ATP (Naifeh, Dimri, and Varacallo 2022). Dans des conditions anaérobiques, le pyruvate se transforme en lactate qui est sécrété hors de la cellule. La respiration cellulaire anaérobie entraîne la production nette de 2 molécules d'ATP (Granchi et al. 2010). En 1926, Otto Warburg et ses collègues ont décrit que la consommation de glucose était augmentée dans les tumeurs, les cellules tumorales absorbant d'énormes quantités de glucose par rapport à ce qui était observé dans les tissus environnants (Warburg, Wind, and Negelein 1927). Ce phénomène a été observé à plusieurs reprises dans divers cancers et est connu sous le nom *d'effet Warburg*. Le cancer du sein ne fait pas exception car les cellules tumorales génèrent des quantités importantes d'énergie grâce à un métabolisme glycolytique élevé. Les tumeurs de sous-type CSTN sont particulièrement reconnues pour être significativement plus glycolytiques (elles ont des taux plus élevés de glycolyse) par rapport aux autres sous-types (Z. Wu et al. 2020).

Les altérations provoquant cette augmentation de l'activité glycolytique dans le cancer du sein ne sont pas bien définies, mais les preuves pointent diverses enzymes altérées qui pourraient être responsables de ces changements métaboliques, telles que l'hexokinase (HK), la pyruvate kinase (PK), la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK) (Z. Wu et al. 2020), ainsi que l'augmentation des niveaux des transporteurs de glucose (GLUT). Le transporteur de glucose 1 (GLUT-1), qui est le principal transporteur de glucose des cellules cancéreuses est significativement plus élevé dans les CSTN que dans les autres sous-types (Brown and Wahl 1993; Grover-McKay et al. 1998). L'activité accrue de la glycolyse dans le CSTN, contribue à la prolifération et la migration des cellules malignes (Dias et al. 2019). Les cellules du CSTN sont

très sensibles aux inhibiteurs de la glycolyse en raison de leur forte expression du transporteur de glucose (GLUT-1) (Pelicano et al. 2014). Ainsi, la glycolyse représente une cible métabolique intéressante pour les CSTN d'autant plus que de nombreux médicaments sont déjà approuvés pour l'inhiber, incluant la molécule BAY-876, un inhibiteur du GLUT-1, qui est utilisé dans ce mémoire (Siebeneicher et al. 2016).

Cycle TCA Les réactions biochimiques du cycle TCA sont un pivot essentiel pour fournir de l'énergie sous forme d'ATP à travers l'OXPPOS - phénomène bioénergétique visant la formation d'ATP par transport de protons, se produisant à travers la membrane interne mitochondriale - des macromolécules et un équilibre des espèces réactives d'oxygène aux cellules en glycolyse aérobie (Gillies and Gatenby 2007). Ces réactions, également appelées cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique (CAC), se produisent dans la matrice mitochondriale (Anderson et al. 2018).

Il est largement admis que les altérations génétiques et épigénétiques des enzymes du cycle TCA favorisent le passage des cellules cancéreuses de la phosphorylation oxydative, également connue sous le nom d'OXPPOS lié à la glycolyse aérobie, vers la glycolyse anaérobie. (J.-Q. Chen and Russo 2012). Des études ont également démontré que les cellules tumorales peuvent découpler la glycolyse du cycle TCA (Sajani et al. 2017); permettant l'utilisation de sources supplémentaires et alternatives de carburant telles que la glutamine, pour répondre à leurs besoins métaboliques accrus, soulignant simultanément l'importance du cycle TCA dans le métabolisme du cancer.

Les multiples aberrations possibles du cycle TCA ont été liées à de nombreux processus pathologiques tels que l'obésité (Cummins et al. 2014), la maladie d'Alzheimer (Gibson et al. 2010) et, évidemment, le cancer (Hanahan and Weinberg 2011). Dans le cancer du sein, des aberrations de diverses enzymes du cycle TCA ont été notées. Par exemple, une enzyme limitant la vitesse de biosynthèse de la sérine, la 3-phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH), est fréquemment amplifiée de manière focale dans le cancer du sein (Locasale et al. 2011). Des niveaux élevés de 2-hydroxyglutarate (2-HG) ont également été détectés dans le cancer du sein triple négatif (Terunuma et al. 2014). Aussi, l' α KG déshydrogénase (OGDH), une enzyme qui régule la conversion de l' α KG est régulée à la baisse dans le cancer du sein en raison de l'hyper-méthylation de son promoteur, causant ainsi une diminution de l'activité du cycle TCA (Ostrow et al. 2009).

De nombreuses études ont identifié des points d'interruption dans le cycle TCA dans les cancers du sein, menant à l'utilisation de certains intermédiaires dans des voies métaboliques alternatives (réactions cataplérotiques) alors que d'autres métabolites peuvent compléter le cycle dans une réaction en aval ou en amont (réactions anaplérotiques). Cette flexibilité dans le métabolisme du cycle TCA permet d'assurer une grande capacité d'adaptation métabolique pour les cellules de cancer en réponse au stress micro-environnemental des tumeurs du sein.

Glutaminolyse La glutamine, un acide aminé non essentiel, est l'acide aminé le plus abondant circulant dans le sang (Scriver and Rosenberg 1973). La glutamine est désormais reconnue comme une source de nutriments importante pour de nombreux types de cancer, en particulier pour les cancers qui ont une activité accrue de l'oncogène MYC, ce qui est le cas de nombreux cancers du sein, incluant les CSTN (DeBerardinis and Cheng 2010). La glutamine est un nutriment provenant de la diète mais qui peut être métabolisé *de novo* dans les cellules. Elle est essentielle à la prolifération des cellules cancéreuses. Il a été démontré que la glutamine aide à réguler l'expression de nombreux gènes métaboliques impliqués dans la transduction de signaux, l'immunité et la défense cellulaire ainsi que dans l'activation des voies de signalisation intracellulaires (Cassago et al. 2012).

La glutaminolyse consiste en une série de réactions cataboliques par lesquelles la glutamine est dégradée en glutamate, aspartate, dioxyde de carbone, pyruvate, lactate, alanine et citrate. La dégradation de la glutamine permet de supporter la prolifération cellulaire et les besoins énergétiques élevés des cellules du cancer du sein en contribuant à la respiration cellulaire par l'anaplérose de l' α KG (provenant de la dégradation de la glutamine) dans le cycle TCA. Cette réaction favorise une capacité antioxydante adéquate aux besoins des cellules cancéreuses (Owen, Kalhan, and Hanson 2002). Les cellules de cancer du sein, comme plusieurs autres types de cancers, dépendent davantage de la glutamine exogène que les cellules normales. Dans les tumeurs *in vivo*, la dépendance à la glutamine est aussi observée, en particulier dans les tumeurs du sein résistantes aux thérapies (El-Sahli and Wang 2020) et lors des métastases. Cependant, en raison de l'abondance de ce métabolite *in vivo*, le phénomène est plus difficile à étudier. La dépendance à la glutamine dans les cellules de cancer du sein pourrait donc représenter une vulnérabilité métabolique potentiellement exploitable pour ce type de cancers.

La glutamine contribue aussi à la synthèse des purines et pyrimidines en conjonction avec la voie des pentose phosphate, ainsi qu'à la synthèse du glutathion, un antioxydant essentiel à la défense immunitaire des cellules, au métabolisme des nutriments et fonctions cellulaires (G. Wu et al. 2004). Le glutathion joue également un rôle crucial dans la neutralisation des ROS générés par la respiration cellulaire aérobie. Les niveaux de ROS jouent un rôle vital dans la prolifération, la croissance, l'apoptose et les métastases tumorales. Les concentrations de ROS augmentent lorsque le métabolisme de la glutamine est inhibé, ce qui pourrait être dévastateur pour les cellules cancéreuses (Le et al. 2012). Des études antérieures de la Dre Deblois ont démontré que l'augmentation du métabolisme de la glutamine menait à l'augmentation de la biosynthèse du glutathion dans les cancer du sein résistants aux thérapies anti-HER2 et de chimiothérapies (Q. Wu et al. 2020; Deblois et al. 2020).

Les recherches ciblant le métabolisme de la glutamine pourraient donc se révéler d'une grande importance pour le traitement du cancer du sein, incluant les CSTN. Le ciblage de la glutaminolyse par l'inhibition de la glutaminase (GLS), une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de la glutamine en glutamate, en est un bon exemple. Il a été démontré que l'utilisation d'inhibiteurs du GLS, tels que le CB-839 (présentement en études cliniques pour les CSTN), empêchait les cellules cancéreuses du sein de proliférer et réduisait leur capacité à envahir les cellules environnantes. (J.-B. Wang et al. 2010; Gross et al. 2014). Des inhibiteurs de la voie du glutathion (ex. Buthionine Sulfoximine; BSO) ou des purines-pyrimidines (alimentées par la glutamine) pourraient aussi être considérées pour les CSTN hautement dépendants au métabolisme de la glutamine.

Carboxylation réductrice La carboxylation réductrice dépendante de la glutamine est une réponse cellulaire courante au métabolisme mitochondrial altéré. La carboxylation réductrice dépendante de la glutamine permet à la glutamine de conserver son statut de nutriment favorisant la croissance même lorsque le métabolisme mitochondrial est altéré par des mutations somatiques (Mullen et al. 2011). Cette redirection du cycle TCA dans les cellules cancéreuses souligne la polyvalence du métabolisme de la glutamine et elle favorise la prolifération et la survie des cellules cancéreuses en conférant une protection contre le stress oxydatif (Du et al. 2016).

Auparavant, les niveaux élevés de lactate dans le cancer du sein étaient attribués à une conséquence de l'*effet Warburg*. On sait maintenant que le lactate peut également être utilisé comme source d'énergie par les cellules cancéreuses. Il a été démontré que des niveaux élevés de

lactate stimulaient la carboxylation réductrice dans les lignées cellulaires du tissu mammaire cancérigène, MCF7 et MDA-MB-231 (Brodsky, Odenwelder, and Harcum 2019). L'augmentation des cétones et du lactate dans le microenvironnement tumoral mammaire contribue à la récurrence, aux métastases et à de mauvais résultats cliniques (Martinez-Outschoorn et al. 2011).

Métabolisme des acides gras La synthèse des acides gras (*Fatty acids* (FA)) se produit dans le cytosol par l'entremise des enzymes de synthèses d'acides gras avec l'acétyl-CoA et la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Beld, Lee, and Burkart 2015). Les acides gras jouent de nombreux rôles dans la croissance et la survie de la cellule. Les phospholipides, un type de FA, sont la composante principale des membranes cellulaires. Les lipides neutres, un autre type de FA, servent d'unités de stockage d'énergie pour les cellules. Il existe également des dérivés de FA qui sont impliqués dans la signalisation cellulaire comme les eicosanoïdes, qui ont une large gamme de fonctions biologiques (de Carvalho and Caramujo 2018).

L'enzyme de synthèse d'acides gras est surexprimée dans les cancers du sein, son activité est donc une cible thérapeutique potentielle. L'ATP citrate lyase (ACLY) est la première enzyme limitant la vitesse de la synthèse *de novo* des acides gras. C'est une enzyme essentielle dans la reprogrammation métabolique de nombreux cancers, incluant les CSTN (D. Wang et al. 2017). L'ACLY est surexprimée dans le cancer du sein et contribue à sa prolifération, ses métastases et à la résistance thérapeutique acquise (Y. Chen et al. 2020). Les FA sont nécessaires à la survie des cellules cancéreuses (Fabian, Kimler, and Hursting 2015). La dérégulation du métabolisme des FA est une caractéristique de la transformation maligne de divers cancers, dont le cancer du sein (Röhrig and Schulze 2016). Bien que le potentiel de ciblage de cette voie métabolique pour la prévention et le traitement du cancer reste inexploité, des preuves indiquent que les protéines impliquées dans le métabolisme des FA jouent un rôle crucial dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du sein (Monaco 2017).

1.2.4) La plasticité du métabolisme du cancer et les modifications épigénétiques

La régulation métabolique est un phénomène plastique. Dans le cancer, les cellules ajustent leurs profils métaboliques en fonction du microenvironnement dans lequel elles se développent pour survivre et prospérer. Les adaptations métaboliques aident à contrer les carences en métabolites comme les faibles niveaux de glucose, de nutriments ou d'oxygène, mais elles aident également à développer une résistance thérapeutique aux médicaments et à promouvoir les

métastases (Zahan et al. 2020). Ces adaptations métaboliques peuvent être régulées par des changements génétiques survenant dans les cellules cancéreuses. Cependant de plus en plus d'évidences indiquent que des changements épigénétiques spécifiques peuvent soutenir les adaptations métaboliques dans les cellules cancéreuses (Peiris-Pagès et al. 2016), incluant les cancers du sein. La régulation épigénétique permet la plasticité de l'identité cellulaire, ce qui peut contribuer grandement à la capacité d'adaptation la flexibilité du métabolisme cellulaire.

Les régulations métaboliques et épigénétiques aident à définir l'identité cellulaire et jouent un rôle important dans la tumorigenèse. Des voies métaboliques altérées peuvent affecter la disponibilité de cofacteurs nécessaires à la régulation épigénétique et même générer des antagonistes des enzymes de modification épigénétique, impactant alors le paysage épigénétique. À l'inverse, les altérations épigénétiques peuvent affecter directement l'expression des enzymes métaboliques. Le dysfonctionnement épigénétique peut également perturber les cascades de transduction du signal impliquées dans le contrôle du métabolisme cellulaire (C. C. Wong, Qian, and Yu 2017). Une meilleure compréhension de la diaphonie entre le métabolisme et la régulation épigénétique dans le cancer pourrait offrir des opportunités thérapeutiques potentielles pour les patients-es du cancer du sein qui ne répondent plus aux thérapies standards (Z. Wu et al. 2020).

1.3) L'épigénétique dans les cancers

1.3.1) Les fondements de l'épigénétique

Les changements épigénétiques sont très courants et utiles pour la différenciation et l'identité des cellules. Chaque cellule de notre corps renferme le même code génétique mais exprime des gènes et des fonctions spécialisées très différentes. Comment est-ce possible? Une grande part de la réponse à cette question réside dans les fondements de ce qu'est l'épigénétique. L'épigénétique consiste, entre autres, en des modifications post-traductionnelles (MPT) sur les queues des histones et sur l'ADN, qui sont héréditaires au niveau de la réplication cellulaire. Ces modifications résultent en des changements d'accessibilité à l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle qui permettent le recrutement différentiel des facteurs de transcription (Marqués et al. 2022). Les facteurs de transcription sont des composants cellulaires clés qui contrôlent l'expression des gènes à travers le recrutement de facteurs de modification de la chromatine (Vaquerizas et al. 2009).

Les nucléosomes sont l'unité de base de l'emballage de l'ADN. Les histones, principales protéines formant les nucléosomes, permettent la liaison de l'ADN à ces derniers. Les modifications épigénétiques sont un sujet de recherche actif dans plusieurs cancers car elles sont potentiellement réversibles (plastiques), ce qui en fait d'excellentes cibles thérapeutiques (De Carvalho et al. 2012).

1.3.2) Altérations épigénétiques versus génétiques

Bien que l'initiation et la progression tumorale soient principalement initiées par des altérations génétiques intrinsèques ou acquises, des données récentes suggèrent également que les changements micro-environnementaux et épigénétiques contribuent aussi à l'initiation mais surtout à la progression de divers types de tumeurs, incluant les tumeurs du sein et les CSTN (Polyak 2007). Parmi les phénomènes épigénétiques les plus communs, on retrouve la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et le remodelage des nucléosomes (Lo and Sukumar 2008). Ces altérations épigénétiques affectent les niveaux de compactage du brin d'ADN connu sous le nom de chromatine.

Par ailleurs, les altérations génétiques, (incluant les mutations, amplifications, délétions, etc.) consistent en des modifications irréversibles, directement apportées à la séquence d'ADN, en changeant le code. Un exemple de mutation est une permutation de nucléotides, comme l'adénine (A) pour une cytosine (C). Une mutation peut également être une délétion complète d'un nucléotide qui modifie l'ensemble du cadre de lecture de la machinerie cellulaire et altère l'expression protéique résultante. Les mutations sont la principale cause de diversité chez les êtres vivants (Loewe and Hill 2010). Contrairement aux phénomènes épigénétiques, ces altérations à la séquence d'ADN ne sont pas réversibles et bien qu'elles contribuent grandement à l'initiation des tumeurs, elles ne permettent pas la plasticité que permettent les modifications épigénétiques.

1.3.3) Les enzymes épigénétiques

Les enzymes épigénétiques impliquées dans l'initiation et la progression du cancer sont des complexes qui agissent souvent de manière opposée, rendant possible l'attribut réversible de l'épigénétique et contribuant grandement à la plasticité des cellules de cancer (Ilango et al. 2020). Il est donc maintenant entendu que le cancer est aussi une maladie épigénétique (Garcia-Martinez et al. 2021). Les changements épigénétiques sont possibles grâce aux fonctions d'écriture, d'effaçage et de lecture d'histones et de l'ADN (Gillette and Hill 2015). Les « écrivains » sont des

enzymes qui ajoutent des MPT aux histones et à l'ADN. Des exemples d'écrivains d'histones sont les méthyltransférases de l'ADN (DNMT), les méthyltransférases des queues d'histones (HMT) et les acétyltransférases des queues d'histones (HAT) (Hyun et al. 2017). Les « effaceurs » sont l'opposé des écrivains; ils suppriment les MPT apportés sur les histones par les écrivains. Des exemples d'effaceurs sont les désacétylases des queues d'histones (HDAC) et les déméthylases des queues d'histones (HDM) (Hyun et al. 2017). Et enfin, les « lecteurs » sont des protéines ou des enzymes qui interviennent là où la configuration de la chromatine le leur permet. Ils ont la capacité de lire les MPT et d'initier le recrutement d'autres complexes transcriptionnels aux sites spécifiques de la chromatine qu'ils reconnaissent. Les protéines de reconnaissance à bromodomaines et celles à chromodomaines sont des lecteurs de MPT. Les protéines à bromodomaines reconnaissent des marques d'acétylation de lysines sur les queues d'histones. Alors que les protéines à chromodomaines reconnaissent des marques de méthylation de lysines sur les histones.(Musselman et al. 2012). Par exemple les protéines à bromodomaines reconnaissent et se lient à différentes lysines acétylées des histones (Musselman et al. 2012).

1.3.4) Comment l'épigénétique régule l'identité cellulaire

Contrairement aux changements génétiques, les changements épigénétiques sont réversibles et ne modifient pas la séquence d'ADN mais plutôt la façon dont la cellule peut « lire » la séquence (Waddington 2012). Les paysages épigénétiques sont héréditaires et malléables. Le type et la localisation des MPT apportées à la chromatine déterminent différents domaines d'activation ou de répression de cette dernière (Gibney and Nolan 2010). Certaines marques confèrent une conformation accessible de la chromatine, qui permet la liaison des facteurs de transcription et du complexe polymérase, conduisant à la transcription des gènes ciblés. D'autres modifications provoquent une conformation compacte de la chromatine, aussi appelée hétérochromatine. Ces domaines confèrent une répression transcriptionnelle des gènes inclus dans ces régions du génome.

L'épigénétique et le métabolisme sont deux domaines grandement liés dans les cellules cancéreuses car ils contribuent, en symbiose, à la régulation de l'identité cellulaire. En effet, l'accès à la chromatine déterminée par les reprogrammations épigénétiques permet de contrôler quels gènes seront exprimés, incluant les gènes du métabolisme cellulaire. La plasticité épigénétique permet une plus grande capacité d'adaptation dans les cellules de cancer, se prêtant très bien à la

régulation des adaptations métaboliques. Par ailleurs, les enzymes épigénétiques performant leur activité catalytique en utilisant des métabolites, soit comme substrats aux MPT ou comme cofacteur/cosubstrat pour réguler l'activité du complexe épigénétique. La disponibilité de certains métabolites contribuera donc à déterminer les profils épigénétiques des cellules (Almouzni and Cedar 2016). Considérant l'abondance d'adaptations métaboliques dans les cellules cancéreuses, il ne fait aucun doute que le métabolisme des cellules cancéreuses contribue aussi à la flexibilité de l'identité cellulaire des cellules cancéreuses.

1.3.5) Altérations épigénétique dans le cancer

Les processus épigénétiques aberrants sont de nature réversible (**Figure 1.3**) et suscitent un grand intérêt en tant que thérapie anticancéreuse (Ilango et al. 2020).

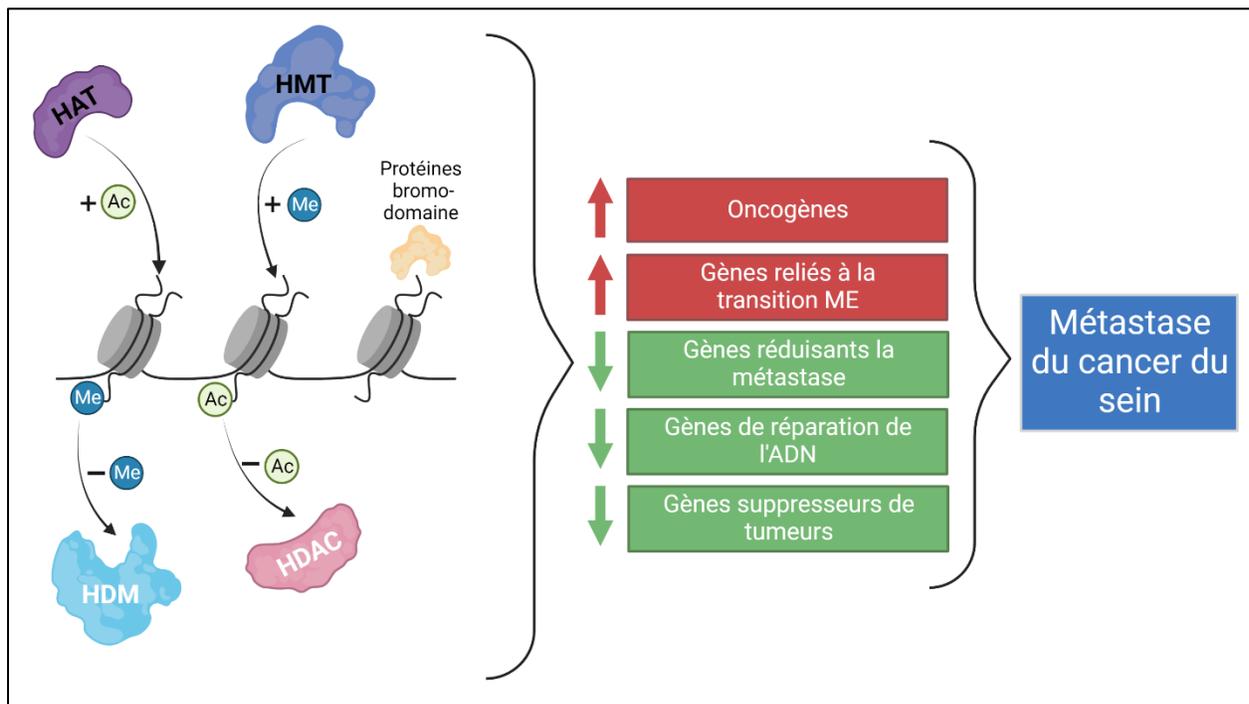


Figure 1.3 : Modification post-traductionnelles des queues d'histones dans le cancer du sein inspirée par (Zhuang et al. 2020). Les histones acétyltransférases (**HAT**) ajoutent spécifiquement des groupes acétyle (**Ac**) aux queues d'histone. Les méthyltransférases d'histone (**HMT**), elles, ajoutent spécifiquement des groupes méthyle (**Me**) aux histones. Les histones désacétylases (**HDAC**) retirent spécifiquement les groupes acétyles des queues d'histone. Les histones déméthylases (**HDM**) retirent quant à elles les groupes méthyl des histones. Les protéines du bromo-domaine jouent un rôle dans l'acétylation des histones, le remodelage de la chromatine et le recrutement d'autres facteurs nécessaires à la transcription (Josling et al. 2012). Ces modifications d'histone ont une signification fonctionnelle en tant que moteurs épigénétiques car elles régulent la transcription d'oncogènes, de gènes liés à la transition mésenchymateuse-

épithéliale (**TME**), des gènes de réparation de l'ADN et des gènes suppresseurs de tumeurs, contribuant aux métastases du cancer du sein.

Méthylation de l'ADN : La méthylation de l'ADN permet la répression transcriptionnelle et est un phénomène important dans le développement cellulaire normal (De Carvalho et al. 2012). En effet, la répression transcriptionnelle joue un rôle crucial dans l'inactivation du chromosome X, le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire et le maintien de la pluripotence, pour ne citer que quelques exemples (De Carvalho, You, and Jones 2010). Des modifications la méthylation de l'ADN se produisent à plusieurs stades du développement tumoral (Okano et al. 1999). Il a été démontré que l'hypo-méthylation de l'ADN dans le reste du génome et l'hyper-méthylation dans les îlots CpG (Egger et al. 2004) provoquent la répression anormale de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs dans la plupart des types de cancer et permet l'expression d'oncogènes et d'éléments transposables qui contribuent à la progression tumorale (Jones and Baylin 2002). Ces états épigénétiques altérés, incluant la régulation épigénétique des éléments transposables peuvent également contribuer aux résistances aux médicaments dans le cancer du sein tel que montré précédemment par la Dre Deblois (Deblois et al. 2020). Les altérations des méthyltransférases de l'ADN (DNMT) et des déméthylases de l'ADN ont été observées dans plusieurs cancers (Chik and Szyf 2011). L'hyper-méthylation de l'ADN par la DNMT1 dérégulée est également impliquée dans la tumorigenèse du cancer du sein triple négatif (K. K. Wong 2021). Les méthyltransférases de l'ADN 3A et 3B (DNMT3A et DNMT3B) sont aussi responsables de la méthylation *de novo* de l'ADN au début du développement et dans les tumeurs (Yu et al. 2019). Ces nombreuses observations donnent un aperçu d'une possible inversion de la répression épigénétique résultant de la méthylation de l'ADN en tant que stratégie utile pour prévenir et traiter le cancer du sein (S. Sharma, Kelly, and Jones 2010).

Méthylation des histones : La méthylation des histones est un processus par lequel des groupes méthyles sont ajoutés aux acides aminés sur la queue des histones qui constituent le nucléosome (Hathaway et al. 2012). La méthylation des histones est impliquée dans de nombreux processus biologiques comme la réparation de l'ADN, la différenciation cellulaire, la transcription, la réponse au stress et le développement (Borun, Pearson, and Paik 1972; Schulze et al. 2009; Mohan et al. 2010). De nombreuses études ont permis de déterminer que l'altération de la régulation de la méthylation des histones peut contribuer au développement et à la progression du cancer (Albert and Helin 2010), incluant les cancers du sein et les CSTN, qui comportent de

nombreux schémas d'expression anormaux des marques de méthylation des histones (Elsheikh et al. 2009).

Au niveau de la chromatine, la méthylation des histones peut soit provoquer la compaction des histones et des nucléosomes résultant en une répression transcriptionnelle réversible dans ces régions précises du génome (Strahl and Allis 2000) alors que d'autres MPT spécifiques sur les queues d'histones peuvent entraîner une instabilité du complexe d'histone et ainsi augmenter l'accessibilité à l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle. Par exemple, la triméthylation du résidu lysine 4 sur l'histone 3 (H3K4me3) est une marque de méthylation d'histone qui a été associée à des promoteurs actifs de gènes transcrits et exprimés (Schneider et al. 2004). Il a été observé que des niveaux élevés d'expression de H3K4me3 dans le cancer du sein sont souvent liés à un taux de survie à 10 ans plus faible (Berger et al. 2020). À l'inverse de H3K4me3, la triméthylation du résidu lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me3) a été liée à des promoteurs de gènes non transcrits et des régions intergéniques réprimées et en hétérochromatine (Kouzarides 2007). Une réduction globale des niveaux de H3K9me3 a été observée dans le cancer du sein, suggérant une contribution épigénétique à l'adaptation et la croissance du cancer du sein (Li et al. 2017). La triméthylation du résidu lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) (Elsheikh et al. 2009) est aussi associée à la répression transcriptionnelle de régions génomiques. L'expression élevée de cette marque est une caractéristique du cancer du sein (Healey et al. 2014). La Dre DeBlois a démontré antérieurement qu'une reprogrammation de cette marque épigénétique a lieu dans les CSTN résistants aux chimiothérapies, pour compenser la perte de méthylation d'ADN et représente une vulnérabilité épigénétique des CSTN résistants au paclitaxel (DeBlois et al. 2020). Depuis, d'autres études ont suggéré un rôle important pour cette marque épigénétique dans la progression et la réponse thérapeutique des CSTN (Marsolier et al. 2022). Le rôle de cette marque épigénétique dans les CSTN est le point central de ce mémoire.

Le groupe des protéines arginine méthyltransférases (PRMT) modulent la méthylation des arginines sur les histones, une modification qui a aussi été impliquée dans la progression des cancers du sein. Une surexpression du coactivateur de PRMT1, *Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1* (CARM1) a été notée dans les cancers du sein et de la prostate (El Messaoudi et al. 2006). Des altérations de l'expression des déméthylases ont également été mises en évidence dans divers cancers. Par exemple, la surexpression de la *Lysine-Specific Demethylase 1* (LSD1)

contribue à la cancérogenèse humaine par modification de la chromatine dans divers cancers, incluant les cancers du sein (Hayami et al. 2011).

Acétylation d'histones : Cette modification a lieu lorsqu'un groupe acétyle est ajouté aux résidus de lysine sur les histones. L'acétylation des histones est régulée par les acétyltransférases d'histones (HAT) et les désacétylases d'histones (HDAC) (Walmsley and Stuklis 1989). En raison de la charge négative des groupes acétyle, cette modification est connue pour engendrer l'instabilité du complexe d'histones et conférer une configuration de chromatine plus lâche, permettant l'accessibilité de l'ADN et la transcription des gènes (Brownell and Allis 1996). Des schémas anormaux d'acétylation des histones ont été observés dans divers cancers (Verdone, Caserta, and Di Mauro 2005). La réduction globale de la lysine 16 mono-acétylée de l'histone 4 (H4K16ac) a été identifiée comme un événement primaire dans le cancer du sein (Falahi et al. 2014). Il a également été constaté que les niveaux d'acétylation de la lysine 12 de l'histone 4 (H4K12ac) sont diminués dans le carcinome canalaire *in situ* et le carcinome canalaire invasif par rapport au tissu mammaire normal (Suzuki et al. 2009). De plus, l'enrichissement de l'acétylation du résidu lysine 4 de l'histone 3 (H3K4ac) a été corrélée avec des voies métaboliques associées au cancer telles que la réponse endocrinienne, la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM), l'adhésion cellulaire, la signalisation médiée par la surface cellulaire, la prolifération cellulaire, la différenciation et la croissance cellulaire normale (Messier et al. 2016). Il a également été démontré que H3K4ac était fortement lié à l'expression de *Tip60*, codant pour l'histone acétyltransférase *Tip60* dans le cancer du sein (Idrissou et al. 2020). L'expression de *Tip60* dans différents sous-types de cancer du sein suggère qu'elle pourrait contribuer aux changements observés dans les niveaux d'acétylation des histones. Une analyse de régression multivariée de Cox a permis de déterminer que l'hypo-acétylation globale de la marque H3K18 est démonstrative de la transformation cellulaire et est indépendante d'autres facteurs pronostiques clés du cancer du sein tels que le grade histologique, le stade des ganglions lymphatiques et la taille de la tumeur (Elsheikh et al. 2009).

En résumé, de nombreuses modifications épigénétiques impliquant des MPT sur les queues d'histones et l'ADN ont été identifiées dans de multiples tumeurs, incluant celles du cancer du sein. De plus, la machinerie et les enzymes épigénétiques représentent l'une des classes de protéines et enzymes la plus fortement associée à des altérations génétiques dans différents cancers

incluant les cancers du sein. Il ne fait donc aucun doute que les phénomènes épigénétiques revêtent une importance primordiale dans l'étude des tumeurs, incluant les tumeurs mammaires.

1.3.6) Cibler des enzymes épigénétiques dans les cancers

Inhibition de la méthylation de l'ADN : Bien que peu utilisés dans le cancer du sein, les inhibiteurs de méthyltransférases de l'ADN (DNMTi) qui sont approuvés cliniquement pour plusieurs types de cancers, constituent des agents intéressants pour le traitement du cancer. Par exemple, la déciatine et l'azacytidine sont des agents approuvés pour le syndrome myélodysplasique et la leucémie myéloïde aiguë (Santini and Ossenkoppele 2019). Leurs applications potentielles dans différents types de tumeurs ont suscité un grand intérêt au cours des dernières années en lien avec la régulation des éléments transposables et de la réponse immunitaire.

Inhibition de l'acétylation des histones Comme l'acétylation est difficile à inhiber, l'inhibition de l'acétylation des histones est souvent réalisée par l'inhibition des lecteurs de bromodomains. Il existe actuellement de nombreux inhibiteurs de bromodomaine en cours d'essais cliniques pour un traitement alternatif du cancer. *JQ1*, une molécule à base de thiénotriazolodiazépine, a été introduite par le laboratoire *Bradner* en 2009 et représente un exemple d'inhibiteurs de bromodomains très prometteur dans différents types de cancers, incluant les cancers du sein (Filippakopoulos et al. 2010).

Inhibition de la méthylation des histones La recherche sur l'inhibition de la méthylation des histones en tant que thérapie anticancéreuse a permis la découverte d'agents thérapeutiques potentiels. Par exemple, EPZ004777, un inhibiteur du *perturbateur de la méthyltransférase du silencing-1-like télomérique* (DOT1L), a démontré des résultats prometteurs en bloquant la prolifération des cellules cancéreuses du sein résistantes aux anti-œstrogènes. DOT1L est recruté avec ER α à la chromatine des cellules cancéreuses du sein et son inhibition interfère avec la transcription médiée par ER α . Ce traitement arrête la croissance cellulaire et provoque la mort cellulaire pour le cancer du sein hormono-sensible (Nassa et al. 2019).

Un autre exemple d'inhibition de la méthylation des histones est l'inhibition de la méthyltransférase *Enhancer of Zeste Homologue 2* (EZH2), la sous-unité catalytique du complexe répressif *Polycomb 2* (PRC2). Différents inhibiteurs de cette enzyme écrivaine comprennent le EPZ-6438 (Tazémétostat©), un inhibiteur sélectif de l'activité catalytique d'EZH2 qui a été

approuvé par la Food and Drug Association (FDA) en 2020 en tant que premier inhibiteur ciblant une méthyltransférase d'histones, pour le lymphome folliculaire récidivant ou réfractaire dans des conditions spécifiques (Morschhauser et al. 2020). Une autre molécule qui agit comme un inhibiteur de EZH2 est l'UNC1999, un double inhibiteur de EZH2/EZH1 biodisponible qui entre en compétition avec le cofacteur SAM (Konze et al. 2013). Il existe également GSK126 (McCabe et al. 2012) et EPZ005687 (Knutson et al. 2012) deux inhibiteurs sélectifs d'EZH2, et GSK343, un double inhibiteur EZH2/EZH1 (Verma et al. 2012).

1.3.7) EZH2 dans le cancer du sein

Tel que mentionné plus haut, EZH2 peut modifier l'accessibilité à la chromatine et l'expression des gènes en régulant la triméthylation de la lysine 27 sur l'histone 3 (H3K27me3) grâce à son activité catalytique au sein du complexe PRC2 (**Figure 1.4**) (Simon and Lange 2008). EZH2 joue des rôles dans plusieurs processus cellulaires importants, tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose et la sénescence (Nutt et al. 2020; Y.-H. Chen, Hung, and Li 2012). Son rôle dans la physiopathologie du cancer a également été mis en évidence dans plusieurs types de cancers, il semble donc logique de cibler EZH2 comme thérapie anticancéreuse. La dérégulation de l'expression d'EZH2 et les paysages de triméthylation de H3K27 sont impliqués dans de nombreux cancers (Yao et al. 2016). Dans le cancer du sein, l'expression d'EZH2 est significativement associée à la prolifération des cellules tumorales et à un mauvais pronostic (Collett et al. 2006).

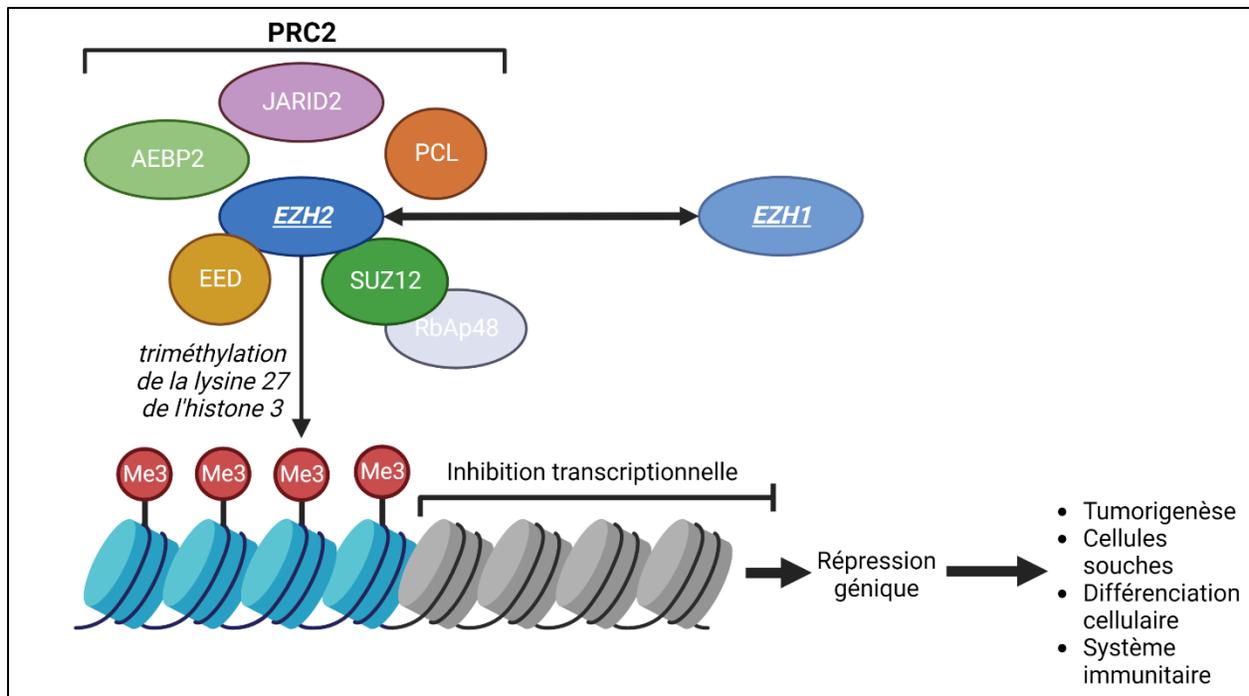


Figure 1.4 : Fonction dite "canonique" d'EZH2 au sein du PRC2. EZH2 vient se lier aux autres sous-unités du PRC2. Par la suite, EZH2 va catalyser la triméthylation de la lysine 27 sur l'histone 3. Cette marque de méthylation condense la chromatine, prévenant alors l'accès de la machinerie transcriptionnelle à cette séquence d'ADN et conséquemment, inhibe la transcription. Cela cause une répression des gènes présents dans cette région de la chromatine. Ce phénomène est impliqué dans plusieurs procédés cellulaires tels que la tumorigenèse, la totipotence/pluripotence des cellules souches, la différenciation cellulaire ainsi que dans le système immunitaire. EZH1 est interchangeable avec EZH2 au sein du PRC2, mais sa fonction n'est pas la même.

1.3.7.1) Mécanisme d'action

EZH2 agit comme une méthyltransférase d'histone et d'autres protéines nucléaires et cytosoliques, principalement à travers son domaine SET C-terminale (Joshi et al. 2008). EZH2 possède une activité canonique liée à son rôle de méthyltransférase au sein du complexe PRC2 (**Figure 1.4**), mais possède aussi un rôle indépendant de PRC2 (activité non-canonique) à travers lequel EZH2 peut agir en tant que coactivateur transcriptionnel et médier des fonctions de signalisation. Le rôle de EZH2 associé au complexe PRC2 inclut la méthylation de H3K27 ainsi que la méthylation d'autres protéines qui ne sont pas des histones. En tant que sous-unité du PRC2, la triméthylation médiée par EZH2 sur H3K27 favorise la répression transcriptionnelle des gènes cibles (Cao and Zhang 2004). Un exemple de méthylation de protéines autre que des histones par EZH2 au sein du PRC2 est la méthylation du facteur de transcription cardiaque GATA4, un membre de la famille GATA des facteurs de transcription à doigts de zinc. La méthylation médiée

par EZH2 réprime l'activité de GATA4 (A. He et al. 2012). Le rôle non-canonique d'EZH2 a été observé pour la première fois dans le cancer de la prostate résistant à la castration (CPRC) que l'AKT phosphoryle EZH2 au niveau de son résidu sérine 21. Cet EZH2 phosphorylé active ensuite les récepteurs androgènes (RA), qui sont des facteurs de transcription. L'activation des RA soutient alors la croissance du CPRC par l'activation de ses gènes en aval (Xu et al. 2012). Le EZH2 phosphorylé peut également méthyler le transducteur de signal et l'activateur du gène de transcription 3 (STAT3) pour activer la signalisation STAT3 dans les cellules souches de glioblastome (Kim et al. 2013).

1.3.7.2) L'expression d'EZH2 dans les cancers du sein et son potentiel en tant que cible thérapeutique

EZH2 a de nombreuses fonctions dans le développement cellulaire normal. Cependant, il est lié à l'initiation, à la progression et à la métastase du cancer lorsqu'il est muté ou que son expression est altérée (Duan, Du, and Guo 2020). La surexpression d'EZH2 et son association avec de mauvais résultats cliniques ont été reconnues pour la première fois dans le cancer de la prostate (Varambally et al. 2002). Par la suite, il a également été observé dans le carcinome de l'endomètre (Krill et al. 2020), le cancer gastrique (Gan et al. 2018), le cancer de l'œsophage (Qiu et al. 2020) et le cancer du sein (Fumagalli et al. 2020; Kleer et al. 2003).

Dans le cancer du sein en particulier, l'expression d'EZH2 est un marqueur d'agressivité. Cette surexpression favorise la transformation néoplasique des cellules épithéliales mammaires et favorise la croissance indépendante de l'ancrage et de l'activité HDAC dans les cellules épithéliales mammaires normales, contribuant au potentiel invasif du cancer du sein (Kleer et al. 2003). En 2012, *Holm et al.* ont caractérisé l'expression des marques EZH2 et H3K27me3 en utilisant l'immunohistochimie et l'immunobuvardage dans les sous-types moléculaires et cliniques du cancer du sein, identifiant une expression significativement différente d'EZH2 et de H3K27me3 dans chacun des sous-types de cancer du sein. La surexpression d'EZH2 a été notée dans les CSTN, montrant une corrélation inverse avec les niveaux de H3K27me3, suggérant un rôle important de la fonction non-canonique d'EZH2 dans les CSTN (Holm et al. 2012). Le modèle d'expression EZH2 des CSTN était associé à une faible survie sans propagation de la tumeur originale.

Tel que mentionné plus tôt, plusieurs inhibiteurs ont été développés pour EZH2, l'un d'eux étant même approuvé cliniquement. Les données courantes indiquent que le ciblage d'EZH2 dans

les cancers du sein, incluant les CSTN, pourrait être prometteur. En effet, bien que ces inhibiteurs aient, en général, peu d'effets sur la prolifération et la survie des cellules de cancer du sein (tout comme pour plusieurs autres types de cancers), les études préalables de la Dre Deblois ont démontré que certaines tumeurs et conditions du microenvironnement, incluant des modifications métaboliques, peuvent augmenter la sensibilité des cellules CSTN aux inhibiteurs d'EZH2, incluant dans les CSTN résistants aux thérapies (Marsolier et al. 2022; Deblois et al. 2020). Les conséquences de l'inhibition de l'activité catalytiques d'EZH2, qui est le cœur de l'étude de ce mémoire, ne sont pas encore toutes comprises.

Chapitre 2 : Rationnel, hypothèses et objectifs

2.1) Mise en contexte

Le laboratoire de la Dre Deblois s'intéresse à la compréhension des mécanismes de régulation réciproques des phénomènes épigénétiques et métaboliques dans les cancers du sein, en particulier dans les CSTN. Les études préalables de la Dre Deblois avaient identifié des reprogrammations épigénétiques importantes de la marque de triméthylation sur la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) qui est modulée par l'enzyme épigénétique EZH2 dans les CSTN résistants aux taxanes, un agent de chimiothérapie largement utilisé pour traiter les patients-es de CSTN. Par ailleurs, la caractérisation du métabolisme cellulaire de ces modèles de résistance au taxanes avait, en parallèle, aussi révélé d'importantes adaptations du métabolisme cellulaire incluant une augmentation de la dépendance à la glutamine et au glutathion. Les premières études menées dans le laboratoire Deblois avaient suggéré qu'une régulation réciproque pourrait donc exister entre l'activité d'EZH2 et les changements métaboliques observés dans les CSTN résistants à la chimiothérapie. À partir de ces observations préliminaires, l'hypothèse que les modifications épigénétiques résultant de l'activité d'EZH2 peuvent induire des reprogrammations du métabolisme cellulaire dans les CSTN a été émise.

Ainsi, l'étude présentée dans ce mémoire découle d'une étude où nous avons tenté d'élucider un rôle potentiel de l'enzyme EZH2 dans la régulation du métabolisme des cellules cancéreuses et de caractériser les mécanismes de cette régulation potentielle du métabolisme par EZH2.

2.2) Hypothèses et objectifs

Les données préliminaires récoltées nous ont permis d'émettre l'hypothèse que l'enzyme épigénétique *Enhancer Zeste of Homologue 2* (EZH2) joue un rôle dans la régulation du profilé métabolique des cellules de cancer du sein triple-négatif, permettant ainsi une grande capacité d'adaptation des cellules cancéreuses à leur environnement métabolique. Nous croyons de plus que l'inhibition de cette régulation révèle des vulnérabilités métaboliques qui pourraient éventuellement être exploitées pour sensibiliser les cancers du sein triple-négatifs aux inhibiteurs épigénétiques.

Nous avons fixé les 3 objectifs suivants pour tester cette hypothèse :

- 1) Caractériser les voies métaboliques altérées à la suite de l'inhibition de l'activité d'EZH2 afin de dresser un portrait de la reprogrammation métabolique résultant de cette inhibition dans les CSTN;
- 2) Identifier les mécanismes transcriptionnels et épigénétiques impliqués dans cette régulation;
- 3) Déterminer les vulnérabilités métaboliques et épigénétiques résultant de ces reprogrammations et pouvant être exploitées pour freiner la prolifération des CSTN.

2.3) Approches expérimentales

2.3.1) Premier objectif de recherche : Caractériser les voies métaboliques altérées à la suite de l'inhibition de l'activité d'EZH2

Les données préliminaires de ce projet démarré par la Dre Deblois avaient révélé la régulation transcriptionnelle de quelques gènes métaboliques de la voie de la glutaminolyse et du cycle TCA dans les cellules du CSTN. Cependant, afin d'étudier la reprogrammation du métabolisme cellulaire en réponse à l'inhibition d'EZH2 dans un contexte métabolique plus global, nous avons opté pour une approche initiale non-ciblée nous permettant d'explorer la reprogrammation métabolique dans un contexte global. Pour supporter cette approche et les choix du sous-type de cancer et des inhibiteurs (double ou spécifique), nous avons aussi pour but d'effectuer des analyses de corrélation d'expression de signatures transcriptionnelles et d'études de dépendance à l'aide de données publiques (TCGA et METABRIC) et d'outils d'analyse. Notre objectif expérimental consistait donc à exploiter à la fois des données transcriptomiques publiées et nos propres données de séquençage de l'ARN sur des cellules du CSTN traitées avec différents inhibiteurs d'EZH2 (inhibiteurs doubles (EZH2/EZH1 et inhibiteurs spécifiques à EZH2) ou par sa déplétion à l'aide d'ARN d'interférence. Avec cette approche, nous voulions identifier une signature de gènes métaboliques qui est réactivée ou inhibée en réponse à l'inhibition d'EZH2. Cette signature nous permettrait alors d'identifier des voies métaboliques étant potentiellement altérées dans les CSTN à la suite de l'inhibition d'EZH2.

Nous avons ensuite voulu supporter les signatures obtenues à l'aide de profilage des cellules en métabolomique. En effet, l'utilisation de la chromatographie en phase liquide suivi par la spectrométrie de masse permet d'obtenir un profilé quantitatif en temps réel des niveaux d'une

vaste gamme de métabolites (environ 350) en réponse à l'inhibition d'EZH2 dans les cellules du CSTN. Par la suite, puisque qu'il est difficile de conclure à partir des valeurs des niveaux globaux des métabolites si l'augmentation d'un métabolite résulte de son accumulation parce qu'il est moins utilisé ou d'une synthèse accrue parce qu'il est plus utilisé par la cellule, nous avons décidé de compléter ces données à l'aide de traçage métabolomique par isotopes stables utilisant des métabolites marqués au carbone-13. Cette approche permet de suivre l'incorporation du carbone marqué dans les différents métabolites en aval (créant des isotopomères stables) et de quantifier la proportion de carbones issus d'un métabolite utilisé dans les différentes voies métaboliques en aval. Ces profilages métabolomiques seront aussi complétés par des essais avec l'appareil *BioNova* qui permet la quantification de consommation métabolique. Cette approche consiste à quantifier les métabolites consommés ou relâchés dans les milieux de culture, par suite des différents traitements avec l'inhibiteur d'EZH2. Les résultats présentés dans ce mémoire nous ont permis d'identifier des reprogrammations métaboliques observées de façon très consistantes à la suite de l'inhibition d'EZH2 dans les cellules CSTN et de mieux comprendre les profils métaboliques résultant de cette inhibition. Les expériences futures pour terminer cet objectif incluront un traçage de glucose marqué ($^{13}\text{C}_6$ -glucose) et de glutamine marquée sur l'azote ($^{15}\text{N}_2$ -glutamine) ainsi que des expériences de profilage bioénergétiques avec le *Seahorse BioAnalyzer* afin d'étudier un changement de dépendance bioénergétique.

2.3.2) Deuxième objectif de recherche : Identifier les mécanismes transcriptionnels et épigénétiques impliqués dans cette régulation

Dans un deuxième temps, nous voulions caractériser les mécanismes de régulation transcriptionnels impliquant EZH2 et la marque épigénétique H3K27me3 dans le contrôle du métabolisme cellulaire des cellules du CSTN. Pour ce faire, nous avons exploité des données d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq) de la marque H3K27me dans des cellules du CSTN (MDA-MB436) et dans deux xénogreffes dérivées de patient de CSTN, qui furent générées préalablement par la Dre Deblois (Deblois et al. 2020). Nous avons complété ces données avec des données publiques de ChIP-seq pour la marque H3K27me3 et pour EZH2 ("ReMap2022" n.d.). Notre approche expérimentale consistait à établir une liste de promoteurs de gènes régulant les métabolismes cellulaires identifiés à l'aide d'outils d'enrichissement fonctionnels (GSEA) et transcriptionnellement régulés en réponse à l'inhibition d'EZH2 et d'établir si ces promoteurs sont marqués par la modification répressive d'H3K27me3. Cette liste inclut donc des gènes

métaboliques qui sont potentiellement des cibles directes d'EZH2. L'analyse de l'enrichissement des sites de liaison de facteurs transcriptionnels dans les promoteurs de ces gènes nous indique donc les facteurs de transcriptions ayant potentiellement la capacité de médier la régulation métabolique à la suite de l'inhibition d'EZH2. Le rôle potentiel de l'un d'eux dans la réponse métabolique de l'inhibition d'EZH2 a été testé à l'aide d'ARN d'interférence en combinaison avec l'inhibition pharmacologique d'EZH2. L'identification de facteurs contribuant à cette réponse pourrait nous permettre d'identifier des cibles supplémentaires. Une caractérisation par CHIP ainsi que des profilages transcriptionnels devront être effectués afin de compléter cet objectif.

2.3.3) Déterminer les vulnérabilités métaboliques et épigénétiques résultant de ces reprogrammations et pouvant être exploitées pour freiner la prolifération des CSTN.

Les vulnérabilités métaboliques dans les cellules cancéreuses surgissent à la suite d'une reprogrammation métabolique qui fait en sorte de « bloquer » le métabolisme cellulaire dans un état peu flexible. Ce type de reprogrammation métabolique fait en sorte de créer une dépendance quasi « obligatoire » envers une voie métabolique particulière afin que la cellule ne puisse plus recourir à des voies alternatives pour en compenser sa perte. Voilà notre objectif expérimental pour déterminer si des vulnérabilités métaboliques résultent de l'inhibition d'EZH2 dans les modèles CSTN. Nous avons identifié des voies métaboliques créant des dépendances dans les CSTN à la suite de l'inhibition d'EZH2 à l'aide des données de *BioNova* (mesure de la consommation de métabolites en temps réel) et des profils de métabolomique. Ces analyses nous ont permis d'identifier des voies métaboliques fortement utilisées à la suite de l'inhibition d'EZH2. Nous avons donc utilisé des inhibiteurs métaboliques ciblant spécifiquement les enzymes identifiés par notre analyse ou sinon les étapes limitantes de ces voies métaboliques (ou adopté une approche de déplétion par siARN) afin d'explorer une synergie potentielle (ou un effet additif) entre l'inhibition pharmacologique d'EZH2 et l'inhibition des voies métaboliques identifiées. Cette approche nous a donc permis d'identifier un inhibiteur métabolique qui crée une augmentation de la sensibilité à l'inhibition pharmacologique dans les cellules du CSTN. Ces résultats devront éventuellement être validés dans différents contextes cellulaires (incluant sur des xénogreffes de CSTN *in vivo*).

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1) Culture et récolte cellulaire

Ce projet a été mené avec les modèles cellulaires du CSTN MDA-MB-436 (ATCC[®] HTB-130[™]) et Hs-578T (ATCC[®] HTB-126[™]). Pour toutes les expériences, les cellules ont été cultivées comme décrit précédemment (Deblois et al. 2020) et maintenues dans du milieu de culture Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) supplémenté de 10 % de sérum bovin fœtal Gibco (FBS) qui a été inactivé par la chaleur (55 °C) pendant 1 heure. Chaque lignée cellulaire a été cultivée jusqu'à un maximum de 20 passages. Les deux modèles cellulaires ont été conservés soit à 21 % d'oxygène à 37 °C, soit à 1 % d'oxygène à 37 °C selon les expériences. Les cellules en culture ont été séparées lorsqu'elles atteignaient une confluence d'environ 80 %. Le détachement des cellules a été fait avec la trypsine (2,5 %) (Gibco[™] 15090046) avant d'être diluées avec le DMEM frais et comptées afin d'obtenir la densité d'ensemencement souhaitée pour les expériences subséquentes.

Pour les expériences requérant des milieux de culture privés de glucose ou de glutamine, les cellules ont été ensemencées dans du milieu complet 24h avant le changement pour le milieu pauvre en nutriment. 24h suivant l'ensemencement, les milieux ont été changés pour des milieux DMEM dépourvus de glucose ou glutamine ("Wisent Bio Products" n.d.), fait sur mesure) puis supplémentés avec 10% de FBS dialysé ("Wisent Bio Products" n.d.) et les quantités voulues de glucose (4,5g par litre ou 0,09g par litre ("Wisent Bio Products" n.d.) et de glutamine (4mM ou 0,08mM, ("Wisent Bio Products" n.d.)). Pour les traitements aigus avec les inhibiteurs de l'activité d'EZH2, les cellules ont été traitées avec 1µM des molécules UNC1999, GSK-126, EPZ-4638 ou GSK-343 selon les doses optimisées préalablement dans ces lignées cellulaires (Deblois et al. 2020) pour 72-144h avant la récolte des cellules selon l'expérience. Pour les traitements en réponse de dose avec l'inhibiteur de GLUT-1 (BAY-876) et l'inhibiteur de GCLC (BSO), les cellules ont été prétraitées avec les inhibiteurs d'EZH2 comme décrit plus haut, 24h suivant le traitement avec l'inhibiteur d'EZH2, les cellules ont été ensemencées à une dilution appropriée pour un test de viabilité en plaques de 96 ou 24 puits puis traitées avec différentes dilutions de BAY-876 ou BSO (100µM à 0.001µM) pour un autre 72h (total 96h de traitement avec inhibiteur EZH2).

Pour les expériences avec l'ARN d'interférence de type siARN ciblant ERR α , les siARN contre ERR α (siESRRA), et siARN contrôle (siC) ont été obtenus auprès de Thermo Fisher (siESRRA: 4390824 - s4831; siC: 4390844). Les transfections ont été réalisées en suivant le

protocole pour RNAiMAX (Rnaimax n.d.) sur cellules ensemencées selon les recommandations du protocole. Les validations en immunobuvardages pour valider l'expression d'ERR α ont été réalisées à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin anti-ERR α (Abcam 2131-1).

3.2) Réactifs

UNC1999 a été obtenu auprès de l'UHN Shanghai (UHN-2040-1431612, PO #20180829). Le tazémétostat (EPZ-6438) a été obtenu par l'entremise de CedarLane auprès du fournisseur ApexBio (code produit A8221-20). Le diméthylsulfoxyde (DMSO) a été utilisé comme témoin et nous avons utilisé le BioReagent Hybri-Max™, filtré stérilement, adapté aux hybridomes, $\geq 99,7$ % de Sigma-Aldrich (D2650). Les composés BAY-876 et BSO ont été obtenus respectivement de CedarLanes (BAY-876: 19961-25) et de Sigma-Aldrich (BSO: B2515-500MG) Le méthanol *MS-grade* pour l'isolation des métabolites a été obtenu chez Thermo Fisher. L'ARN pour les expériences de séquençage d'ARN a été purifié à l'aide du kit de purification d'ARN de Qiagen RNeasy Kit (27104). La transcription inverse des ARN en ADN complémentaire a été effectuée avec la trousse de *cDNA synthesis Sensi-Fast* (FroggaBio #BIO-65054) et avec l'instrument PCR (*cycleur thermique C1000 Touch de BioRad*). Les analyses de qPCR en temps réel ont été effectuées avec le *SYRB Green noROX* (FroggaBio #BIO-98005) et analysées avec l'instrument *CFX96 Touch* de BioRad. Les comparaisons statistiques ont été complétées à l'aide d'un test-t de Student apparié Les amorces utilisées pour les qPCR sont énumérées dans la table ci-dessous. Les anticorps utilisés pour ce projet sont:

Tableau 1: Anticorps utilisés pour ce projet

Nom	Distributeur et numéro de catalogue
ERR α	AbCam - ab76228
H3K27me3	Cederlane Labs - C15410069
GCLC	Abcam - ab190685
A-Tubuline	Sigma-Aldrich - T5168
Histone H3	Abcam - ab10799

Tableau 2: Liste des amorces utilisées pour les PCR dans ce projet

Gène cible de l'amorce	Séquences	
	Amorce avant	Amorce inverse
ACSL1	AGGCATCACATTGCACCCTG	GCCATCAGCAGGAGAAGAGA
ASNS	CTCTGGCGACCAAAGAAGC	CCATCATTGCATCATCAACCTGA
COX7A2L	GCTACAAAAGTTTTCCAGAAAGC	ATCAGGCAGTAGATGGTCCCT
CS	GGGGTGCTGCTCCAGTATTA	CTAAGGCTCGGCTCCAGATG
FBP1	GCCCCAATGGAAAGCTGAGA	TTCAGGAACTCGAGCACGTC
FBP2	CCCTAAGGGCAAGCTCCG	CTGGTGACCCAGAATGAGG
G6PC	GTGAGACTGGACCAGGGAAAG	AGCAATGCCTGACAGGACTC
GCLC	AGAAGAGAGCATCTGGAGAACT	TCCAAGTAACTCTGGGCATTCA
GCLM	TCACAATGATCCAAAAGAAGCTGC	TCACAATGACCGAATACCGCA
GLS	AGGTGGTGATCAAAGGCATTC	TCCTCATTTGACTCAGGTGACA
GLUD	GCGTTCTGCCAGGCAAATTA	TGCAGAAGTTACATGTGAAGAGGA
GLUL	CCGCACGTGTCTTCTCAATG	GGGGAAGAGTTGGAGTGGGA
GOT1	GGCATGTTACAGTTCACTGG	TGGTGGTTAAGCCACTCACG
GOT2	GCTAAAGCCTGAACAGGTGG	GTCTCTGTTTCCCTCGCACCA
GPT	CCTACCACTTCCGGATGACCA	AAGAGCAAGTACAGTGGGCT
GPT2	AGACTGGCATCTGTGTCTGTG	CCTTCTGCAGCACCGTTTTTC
HK1	ACGTGTCTCTTCTCCTGTCT	GATCCCGGACTCTTAGCTGC
HK2	AGCTACATCCTCACTTTGCC	AGGGGTTCTATCGCTGTCCA
IDH1	CAGAGGGTTAGCCACAGAG	GTCAGAACGTTGCACATTGGG
IDH2	ACGGCCTCAGCAATGTGAA	TCCCCTAGAAAGGCCTCCAG
LDHA	GGCAACCCTGCAACGATTTT	AGTGACACACTATCATTGCCT
LDHB	GTGCAGATACCCTGTGGGAC	GGCTTTGATTCTGTGAGCCC
MAOA	GGAACCTGCCCTCTGTTTCT	CAGAACTTCAAGACCGTGGC
MDH1	GTCAGGGACATCTGGTTTGA	GAGACCTTCAACAACTTCCAGG
MDH2	GTCTTCTCCCTTGTGGATGC	CTCGATGCCCTTTTTCCCAAG
ME1	CTGAAAATTGCAGAAAAGATTGTGA	ACATCTGGGAGCGGACAAAT
ME2	CCAAGGGAGACTTTACCCACC	CACAGGAGGGCTTGATGCAG
NDUFB3	GCTGAATATTACCTGGAGTCCCT	ACCAGACAAGTAGGCTACAGAG
OGDH	CCAAGCCCCTGTGGTATGC	GAGAAGCAAGGGGCAGTCAT
PC	CCTCACCCATGGAGGGTACT	GCTTCTGTTGAAGGCTTGGG
PCK1	GGATCAAGTCAATGCCGACC	CCCTCTTGTCTCCTACTGC
PDHA2	CACATCTACTCCAGCGACCC	CTGGTAGCCCCCTGAAGGTA
PDK4	GCTATCATCTACTTAAAGGCTTTGT	CCAGTCATCAGCCTCAGAGC
SLC7A11	GCCCAGATATGCATCGTCCT	GTTCTGGTTATTTTCTCCGACATT

3.3) Analyses statistiques

Les données d'expression transcriptionnelles de cancer du sein disponibles dans les cohortes *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (Hoadley et al. 2018) et METABRIC (Curtis et al. 2012) ont été étudiées à l'aide de l'outil *cBioportal* (Cerami et al. 2012). La cohorte TCGA-*PanCancer* a été filtrée pour les cancers du sein (BRCA). Les mesures statistiques sont obtenues avec One-way Anova, et corrigées pour comparaisons multiples avec le test de Tukey. Les graphiques de corrélation ont été créés à l'aide de l'outil MISTIC. Pour les graphiques

d'associations, les mesures de statistiques sont obtenues par test d'hypothèse multiple (*False Discovery Rate*). Les données de dépendance pharmacologiques et génétiques issues de criblage CRISPR, d'inhibition d'ARN et de criblages de repositionnement de médicament ont été analysé (*drug repurposing*) à l'aide de la plateforme DepMap (McFarland et al. 2018).

3.4) Essais de viabilité et de prolifération

Les cellules ont été maintenues comme décrit ci-dessus,ensemencées dans des plaques à 96 ou 24 puits et traitées avec les sondes épigénétiques, les médicaments métaboliques indiqués ou complétées ou appauvries avec les métabolites indiqués. La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide de cristal violet (0,5 g de poudre de cristal violet, 350 ml d'eau, 50 ml d'éthanol à 95 %, 100 ml d'eau) comme décrit précédemment (Deblois et al. 2016) ou à l'aide du test CellTiter-Glo (Promega). La densité optique a ensuite été mesurée à 562 nm à l'aide du lecteur de plaque *The Infinite® 200 PRO NanoQuant*.

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de *GraphPad Prism* version 9.4.1 pour Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). La comparaison de deux groupes a été effectuée à l'aide d'un test t non apparié à deux queues, et la comparaison de plus de deux groupes a été effectuée avec une ANOVA unidirectionnelle. La signification statistique a été acceptée à une valeur P inférieure à 0,05. Des courbes de normalisation, de transformation et de meilleur ajustement ont été ajoutées à l'aide des fonctionnalités implémentées de *GraphPad Prism*. Tous les résultats présentés représentent la moyenne d'au moins trois expériences répétées indépendantes, chacune réalisée avec au moins trois répétitions techniques.

3.5) Séquençage de l'ARN

Les patrons d'expression transcriptionnels dans des cellules Hs 578T, traitées ou non, avec l'inhibiteur d'EZH2/EZH1 (UNC1999, 1uM) ont été profilés. Les cellules ont été traitées pour 96h avec l'inhibiteur d'EZH2, puis l'ARN fut extrait. Le temps de traitement avait été optimisé auparavant selon la cinétique de diminution de la marque H3K27me3 dans les cellules Hs 578T qui est optimale entre 72-96h) (Deblois et al. 2020). L'ARN a été purifié et séquencé (*PolyA-purification, Nextseq500-- 75 cycles Single-End*) et les séquences obtenues ont été analysées par la plateforme de bio-informatique de l'IRIC.

Des comparaisons de l'expression des gènes dans les cellules Hs 578T avant et après traitement avec UNC1999 (1µM UNC1999 (96h) versus Sulfoxyde de diméthyle, DMSO) ont été faites à l'aide de l'outil DESeq2 (Love, Huber, and Anders 2014). L'outil *Gene Set Expression Analysis* (GSEA, version 4.0.5; Broad Institute) (Subramanian et al. 2005) a ensuite été utilisé pour l'analyse de la fonction des gènes différentiellement exprimés avec le traitement UNC1999.

L'expression différentielle d'une sélection des gènes métaboliques identifiés dans cette expérience de séquençage d'ARN a été validée à l'aide de PCR quantitatifs (qPCR) en utilisant l'ARN extrait de cellules de CSTN (Hs 578T et MDA-MB436), traitées ou non avec UNC1999 ou EPZ-6438; 1µM) ainsi que dans des PDX de tumeurs du CSTN, traitées ou non avec l'inhibiteur UNC1999 (300mg par kg; 6x par semaines, pour 6 semaines) (échantillon généré préalablement dans (Deblois et al. 2020)).

3.6) Extraction de protéines, immunobuvardages et analyses

Les protéines ont été extraites de 2 à 3 millions de cellules à l'aide de tampons d'extraction spécifiés, notamment le tampon de lyse à 4 ° C (25 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, désoxycholate de sodium à 1 %, SDS à 0,1%) additionnés d'inhibiteurs de protéase (Complete™, Mini, Protéase I sans EDTA (Sigma0Aldrich 4693159001) à une concentration de 20 X), un tampon de lyse RIPA à 4 ° C légèrement modifié (50 mmol/L Tris HCl, pH 8, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 % NP-40, 0,25 % désoxycholate), ou un tampon d'extraction acide (0,4 mol/L HCl) et neutralisé avec du phosphate dibasique de sodium. Tous les extraits cellulaires ont été soumis à une sonication dans le système de sonication *Q800R3 QSonica* pendant 10 minutes avec des impulsions de 30 secondes marche/30 secondes arrêt à une amplitude de 60 % à 4 °C. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à vitesse maximale. Le surnageant a été recollé dans de nouveaux tubes et la concentration en protéines a été vérifiée avec la trousse d'analyse de protéines *Pierce BCA* (ThermoFisher Scientific 23227) conformément au protocole.

Des quantités égales de protéines de lysat (10 à 50 µg) ont été soumises à une électrophorèse sur des gels d'acrylamide de 8 à 15 %, selon la taille des protéines. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane à l'aide du système de transfert *Trans-Blot® Turbo™*.

Les membranes ont ensuite été bloquées pendant une heure sur un agitateur à température ambiante dans du *Tris-buffered saline-T* 1X (TBS et Tween20) avec du lait à 5 %. Une fois le blocage terminé, les membranes ont été soigneusement rincées avec du PBS 1X froid et incubées dans des anticorps primaires avec les spécifications de chacun, pendant une nuit à 4 ° C sur un agitateur. Le lendemain, les anticorps primaires ont été récupérés, et les membranes ont été lavées 3 fois 10 minutes avec du TBS-T 1X froid, incubées dans les anticorps secondaires pendant une heure, et lavées à nouveau avec du PBS 1X froid 2 fois 5 minutes. Toutes ces étapes ont été réalisées à température ambiante sur un agitateur. La présence de protéines d'intérêt a ensuite été révélée par ECL+ (chimiluminescence améliorée).

3.7) Métabolomique

3.7.1) Analyses des métabolites intracellulaires de modèles de CSTN

Les cellules Hs 578T et MDA-MB-436 ont été exposées à l'inhibiteur d'EZH2/EZH1 (UNC1999, 1 μ M). Après 96 et 144h de traitement, les milieux de culture conditionnés ont été récoltés et les métabolites qu'ils contiennent ont analysés à l'aide de l'instrument *BioNova400*© par la plateforme de métabolomique du *Goodman Cancer Institute* (GCI) de l'Université de McGill. Les niveaux de métabolites obtenus par analyse spectrale ont été normalisés par le nombre de cellules respectives de chaque échantillon pour quantification. Les comparaisons des valeurs obtenues par la quantification LC-MS ont été analysés selon des test-t non-couplés.

Pour le profilage des métabolites intracellulaire des cellules Hs 578T en réponse au traitement avec UNC1999 (1 μ M, 96h), les cellules ont été incubées dans des plaques à 6 puits dans 3 ml de milieu pendant 96 heures. Les cellules ont été brièvement lavées avec 1 ml de solution saline glacée (0,9 % de NaCl dans de l'eau) deux fois avant l'extraction des métabolites. Les métabolites ont été extraits dans du méthanol à 80 %, séchés dans un concentrateur sous vide et stockés à -80 °C jusqu'à une analyse plus approfondie. Les métabolites ont été reconstitués dans le solvant de l'échantillon (eau : méthanol : acétonitrile, 2 : 1 : 1, v/v) avec un volume proportionnel au nombre de cellules ; 3 μ l ont été injectés pour l'analyse métabolomique. L'intensité maximale LC-MS (surface de pic intégrée) de chaque métabolite a été utilisée pour calculer le rapport d'abondance relative. L'intensité maximale a été normalisée par quantile et l'enrichissement différentiel des métabolites a été calculé entre les cellules Hs 578t traitées ou non au UNC1999 (1 μ M, 96h) à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle. Pour l'analyse de la distribution de masse des

isoprotomères et la LC-MS, les cellules ont étéensemencées en quatre exemplaires dans des plaques de 100 mm, cultivées à 50 % de confluence et traitées avec le contrôle ou l'UNC1999 pendant 96 heures avant de remplacer le milieu par 7 mL de DMEM à haute teneur en glucose appauvri en l-glutamine (“Wisent Bio Products” n.d.) additionné de 10 % de FBS dialysé (“Wisent Bio Products” n.d.) et de 4 mM de l-¹³C₅-glutamine (uniformément marquée, *Cambridge Isotope Laboratories*, 99 %) ou de l-glutamine non marquée (*Sigma-Aldrich Co*). Après des impulsions de 30 minutes ou de 4 heures, les cellules ont été extraites et soumises à une analyse LC-MS du flux de glutamine en glutamine, glutamate et aKG, comme décrit précédemment (Gravel, Avizonis, and St-Pierre 2016). Les corrections matricielles pour l'analyse des traceurs ont été effectuées comme décrit précédemment (Deblois et al. 2016).

3.7.2) Traçage de la glutamine

Les cellules Hs 578T préalablement traitées avec UNC1999 (1µM, 96h) ont été exposées à un milieu de culture où la glutamine a été remplacée par une glutamine dont les 5 carbones sont marqués au carbone-13 (¹³C₅-glutamine). Les métabolites intracellulaires ont été extraits après 30 minutes, 2h ou 6h d'exposition avec la glutamine marquée. Les métabolites extraits pour chacun des temps ont été analysés par LC-MS, comme expliqué auparavant (*ion pairing*, centre de métabolomique, GCI, McGill).

Chapitre 4 : Résultats

4.1) L'expression de la méthyltransférase EZH2 est augmentée dans les cancers du sein de sous-type Basal.

Des études récentes suggèrent un rôle de la reprogrammation de la marque épigénétique H3K27me3 et de l'activité d'EZH2 dans la réponse et la résistance à la chimiothérapie dans les CSTN (Deblois et al. 2020; Marsolier et al. 2022). EZH2 possède à la fois une fonction canonique à travers son association au complexe PRC2 et une activité non-canonique (PRC2-indépendant). Nous avons donc dans un premier temps évalué l'association entre EZH2, les cofacteurs constituant PRC2 et les différents sous-types de cancer du sein. Nous avons étudié les données d'expression transcriptionnelles de cancer du sein disponibles dans les cohortes *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (Hoadley et al. 2018) et METABRIC (Curtis et al. 2012) à l'aide de l'outil *cBioportal* (Cerami et al. 2012). Dans les 2 cohortes étudiées, les niveaux d'expression du gène codant pour la méthyltransférase EZH2 (*EZH2*) est significativement augmentée dans les cancers du sein de type Basal (enrichis pour les CSTN) selon la classification PAM50 (Korde et al. 2010) relativement aux autres sous-types (**Figure 4.1A-B**). Nous observons aussi que les niveaux d'expression des autres membres du complexe PRC2 (incluant *SUZ12*, *EED*, *RBBP4*, *RBBP7*, *JARID2* et *AEBP2*) varient entre les différents sous-types de cancer du sein (cohorte TCGA-*PanCancer* filtrés pour cancers du sein (BRCA)) et qu'en général, l'expression de plusieurs d'entre eux est aussi significativement plus élevée dans les tumeurs de sous-type Basal relativement aux autres sous-types (**Figure 4.1C-H**). Nous concluons donc que les facteurs du complexe PRC2 sont plus exprimés dans les tumeurs du sein de sous-type Basal relativement aux autres sous-types.

La méthyltransférase EZH1, encodée par un gène (*EZH1*) homologue à *EZH2*, peut substituer EZH2 au sein du complexe PRC2, où elle y assure la fonction de méthyltransférase. Cependant, il n'est pas connu si les complexes PRC2 incluant EZH2 ou EZH1 ont la même fonction et s'ils partagent les mêmes cibles génomiques. Nous avons observé que l'expression du gène *EZH1* est inversement corrélée à celle du gène *EZH2* dans les cancers du sein ($r = -0.34$), cohorte TCGA-*PanCancer*) (**Figure 4.1I**). De plus, son expression est significativement plus élevée dans les tumeurs Luminales A et Luminales B relativement aux tumeurs Basales (**Figure 4.1J**) (cohorte TCGA-*PanCancer*). Des résultats similaires sont obtenus en utilisant la cohorte METABRIC (non montré). Ces observations suggèrent que la méthyltransférase EZH2 est l'enzyme

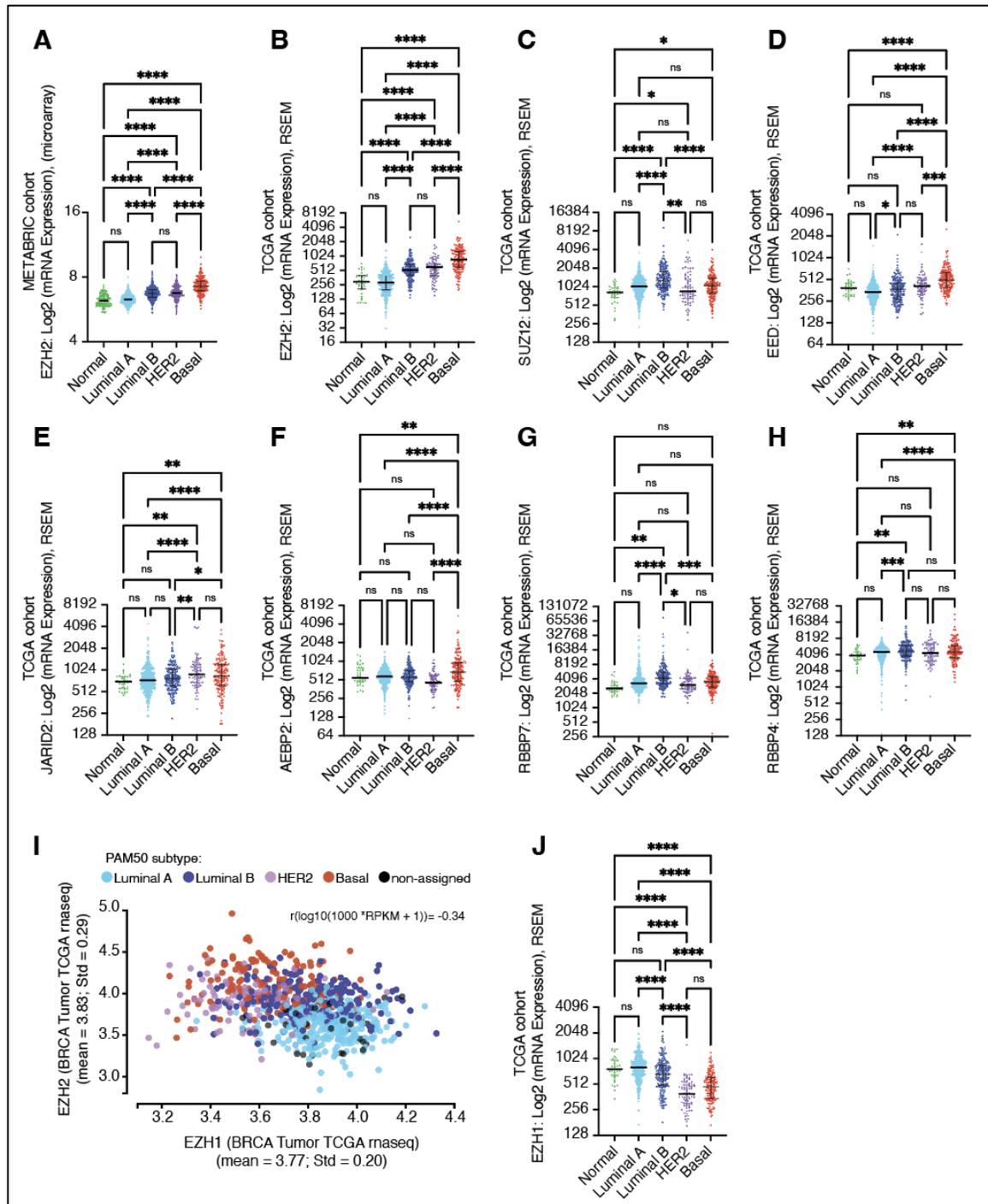


Figure 4.1: L'expression de la méthyltransférase EZH2 est augmentée dans les cancers du sein de sous-type Basal.

A. Expression de l'ARN messager (ARN messager quantifié par micro-puces; représentée en Log₂) du gène *EZH2* dans les tumeurs du cancer du sein de la cohorte METABRIC. Les tumeurs sont séparées en sous-groupes selon leur sous-type déterminé à l'aide de PAM50. Les mesures statistiques sont obtenues avec One-way Anova, et corrigées pour comparaisons multiples avec le test de *Tukey*. **B.** Expression de l'ARN messager (ARNm quantifié séquençage d'ARN analysé

avec *RNA-Seq by Expectation Maximization* (RSEM); représentée en Log2) du gène *EZH2* dans les tumeurs du cancer du sein de la cohorte TCGA. Les tumeurs sont séparées en sous-groupes selon leur sous-type déterminé à l'aide de PAM50. Les mesures statistiques sont obtenues avec One-way Anova, et corrigées pour comparaisons multiples avec le test de Tukey. **C.** Même analyse qu'en B, pour le gène *SUZ12*. **D.** Même analyse qu'en B, pour le gène *EED*. **E.** Même analyse qu'en B, pour le gène *JARID2*. **F.** Même analyse qu'en B, pour le gène *AEBP2*. **G.** Même analyse qu'en B, pour le gène *RBPP7*. **H.** Même analyse qu'en B, pour le gène *RBPP4*. **I.** Graphique de corrélation entre l'expression de l'ARN messager (mRNA, RSEM); des gènes *EZH2* (axe Y) et *EZH1* (axe X) dans les tumeurs du cancer du sein de la cohorte TCGA (Breast Cancer, BRCA) effectué à l'aide de l'outil MISTIC (Lemieux et al. 2017). Les couleurs indiquent les sous-types de chacune des tumeurs définis par PAM50. **J.** Même analyse qu'en B, pour le gène *EZH1*. Corr.P values : $P < 0.033(*)$; $P < 0.0021(**)$; $P < 0.0002(***)$; $P < 0.00001(****)$.

de méthylation principale du complexe PRC2 dans les tumeurs de type Basal alors que les tumeurs du sein de sous-type Luminal utilisent potentiellement *EZH1* de façon préférentielle. Nous ignorons si des complexes PRC2 utilisant préférentiellement *EZH1* ou *EZH2* dans différents sous-types de cancers sont redondants et permettent les mêmes fonctions.

4.2) L'expression accrue de la méthyltransférase *EZH2* est associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs du sein du sous-type Basal.

Puisque l'expression d'*EZH2* est augmentée dans les tumeurs Basales relativement aux autres sous-types de tumeurs du sein nous avons étudié l'association entre la Probabilité de survie des patients (*Probability of Overall Survival*, OS) et les niveaux d'expression d'*EZH2*. Les hauts niveaux d'*EZH2* dans les tumeurs sont associées à un plus faible taux de survie dans les tumeurs de sous-type Basal (Hazard Ratio (HR) : 2.02; logrank P : 0.004) de types Luminal A (HR : 1.98; logrank P : 0.00037), mais n'est pas associée à la survie dans les autres sous-types de cancer du sein (**Figure 4.2A**). Outre *EZH2*, les niveaux d'expression des autres membres du complexe PRC2 ne sont pas associés à de faibles taux de survie dans aucun des sous-types de tumeurs du sein, à l'exception de *RBPP4* dans les tumeurs de sous-type Basal (données non-présentées). Des hauts niveaux d'expression d'*EZH1* sont associés à un taux de survie favorable, uniquement dans les tumeurs du sein de type Luminal B (HR : 0.52; Logrank P : 0.006) (**Figure 4.2B**).

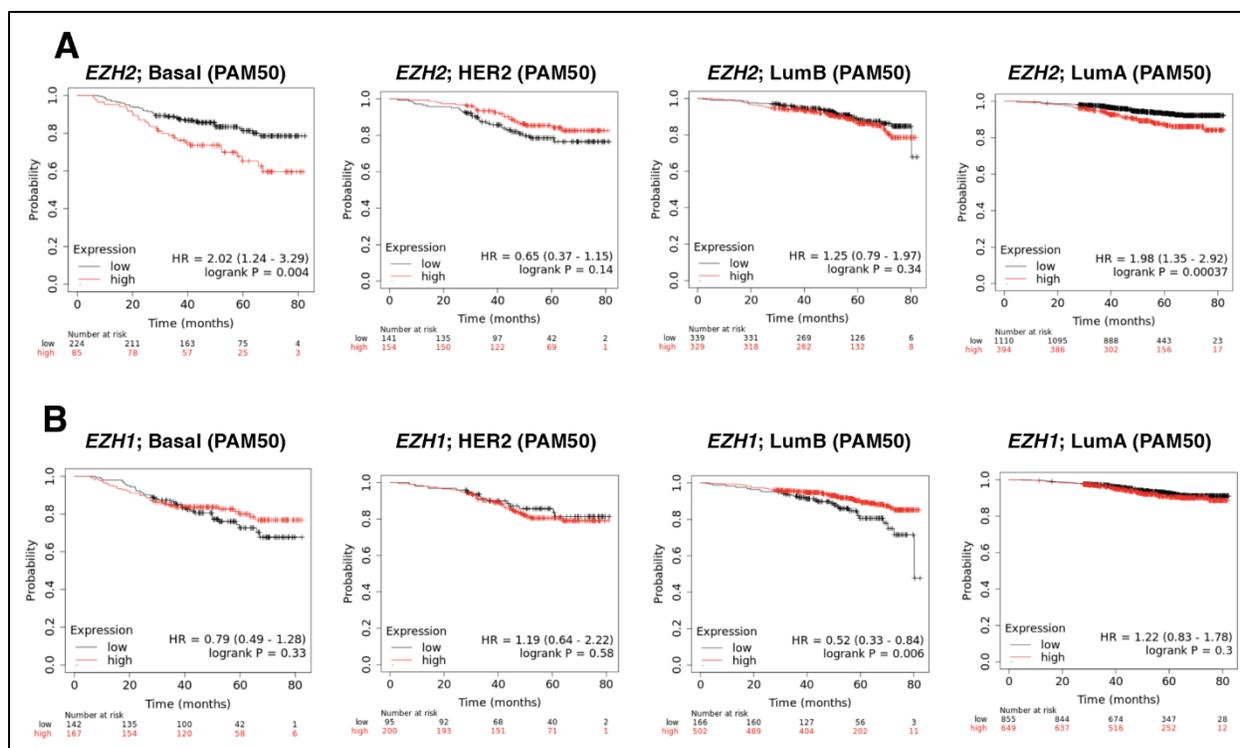


Figure 4.2: L'expression accrue de la méthyltransférase EZH2 est associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs du sein du sous-type Basal.

A. Graphique Kaplan-Meier (Kaplan-Meier Plotter (Györfy 2021)) montrant l'association entre les niveaux d'expression de l'ARN messager du gène *EZH2* et la probabilité de survie des patients (*Overall Survival*) dans les tumeurs du cancer du sein de la cohorte TCGA filtrée pour les différents sous-type Basal. Les patients sont séparés en deux groupes selon le meilleur seuil de performance entre les quartiles. Les mesures de statistiques sont obtenues par test d'hypothèse multiple (*False Discovery Rate*, FDR). HR: *Hazard Ratio*. **B.** Même analyse qu'en A, pour le gène *EZH1*.

4.3) L'inhibition de l'activité d'EZH2 impacte peu la prolifération de lignées cellulaires CSTN de sous-type Basal.

Une étude par la Dre Deblois (Deblois et al. 2020) avait rapporté que le traitement de PDX provenant de tumeurs Basales avec un double inhibiteur d'EZH2/EZH1 (UNC1999 (300mg par kg; 6x /semaines pour 6 semaines)) n'a pas d'effet sur la croissance et le volume tumoral. L'inhibition pharmacologique d'EZH2 ou sa délétion/déplétion peut avoir un effet sur la prolifération/viabilité/croissance tumorale dans des contextes où les cellules cancéreuses sont pré-exposées à un stress (ex. chimiothérapie) (Deblois et al. 2020; Marsolier et al. 2022). Nous avons validé les effets des doubles inhibiteurs d'EZH2/EZH1 (UNC1999 ou GSK343) et des inhibiteurs spécifiques d'EZH2 (GSK126, EPZ-6438 (aussi appelé Tazverik®/Tazemotostat®)) sur la

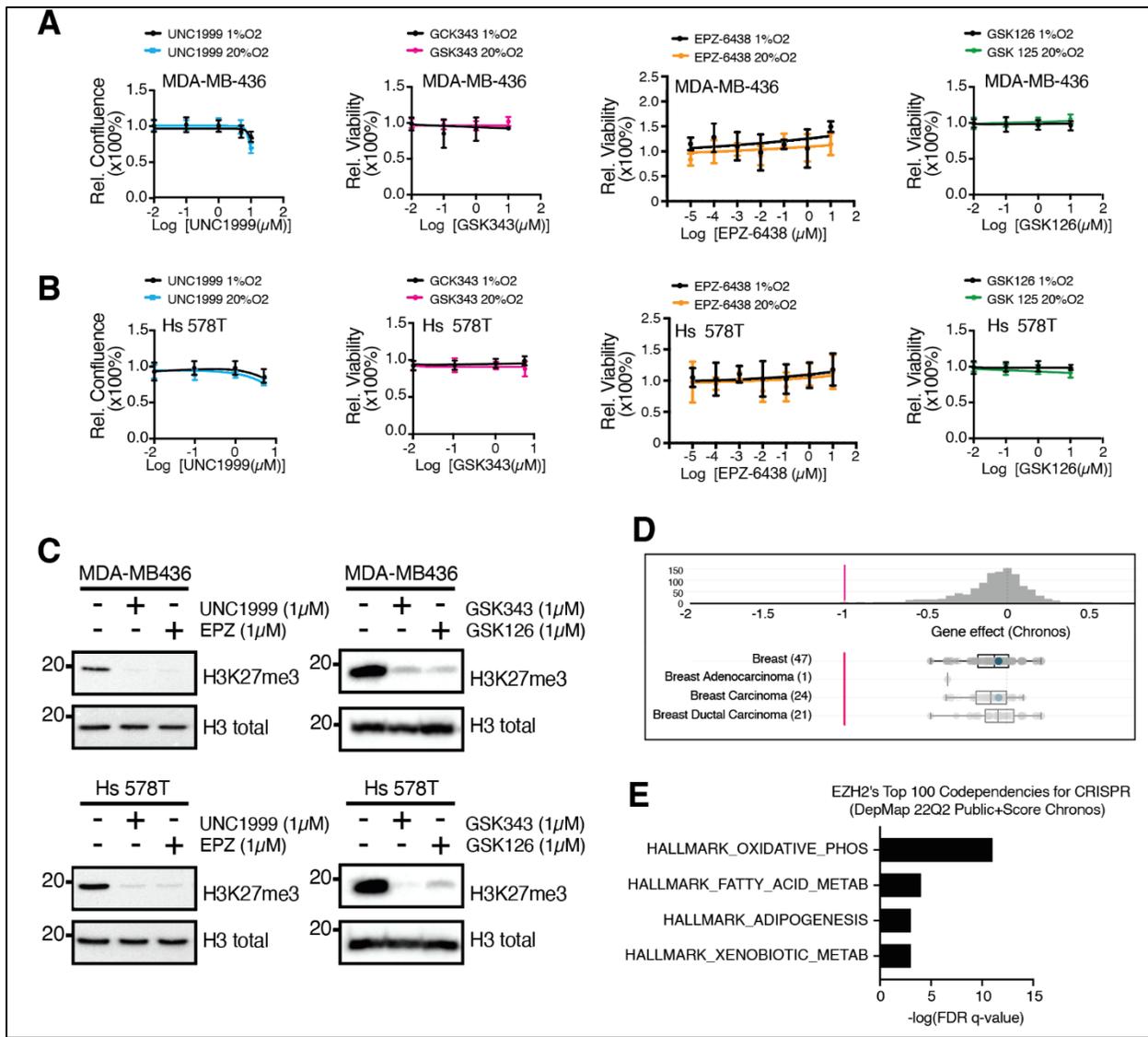


Figure 4.3: L'inhibition de l'activité d'EZH2 a peu d'impact sur la prolifération des lignées cellulaire du CSTN de sous-type Basal.

A. Courbes de viabilité relative des cellules MDA-MB436 en réponse à des doses variables des inhibiteurs d'EZH1/EZH2 (UNC1999, GSK343) et des inhibiteurs spécifiques d'EZH2 (EPZ-6438, GSK126) mesuré à 20% d'oxygène (O₂) ou 1% O₂. Barres d'erreur : déviation standard. n=4; **B.** Même analyse qu'en A, pour la lignée cellulaire Hs 578T. **C.** Immunobuvardages (western blots) représentant les niveaux protéiques de la marque H3K27me3 suite au traitement de MDA-MB-436 ou Hs 578T avec les inhibiteurs d'EZH2 pour 96h. Les niveaux de H3 (total) sont utilisés comme contrôle de chargement. **D.** Graphique représentant les effets de perturbation de survie résultant de la délétion du gène EZH2 dans 47 lignées de cancer du sein, à partir du jeu de données CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos). *Gene Score* de 0 : gène non-essentiel; *Gene Score* de 1 : médiane des gènes communs essentiels. **E.** Graphique représentant l'analyse de l'enrichissement des groupes de gènes (*Gene Set Enrichment Analysis*, GSEA) basé sur le jeu de données *Hallmark of Cancer* (MSigDB) pour les 100 premiers gènes montrant une codépendance avec la délétion d'EZH2 dans la cohorte CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos).

prolifération des lignées cellulaires CSTN de sous-type Basal (Hs 578T et MDA-MB-436) à l'aide d'essais de crystal violet. Ni la double inhibition de EZH2-EZH1, ni l'inhibition spécifique d'EZH2 n'ont eu d'effet sur la viabilité ou croissance cellulaire (96h) (**Figure 4.3A-B**), même si la marque H3K27me3 est bien inhibée (**Figure 4.3C**)

Nous avons ensuite examiné des données de dépendance pharmacologiques et génétiques issues de criblage CRISPR, d'inhibition d'ARN et de criblages de repositionnement de médicament (*drug repurposing*) à l'aide de la plateforme DepMap (McFarland et al. 2018). La délétion du gène *EZH2* par CRISPR est significativement sélective à travers une cohorte de 1086 lignées cellulaires (issus de différents types cellulaires), ce qui signifie que ce gène n'est pas essentiel mais que certaines lignées cellulaires sont sensibles à sa délétion. Les données montrent que les lignées de cancer du sein sont peu sensibles à la déplétion de EZH2 (**Figure 4.3D**). Les lignées cellulaires qui ont une dépendance à l'expression d'*EZH2*, ont aussi une codépendance à différents gènes codant pour les membres du complexe PRC2 (ex. EED, SUZ12, etc.). De façon intéressante, on a remarqué qu'elles sont aussi codépendantes à la délétion/déplétion de gènes qui encodent des enzymes du métabolisme cellulaire spécifiques, incluant des enzymes régulant le cycle du TCA, la phosphorylation oxydative (OXPHOS), l'adipogénèse, le métabolisme des acides gras et le métabolisme des xénobiotiques (**Figure 4.3E**). Cette observation suggère que la sensibilité à l'inhibition d'EZH2 pourrait être associée à une dépendance métabolique spécifique qui est présente dans certaines cellules cancéreuses (ex. les cellules qui sont sensibles à l'inhibition d'OXPHOS, du métabolisme xénobiotique ou des acides gras).

4.4) L'inhibition d'EZH2 affecte des voies métaboliques dans les modèles de CSTN

Pour étudier si l'activité d'EZH2 joue un rôle sur le contrôle du métabolisme dans les CSTN, nous avons profilé les patrons d'expression transcriptionnels dans des cellules Hs 578T, traitées ou non, avec l'inhibiteur d'EZH2/EZH1 (UNC1999, 1uM). Les cellules ont été traitées pour 96h avec l'inhibiteur, puis l'ARN fut extrait. Le temps de traitement avait été optimisé auparavant selon la cinétique de diminution de la marque H3K27me3 dans les cellules Hs 578T qui est optimale entre 72-96h) (Deblois et al. 2020). L'ARN a été purifié et séquencé (*PolyA-purification, Nextseq500-- 75 cycles Single-End*) et les séquences obtenues ont été analysées par la plateforme de bio-informatique de l'IRIC. Nous avons comparé l'expression des gènes dans les

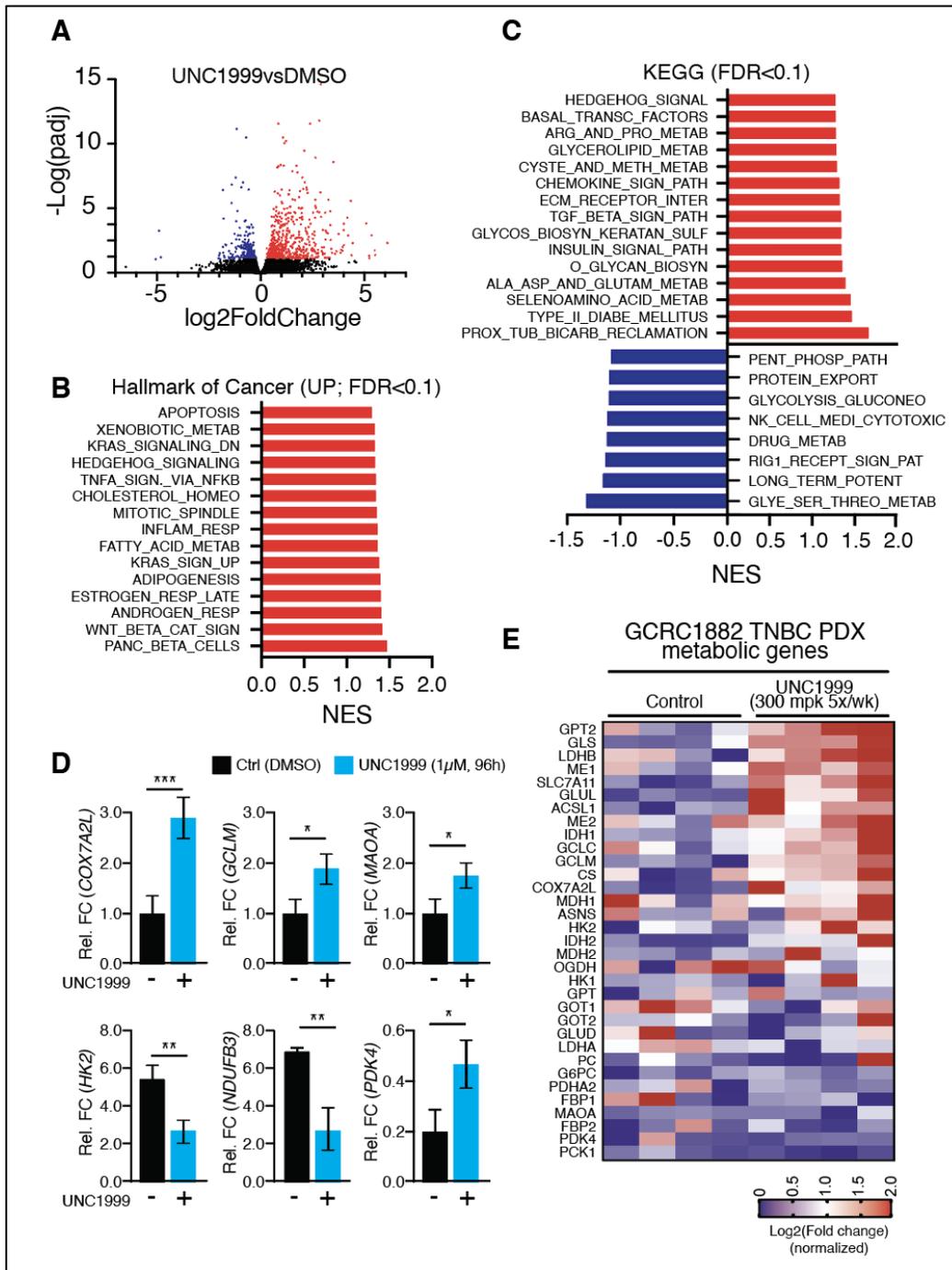


Figure 4.4: L'inhibition d'EZH2 affecte des voies métaboliques dans les modèles de CSTN
A. Diagramme en volcan (*volcano plot*) représentant les changements de niveaux d'expression ($\text{Log}_2(\text{Fold Change})$) et la valeur statistique ($-\text{Log}(p\text{value})$) obtenus par séquençage de l'ARN dans les cellules Hs 578T avec et sans traitement UNC1999 ($1\mu\text{M}$, 96h; $n=4$). Chaque point représente un gène. Rouge = gènes dont l'expression est significativement augmentée suite au traitement; Bleu : gènes dont l'expression est significativement diminuée suite au traitement (adjusted p -value < 0.05). **B.** Graphique représentant l'analyse de l'enrichissement des groupes de gènes (*Gene Set Enrichment Analysis*, GSEA) basé sur le jeu de données *Hallmark of Cancer* (MSigDB) pour les gènes différentiellement exprimés suite au traitement UNC1999 dans les

cellules Hs 578T à partir du RNA-seq en A. NES = *normalized enrichment score*. FDR < 0.1. C. Même analyse GSEA qu'en B mais basé sur le jeu de données *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). FDR < 0.1. D. Quantification par PCR quantitatif en temps réel (RT-qPCR) des changements d'expression de gènes représentatifs des voies métaboliques identifiées en B et C à l'aide d'amorces spécifiques. Barres d'erreur : déviation standard; * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; *** p-value < 0.001 (Test-t Student apparié). E. Représentation en *Heatmap* de la quantification par RT-qPCR des changements d'expression de gènes représentatifs des voies métaboliques identifiées en B et C à l'aide d'amorces spécifiques dans des PDX de CSTN traitées ou non avec UNC1999 (300mpk, 6w; n=4).

cellules Hs 578T avant et après traitement avec UNC1999 (1µM UNC1999 (96h) versus Sulfoxyde de diméthyle, DMSO) à l'aide de l'outil DESeq2 (Love, Huber, and Anders 2014). Nous avons observé que 373 gènes ont une expression significativement augmentée à la suite du traitement UNC1999 (expression génique différentielle EGD > 1; p-value ajustée (adj-p) < 0.05) et 84 gènes dont l'expression est diminuée à la suite du traitement UNC1999 (**Figure 4.4A**). Nous avons ensuite examiné la fonction des gènes différentiellement exprimés avec le traitement UNC1999 avec l'outil *Gene Set Expression Analysis* (GSEA, version 4.0.5; Broad Institute) (Subramanian et al. 2005). Les gènes significativement induits avec l'inhibiteur UNC1999 (1µM; 96h) sont enrichis pour la signalisation KRAS, la réponse interféron gamma et le métabolisme des cellules bêta et diabète (Liberzon et al. 2011; "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" n.d.), adj-p < 0.0001, score d'enrichissement normalisé (NES) > 1) (**Figure 4.4B-C**). De façon intéressante, l'inhibition d'EZH2 dans les cellules Hs 578T a aussi induit l'expression de plusieurs gènes qui régulent le métabolisme cellulaire tels que le métabolisme des acides gras (*Hallmark of cancer*; p < 0.0001, NES=1.31), le métabolisme des xénobiotiques (*Hallmark of cancer* ; p < 0.0001, NES=1.29), le métabolisme du cholestérol (*Hallmark of cancer* ; p=0.016, NES=1.47), le métabolisme des acides aminés : sélénocystéine, alanine-aspartate-glutamate, cystéine-méthionine, arginine-proline et des glycolipides et glycérolipides (KEGG, adj-p < 0.0001, NES > 1.26). Les gènes dont l'expression est diminuée avec UNC1999 ne sont pas enrichis pour aucun groupe de gènes dans la base de données *Hallmark of Cancer* mais ils sont enrichis significativement pour des fonctions liées au métabolisme cellulaire en utilisant la base de données KEGG (métabolisme de la glycine, sérine and thréonine, glycolyse-gluconéogénèse et pentose-phosphate) (adj-p < 0.01, NES > 1.11) (**Figure 4.4C**; barres bleues). L'expression différentielle d'une sélection des gènes métaboliques identifiés dans l'expérience de séquençage d'ARN a ensuite été validée à l'aide de PCR quantitatifs (qPCR) en utilisant l'ARN extrait de cellules de CSTN (Hs 578T et MDA-MB436), traitées ou non avec UNC1999 ou EPZ-6438; 1µM)

(**Figure 4.4D**) ainsi que dans des PDX de tumeurs du CSTN, traitées ou non avec l'inhibiteur UNC1999 (300mg par kg; 6x par semaines, pour 6 semaines) (échantillon généré préalablement dans (Deblois et al. 2020)) (**Figure 4.4E**). Dans l'ensemble, l'étude des changements d'expression des gènes à la suite de l'inhibition d'EZH2 dans les modèles du CSTN suggèrent que la méthyltransférase EZH2 pourrait jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle de certaines voies métaboliques dans les CSTN.

4.5) L'inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2 perturbe le métabolisme du glucose dans les cellules du CSTN.

Le glucose peut jouer plusieurs rôles importants pour les cellules cancéreuses. Notamment, il sert de nutriments importants pour les cellules cancéreuses et son métabolisme intracellulaire permet d'assurer la production d'ATP par la glycolyse et d'alimenter le cycle du TCA, l'OXPPOS et la voie des Pentose Phosphates (**Figure 4.5A**, région rose). Parce que l'inhibition d'EZH2 induit des changements dans l'expression de gènes métaboliques qui régulent la glycolyse, nous avons étudié si le traitement avec UNC1999 influence la consommation de glucose et la sécrétion du produit final de la glycolyse, le lactate, par des cellules du CSTN. Les cellules Hs 578T et MDA-MB-436 ont été exposées à l'inhibiteur d'EZH2/EZH1 (UNC1999, 1 μ M). Après 96 et 144h de traitement (assez de temps pour permettre la consommation et production de métabolites), les milieux de culture conditionnés ont été récoltés et les métabolites qu'ils contiennent ont analysés à l'aide de l'instrument *BioNova400*©, qui permet la quantification du glucose, du lactate, du glutamate et de la glutamine, qui représentent 4 métabolites permettant de définir l'état bioénergétique des cellules. Des milieux de cultures non-exposés aux cellules (naïfs) sont aussi utilisés en tant que contrôles pour permettre de quantifier les niveaux de métabolites consommés et sécrétés par les cellules durant les 96-144h de traitement. Nous avons observé que la consommation de glucose et la sécrétion de lactate, qui indiquent l'activité glycolytique des cellules, ne sont pas significativement changés par le traitement des cellules du CSTN avec UNC1999 (**Figure 4.5B-C**). Il y a une faible augmentation ($p < 0.05$) de la sécrétion de lactate à la suite du traitement dans les cellules Hs 578T. Ces observations suggèrent que l'inhibition d'EZH2 n'impacte pas la consommation de glucose ou le taux de production de lactate (par la glycolyse) dans les cellules du CSTN en réponse au traitement, malgré que l'on a observé une diminution de l'expression des gènes liés à la glycolyse (voir **Figure 4.4**). Cependant, il est possible que des

voies métaboliques connexes puissent être induites et faire diverger l'utilisation de glucose (eg. Voie du Pentose Phosphate (PPP)), ce qui pourrait moduler l'activité glycolytique des cellules sans changer la consommation de glucose.

Pour examiner plus en détails l'impact de l'inhibition d'EZH2 par UNC1999 sur le métabolisme du glucose, nous avons profilé les niveaux de métabolites intracellulaires dans les cellules Hs 578T en réponse au traitement avec UNC1999 (1 μ M, 96h). Les métabolites intracellulaires ont été purifiés à l'aide d'une extraction au méthanol tel que décrit précédemment (Gravel, Avizonis, and St-Pierre 2016). Ils ont ensuite été analysés et quantifiés en spectrométrie de masse suivant une chromatographie en phase liquide (LC-MS; pairage d'ions (*ion-pairing*)). L'analyse de spectrométrie de masse a été performée avec la collaboration de la plateforme de métabolomique du Goodman Cancer Institute (GCI) à l'université McGill. Les niveaux de métabolites obtenus par analyse spectrale ont été normalisés par le nombre de cellules respectives de chaque échantillon pour quantification. L'analyse de métabolomique a révélé une augmentation significative ($p < 0.05$) des niveaux globaux de métabolites issus des étapes initiales de la glycolyse (*glucose-6-phosphate* (G6P)), *fructose-1,6-bisphosphate* (F1,6-BP), *2,3-bisphosphoglyceric acid* (2,3-BPG)) (**Figure 4.5D**) et des métabolites issus de la synthèse de purine (*phosphoribosyl pyrophosphate* (PRPP), inosine monophosphate (IMP)) (**Figure 4.5E**) suite au traitement des cellules Hs 578T avec UNC1999. La synthèse de purines à partir du PRPP requière la disponibilité de Ribose-5-Phosphate (R5P) et l'activité du PPP, mais aucun changement significatif à la suite du traitement UNC1999 n'a été observé pour les métabolites du PPP (R5P et Ribulose-1,5-bisphosphate (R1,5P)) dans les cellules Hs 578T (**Figure 4.5F**). Cependant, il faut noter que la quantification globale des métabolites intracellulaires n'indique pas nécessairement une augmentation ou une diminution de l'abondance d'un métabolite donné. Par exemple, l'augmentation des niveaux d'un métabolite peut signifier que sa synthèse est accrue, ou que son utilisation est diminuée, résultant en son accumulation. Donc, il est possible que la voie du PPP soit augmentée, sans que l'on détecte une augmentation des niveaux globaux des métabolites du PPP. Pour les mêmes raisons, l'accumulation des métabolites dans la glycolyse pourrait indiquer soit que la glycolyse est augmentée ou alors que des métabolites de la glycolyse s'accumulent à cause d'une diminution de leur utilisation. Étant donné que les gènes de la glycolyse sont diminués après le traitement UNC1999 (**Figure 4.4**), cette dernière option est la plus probable.

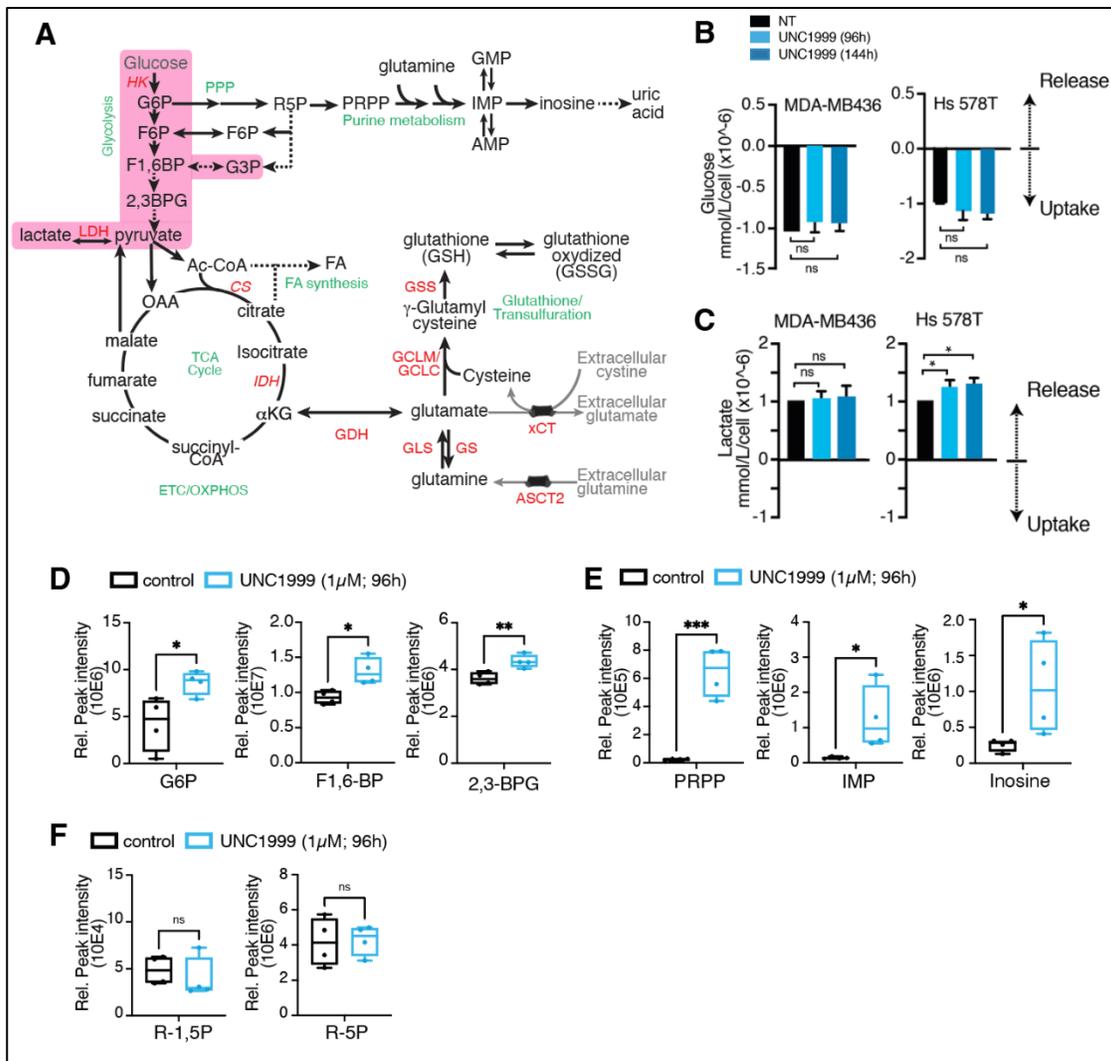


Figure 4.5: L'inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2 perturbe le métabolisme du glucose dans les cellules du CSTN.

A. Diagramme représentant les voies métaboliques principales du carbone central. Le nom des gènes est indiqué en rouge, les voies métaboliques en vert. La voie surlignée en rose est la voie de la glycolyse. **B.** Quantification des niveaux de glucose par BioNova© dans les milieux de culture conditionnés suite au traitement avec UNC1999 (1μM; 96 et 144h). Barres d'erreur : déviation standard; n=4; * p-value < 0.05; (unpaired t-test). **C.** Même analyse qu'en B pour le lactate. **D.** Quantification par LC-MS des métabolites intracellulaires de la glycolyse dans les cellules Hs 578T suite au traitement UNC1999 (1μM, 96h). Barres d'erreur : déviation standard; n=4; * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; *** p-value < 0.001 (unpaired t-test). **E.** Même analyse qu'en D pour les métabolites de la biosynthèse de purine. **F.** Même analyse qu'en D pour les métabolites du PPP.

En résumé, nous concluons donc que l'inhibition d'EZH2 dans les cellules du CSTN n'affecte pas la consommation de glucose mais pourrait changer son utilisation à travers la glycolyse. Comme décrit dans la discussion, des expériences supplémentaires (traçage par isotope

stable, profilage bioénergétique) seront nécessaires pour élucider complètement les reprogrammations du métabolisme du glucose par l'inhibition d'EZH2.

4.6) L'inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2 augmente la consommation de glutamine et change son utilisation dans les cellules CSTN.

Parce que l'inhibition d'EZH2 induit des changements dans l'expression de gènes qui encodent des enzymes régulant le métabolisme des acides aminés (**Figure 4.4**), nous avons voulu mesurer les changements de consommation et d'utilisation d'acides aminés à la suite de l'inhibition d'EZH2 (UNC1999; 1 μ M, 96 et 144h). Les milieux de culture conditionnés et naïfs obtenus à la suite de l'inhibition d'EZH2 dans les cellules MDA-MB436 et Hs 578T ont été analysés à l'aide de l'instrument BioNova400©. Nous observons que les deux lignées cellulaires étudiées absorbent une plus grande quantité de glutamine et sécrètent une plus grande quantité de glutamate que les cellules non-traitées après 96 et 144h suivant le traitement avec UNC1999 (**Figure 4.6A-B**). Nous avons aussi extrait les métabolites résiduels dans les milieux de culture conditionnés et naïfs, traités ou non avec UNC1999 (1 μ M, 96 et 144h) à l'aide d'une extraction au méthanol tel que décrit précédemment (Gravel, Avizonis, and St-Pierre 2016). Les métabolites isolés par LC-MS sur colonne IntradaAA (McGuirk et al. 2013), permettent la détection d'une vaste gamme d'acides aminés (en collaboration avec la plateforme de métabolomique du GCI, McGill). Nous observons une augmentation significative de la consommation de plusieurs acides aminés par les cellules du CSTN à la suite du traitement avec l'inhibiteur d'EZH2 (UNC1999) pour 96h, incluant une augmentation de la consommation de glutamine, d'aspartate, de cystine, de méthionine et leucine (**Figure 4.6C**).

L'augmentation de la consommation de glutamine pourrait signifier une utilisation accrue de cet acide aminé dans les diverses voies métaboliques qui sont alimentées par la glutamine, incluant la biosynthèse des purines et pyrimidines, la biosynthèse de glutathion (servant à la détoxification des espèces oxydées réactives (ROS) et à la réponse antioxydante), la biosynthèse d'acides aminés, ainsi que la production d'acide alpha-cétoglutarique, permettant l'utilisation de la glutamine comme source bioénergétique alimentant le cycle du TCA (**Figure 4.6D**, région bleues). De plus, la sécrétion du glutamate est souvent reliée à l'absorption de cystine, à travers un récepteur intégral membranaire contre-transporteur (x-CT), La cystine, peut par la suite être

utilisée par les cellules cancéreuses lors de stress ou de traitements cytotoxiques afin d'alimenter la biosynthèse du glutathion (GSH), qui permet la détoxification et la capacité antioxydante.

L'analyse des données de métabolomique intracellulaire LC-MS, décrites à la **Figure 4.5** a révélé une augmentation significative ($p < 0.05$) des niveaux d'acides aminés *branched chain* (valine, isoleucine) à la suite du traitement avec UNC1999 (**Figure 4.6E**). Nous observons aussi la diminution intracellulaire des acides aminés glutamine, α KG et lysine (**Figure 4.6F**), ce qui pourrait indiquer leur utilisation accrue pour alimenter des voies métaboliques alternatives. En particulier, cette observation est intéressante pour la glutamine dont les niveaux globaux sont diminués dans les cellules à la suite du traitement avec UNC1999 alors que les cellules consomment plus de glutamine à la suite du traitement. Nos résultats suggèrent donc une augmentation de la consommation et de l'utilisation de glutamine à la suite du traitement par UNC1999 dans les CSTN.

Nous avons ensuite fait une expérience de traçage métabolomique de la glutamine pour étudier des changements possibles dans l'utilisation intracellulaire de la glutamine à la suite du traitement avec UNC1999 dans les cellules Hs 578T. Les cellules ont été exposées à un milieu de culture où la glutamine a été remplacée par une glutamine dont les 5 carbones sont marqués au carbone-13 ($^{13}\text{C}_5$ -glutamine), augmentant donc la masse de ce métabolite de 5 unités. Les métabolites intracellulaires ont été extraits après 30 minutes, 2h ou 6h d'exposition avec la glutamine marquée dans les cellules Hs 578T préalablement traitées ou non avec UNC1999 ($1\mu\text{M}$) pour 96h. Les métabolites extraits pour chacun des temps ont été analysés par LC-MS (*ion pairing*, centre de métabolomique, GCI, McGill). La distribution des isotopomères de masse des métabolites en aval de la glutamine à travers différentes voies métaboliques alimentées par la glutamine nous permet d'identifier les changements dans l'utilisation de la glutamine par les cellules à la suite de l'inhibition d'EZH2 (**Figure 4.6G**). L'analyse des résultats de traçage en LC-MS nous a permis d'identifier une augmentation du marquage du glutamate ($m+5$) et de l' α KG ($m+5$) après 30 minutes d'exposition à la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine (**Figure 4.6H**). Ces résultats suggèrent donc une augmentation de l'utilisation de la glutamine pour la synthèse de glutamate et α KG, ce qui indique une augmentation de la glutaminolyse. Puisque que les niveaux globaux d' α KG sont diminués dans les cellules à la suite de l'inhibition d'EZH2 (**Figure 4.6F**), ce résultat de traçage suggère que l'augmentation de la glutaminolyse pourrait permettre une utilisation accrue

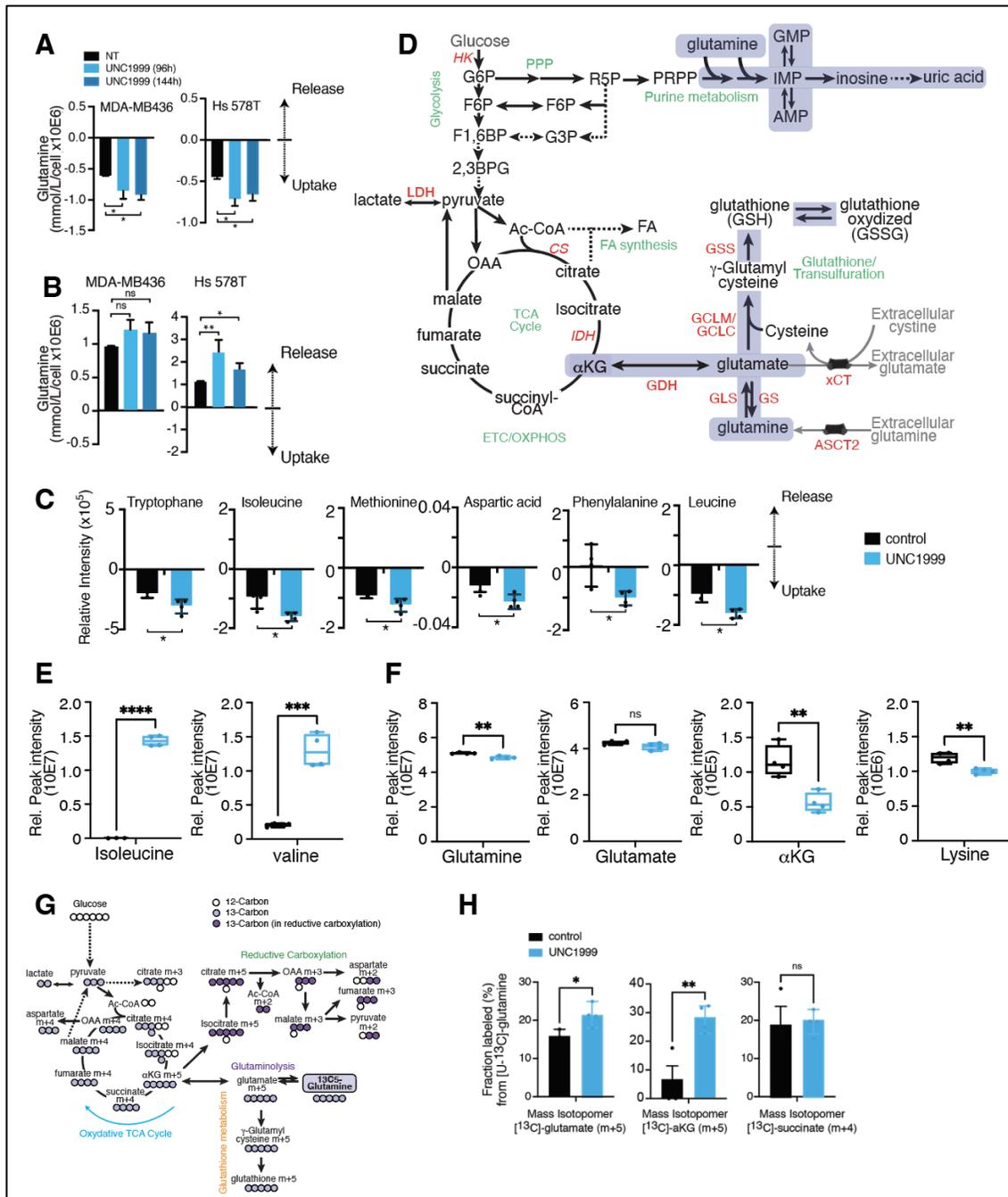


Figure 4.6: L'inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2 augmente la consommation de glutamine et module son utilisation dans les cellules du CSTN.

A. Quantification des niveaux de la glutamine par BioNova© dans les milieux de culture conditionnés à la suite du traitement avec UNC1999 (1 μ M; 96 et 144h). Barres d'erreur : déviation standard; n=4; * p-value < 0.05; (t-test non-couplé). **B.** Même analyse qu'en A pour le glutamate. **C.** Diagramme représentant les voies métaboliques principales du carbone central. Le nom des gènes est indiqué en rouge, les voies métaboliques en vert. Les voies surlignées en bleu indiquent les voies utilisant la glutamine. **D.** Quantification par LC-MS (IntradaAA) des métabolites présents dans les milieux conditionnés à la suite du traitement UNC1999 (1 μ M, 96h) dans les cellules Hs

578T. Barres d'erreur: déviation standard; * p-value < 0.05 (t-test non-couplé). **E.** Quantification par LC-MS des métabolites intracellulaire d'acides aminés *branched chain* dans les cellules Hs 578T suite au traitement UNC1999 (1µM, 96h). Barres d'erreur : déviation standard; n=4; * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; *** p-value < 0.001 (t-test non-couplé). **F.** Même analyse qu'en E pour les métabolites en aval de la glutamine. **G.** Schéma représentant le marquage des isotopomères en aval de la glutamine par suite du traçage avec ¹³C5-glutamine. **H.** Quantification de l'incorporation du ¹³-C dans les isotopomères de la voie de la glutaminolyse à la suite de l'analyse par LC-MS *ion pairing*. Barres d'erreur : déviation standard; n=4; * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01 (t-test non-couplé).

de l'αKG pour alimenter le cycle du TCA. Il sera intéressant d'étudier le marquage d'autres isotopomères en aval de la glutamine et du αKG pour identifier les voies métaboliques auxquelles la glutamine contribue lorsqu'EZH2 est inhibé. De plus, la glutamine est une source d'azote pour la synthèse de purines et pyrimidines avec PRPP (**Figure 4.6C**). C'est donc impossible d'identifier la contribution de la glutamine dans la formation de purines et pyrimidines avec cette expérience car la glutamine est marquée sur les carbones. Il serait intéressant de performer un traçage d'isotopomères avec une glutamine marquée sur l'azote (¹⁵N) pour d'étudier la contribution de la glutamine dans la synthèse de purines et pyrimidines à la suite de l'inhibition d'EZH2.

4.7) L'inhibition d'EZH2 change la sensibilité des cellules du CSTN aux modulations du métabolisme du glucose et de la glutamine.

Nos résultats de séquençage d'ARN et de métabolomique à la suite de l'inhibition d'EZH2 dans les cellules CSTN ont montré une diminution d'expression des gènes de la glycolyse et une accumulation des métabolites glycolytiques. L'inhibition d'EZH2 pourrait perturber la glycolyse dans les cellules du CSTN, et rendre les cellules moins dépendantes au glucose. Afin de tester cette hypothèse, nous avons cultivé des cellules du CSTN (Hs 578T et MDA-436) dans un milieu de culture complet (4.5g glucose/L) ou dans un milieu pauvre en glucose (0.225g glucose/L). À l'aide d'essais de viabilité par crystal violet, nous avons observé qu'alors que les cellules non-traitées sont très sensibles à la déprivation de glucose, l'inhibition d'EZH2 par UNC1999 (1µM, 96h) diminue la sensibilité des cellules à la privation de glucose (**Figure 4.7A**). Cette protection contre les perturbations de la glycolyse par l'inhibition d'EZH2 est aussi observée avec le composé Bay-876, un inhibiteur du transporteur de glucose-1 (GLUT-1), car le traitement avec UNC1999 ou EPZ-6438 diminuent la sensibilité à l'inhibition de GLUT-1 par Bay-876 (**Figure 4.7 B**). Nous

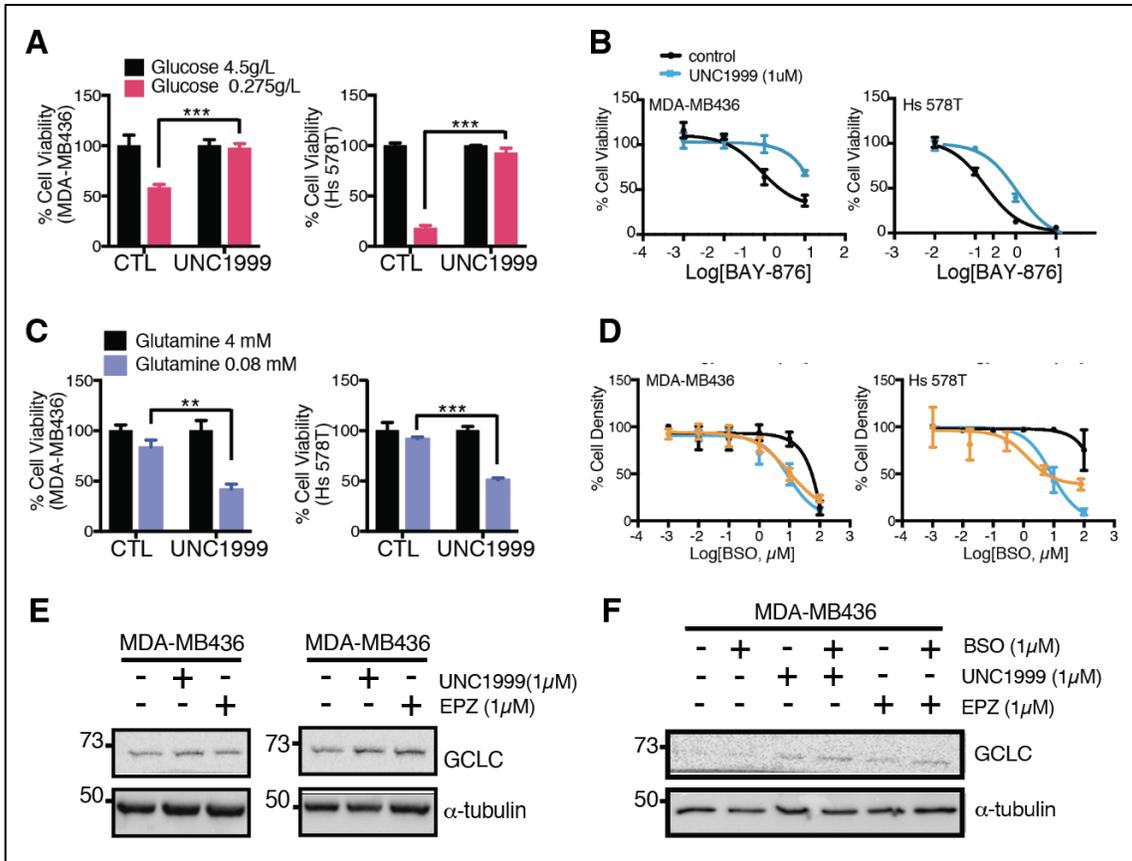


Figure 4.7: L'inhibition d'EZH2 change la sensibilité des cellules du CSTN aux modulations du métabolisme du glucose et de la glutamine.

A. Mesure de la viabilité par crystal violet à la suite du traitement des cellules MDA-MB-436 (gauche) et Hs 578T (droite) avec UNC1999 (1μM; 96 et 144h) exposées à des milieux de culture complets (4.5g/L) ou privés de glucose (0.275g/L). Barres d'erreur : déviation standard; n=4; * p-value < 0.05; (paired student t-test). **B.** Mesure des changements de viabilité des cellules MDA-MB-436 et Hs 578T traitées ou non avec UNC1999 (1μM, 96h) en réponse à une gamme de doses de l'inhibiteur de GLUT-1 (Bay-876). Barres d'erreur : déviation standard; n=4. **C.** Même analyse qu'en A pour les cellules exposées à des milieux privés de glutamine (4mM vs 0.8mM). **D.** Même analyse qu'en B pour le traitement avec une gamme de doses de Buthionine Sulfoximine (BSO) avec ou sans UNC1999 (1μM; 96h) ou EPZ-6438 (1μM; 96h). **E.** Immunobavardage (*western blot*) démontrant les niveaux protéiques de GCLC dans les cellules MDA-MB-436 et Hs 578T exposées à UNC1999 (1μM; 96h) ou EPZ-6438 (1μM; 96h). Alpha-tubulin est utilisé comme contrôle interne. **F.** Immunobavardage (*western blot*) montrant les niveaux protéiques de GCLC dans les cellules MDA-MB-436 exposées à BSO (1μM; 72h) et UNC1999 (1μM; 96h) ou EPZ-6438 (1μM; 96h). Alpha-tubulin est utilisé comme contrôle de chargement.

concluons donc que l'inhibition pharmacologique d'EZH2 diminue la dépendance au glucose dans les cellules du CSTN.

Nos résultats de transcriptomique et métabolomique indiquaient aussi une augmentation de l'expression des gènes du métabolisme des acides aminés et une augmentation de la consommation de glutamine et de la glutaminolyse à la suite du traitement avec UNC1999, ce qui pourrait suggérer une dépendance accrue pour ce métabolite à la suite de l'inhibition pharmacologique d'EZH2. Pour tester cette hypothèse, nous avons cultivé les cellules de CSTN (MDA-MB-436 et Hs 578T) dans des milieux de culture complets (4mM) ou dans des milieux faibles en glutamine (0.08mM). À l'aide d'essais de viabilité par crystal violet, nous avons observé que l'inhibition pharmacologique d'EZH2 par UNC1999 (1µM, 96h) augmente la sensibilité des cellules à la privation de glutamine (**Figure 4.7C**). Nous observons aussi une augmentation de la sensibilité des cellules du CSTN aux inhibiteurs de la biosynthèse du glutathion (un métabolite dont la production requiert la glutamine) avec un inhibiteur de *Glutathione Citrate Lyase* (GCLC/GCLM), le BSO (**Figure 4.7D**), à la suite de l'inhibition pharmacologique d'EZH2. Nous observons d'ailleurs une légère augmentation des niveaux protéiques de GCLC à la suite du traitement avec UNC1999 (1µM, 96h), ce qui pourrait contribuer à la sensibilité accrue au BSO (**Figure 4.7E**). En résumé, nos observations indiquent que l'inhibition d'EZH2 augmente la dépendance des cellules du CSTN pour la glutamine et sensibilisent à la perturbation du métabolisme de la glutamine, alors qu'elle diminue la dépendance des cellules pour le glucose.

4.8) Le facteur de transcription *Estrogen-Related Receptor-alpha* (ERR α) contribue en partie aux changements métaboliques résultant de l'inhibition d'EZH2 dans les cellules du CSTN.

Puisque nos résultats suggèrent une augmentation de la dépendance à la glutamine et une diminution de la dépendance au glucose lors de l'inhibition d'EZH2 dans les cellules du CSTN, nous avons voulu comprendre les mécanismes qui régulent cette transition métabolique. Nous avons utilisé des données existantes de séquençage d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP-seq) profilant la marque épigénétique H3K27me3 dans les cellules MDA-MB-436 et dans une PDX issue de tumeur du CSTN (Deblois et al. 2020), pour voir si les gènes régulant les voies métaboliques affectés par l'inhibition d'EZH2 (en RNA-seq) pourraient être directement régulés par cette modification épigénétique. Même si nous observons la marque H3K27me3 au promoteur de certains des gènes codant pour les enzymes métaboliques régulant les voies identifiées (ex. *Lactate Dehydrogenase B* (LDHB), *Glutamate Amonia Lygase* (GLUL), *Solute Carrier Family 6 member 1* (SLC6A1)) (**Figure 4.8A**), plusieurs autres gènes impliqués dans les voies métaboliques

altérées par l'inhibition d'EZH2 ne possèdent pas de marque H3K27me3 à leur promoteur. H3K27me3 pourrait aussi contrôler ces gènes par d'autres régions plus distales. Cependant, ces observations suggèrent un mécanisme plus global de régulation transcriptionnelle des gènes métaboliques à la suite de l'inhibition d'EZH2. Nous avons donc étudié l'enrichissement de sites de liaison de facteurs de transcription dans les séquences des promoteurs des gènes métaboliques induits à la suite de l'inhibition pharmacologique d'EZH2 dans les cellules du CSTN (-800 à +200 paires de bases autour du site d'initiation de la transcription des gènes issus de la **Figure 4.4B-C**, fonctions de bêta-oxydation des acides gras, métabolisme des xénobiotiques, métabolisme du cholestérol, et le métabolisme des acides aminés). Nous avons utilisé les séquences des promoteurs accessibles par ATAC-seq dans ces cellules de CSTN et de PDX (Deblois et al. 2020) comme contrôle pour identifier l'enrichissement de sites de liaison pour les facteurs de transcription dans les promoteurs des gènes métaboliques à l'aide de l'outil Homer (findmotif.pl, version 4.4 (Heinz et al. 2010)). Nous avons identifié que les facteurs de transcription LEF1, FOXF2, CHX10, FOXM1, ESRRA, POU2F1 et PBX1 (**Figure 4.8B**) sont enrichis dans les promoteurs des gènes métaboliques régulés par l'inhibition pharmacologique d'EZH2. L'accessibilité de ces sites de recrutement des facteurs de transcription est augmentée suite au traitement avec les inhibiteurs d'EZH1/EZH2. Même si plusieurs de ces facteurs peuvent être reliés au métabolisme cellulaire, nous nous sommes intéressés au facteur *Estrogen-Related Receptor-alpha* (ERR α) étant donné sa fonction connue dans la régulation du métabolisme cellulaire des cellules de cancer du sein, incluant la régulation de la glutaminolyse (Deblois and Giguère 2013).

Une étude antérieure avait rapporté une augmentation de l'expression de ERR α à la suite de l'inhibition de EZH2 par EPZ-6438 dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein (Kumari et al. 2018). L'inhibition pharmacologique d'EZH2 par UNC1999 ou EPZ-6438 (1 μ M, 96h) n'augmente pas les niveaux de la protéine ERR α dans les cellules MDA-MB-436 et les augmente très faiblement dans les Hs 578T, où les niveaux de base sont faibles (**Figure 4.8C**). Nous avons ensuite examiné si ERR α joue un rôle dans la régulation des effets métaboliques résultants de l'inhibition pharmacologique d'EZH2 dans les cellules du CSTN. Nous avons déplété la protéine ERR α à l'aide d'un ARN d'interférence de type siARN ciblant spécifiquement le transcrit de ESRRA (le gène codant pour ERR α) dans les cellules MDA-MB-436 et Hs 578T. Nous avons validé que la transfection avec le siERR α induit la diminution (dégradation) de la protéine ERR α dans les cellules Hs 578T et MDA-MB436 comparativement à la transfection avec

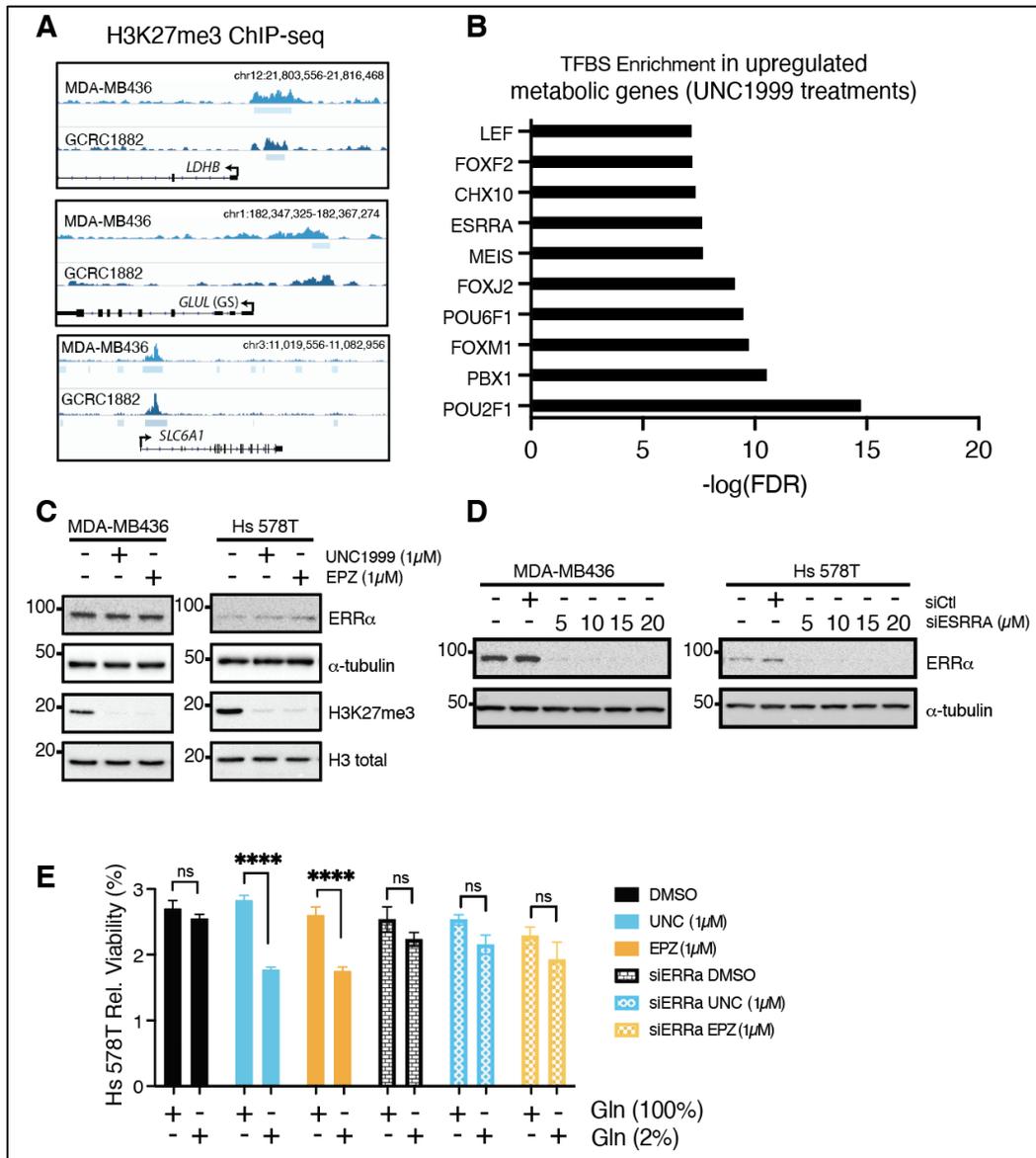


Figure 4.8: Le facteur de transcription *Estrogen-Related Receptor-alpha* (ERR α) contribue, en partie, aux changements métaboliques résultant de l'inhibition d'EZH2 dans les cellules du CSTN.

A. Représentation graphique des immunoprécipitations de chromatine pour H3K27me3 dans les cellules MDA-MB-436 (bleu clair) ou PDX de CSTN (bleu foncé) sur des régions génomiques couvrant des promoteurs de gènes métaboliques dont l'expression est augmentée avec l'inhibition d'EZH2. Les régions génomiques sont indiquées selon l'assemblage du génome humain hg38. **B.** Graphique représentant l'enrichissement (Homer Findmotif.pl, version 4.4 (Heinz et al. 2010) de sites de liaison de divers facteurs de transcription dans les séquences des promoteurs des gènes métaboliques dont l'expression est changée avec le traitement UNC1999 dans les cellules du CSTN (en RNA-seq). **C.** Immunobuvardages (*western blot*) démontrant les niveaux protéiques de ERR α et de H3K27me3 dans les cellules MDA-MB-436 et Hs 578T exposées à UNC1999 (1 μ M; 96h) ou EPZ-6438 (1 μ M; 96h). Alpha-tubuline et H3 total sont utilisés comme contrôle interne. **D.** Immunobavardages (*western blot*) démontrant les niveaux protéiques de ERR α et de

H3K27me3 dans les cellules MDA-MB-436 et Hs 578T transfectées avec le si-ARN ciblant le gène *ESRRA* ($ERR\alpha$). Alpha-tubuline est utilisé comme contrôle interne. **E.** Mesure de la viabilité par crystal violet dans les cellules Hs 578T exposées à différents niveaux de glutamine dans le milieu de culture et transfectées ou non avec le siESRRA et prétraitées ou non avec UNC1999 (1 μ M; 96h) ou EPZ-6438 (1 μ M; 96h). Barres d'erreur : déviation standard; (2way ANOVA corrigé pour comparaison multiples avec Test de Tukey); n=4; **** p-value < 0.001.

le contrôle (siC) (**Figure 4.8D**). Nous avons ensuite effectué un test de viabilité sur les cellules traitées ou non avec l'inhibiteur d'EZH2 UNC1999 (1 μ M, 96h) ou EPZ-6438 (1 μ M, 96h) dans un milieu faible en glutamine, en présence ou en absence de du siERR α . Nous avons observé que la déplétion d'ERR α prévient partiellement l'effet de UNC1999 sur la dépendance accrue à la glutamine dans les cellules du CSTN (**Figure 4.8E**). Ce résultat suggère qu'ERR α pourrait contribuer à la réponse métabolique des cellules du CSTN lors de l'inhibition d'EZH2. Cependant, le rôle potentiel d'ERR α dans la diminution de la dépendance au glucose à la suite de l'inhibition d'EZH2 devrait aussi être examiné. Ces résultats préliminaires devront être validées dans d'autres contextes cellulaires et à l'aide d'autres siARN ciblant ERR α et avec un inhibiteur de ERR α (ex. le Composé 29, C29) (Deblois et al. 2016).

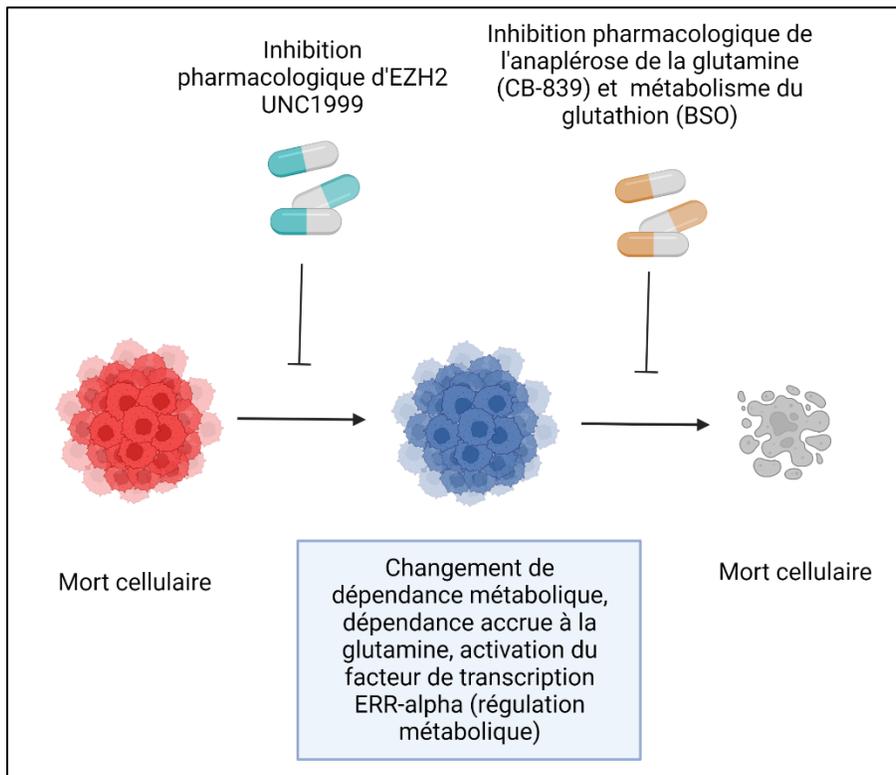


Figure 4.9: Schéma représentant les conclusions principales des résultats obtenus pour ce projet de recherche.

Chapitre 5 : Discussion

Dans ce mémoire, nous avons étudié une fonction potentielle de la méthyltransférase EZH2 dans la régulation du métabolisme cellulaire des cellules de cancer du sein triple-négatifs. Nous avons observé une expression élevée du gène codant pour EZH2 spécifiquement dans les tumeurs du sein de type Basales. Nous observons que son expression est associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs du sein Basales et Luminales B. Nous avons ensuite montré que l'inhibition pharmacologique de l'activité enzymatique de EZH2 (qui diminue les marques de H3K27me3) à l'aide de l'inhibiteur double UNC1999, entraîne des changements d'expression des gènes qui sont associées à des fonctions métaboliques, malgré le fait qu'aucun effet n'est observé sur la croissance et la survie des cellules ou des tumeurs. Il serait intéressant d'étudier des marqueurs d'apoptose ou autre mécanisme de mort cellulaire ou d'arrêt prolifératif afin de bien étudier le mécanisme qui impacte la viabilité ces cellules suite au traitement avec les inhibiteurs. En particulier, nous avons observé une augmentation de l'expression des gènes contrôlant le métabolisme du cholestérol, des acides gras et des acides aminés alors qu'une diminution des gènes régulant la glycolyse est observée à la suite du traitement des cellules du CSTN avec l'inhibiteur UNC1999. Les études de métabolomique en spectrométrie de masse ont suggéré une reprogrammation métabolique des cellules du CSTN à la suite du traitement avec l'inhibiteur UNC1999, caractérisée par une diminution de la dépendance au glucose (et possiblement de la glycolyse) et une augmentation de la dépendance à la glutamine et au métabolisme de la glutamine. Nous avons ensuite montré que les changements métaboliques résultant de l'inhibition pharmacologique de l'activité enzymatique d'EZH2 crée une nouvelle vulnérabilité métabolique dans les cellules de CSTN. Finalement nous avons avancé l'hypothèse que le facteur de transcription *Estrogen-Related Receptor-alpha* (ERR α) pourrait jouer un rôle mécanistique dans cette réponse, en contrôlant les changements métaboliques résultant de l'inhibition de l'activité d'EZH2 (**Figure 5.1**)

L'étude présentée dans ce mémoire suggère pour la première fois un rôle métabolique pour EZH2 dans les modèles de cancer du sein. Plusieurs éléments et mécanismes soutenant cette fonction demeurent à élucider et sont décrits ci-dessous.

5.1) EZH2 joue un rôle important dans le cancer du sein triple négatif.

5.1.1) Les niveaux d'EZH2 (et non EZH1) sont associés à un mauvais pronostic dans les cancers du sein de sous-type triple-négatifs

Tel que rapporté à la **Figure 4.1** de ce mémoire, les niveaux d'expression d'EZH2 sont significativement plus élevés dans les cancers du sein de sous-type Basal (enrichis pour les tumeurs du CSTN) que dans les autres sous-types de cancer du sein. Il est à noter que l'expression d'EZH1, une méthyltransférase paralogue qui peut substituer EZH2 dans le complexe PRC2 est plus significativement élevée dans les tumeurs lumineales (Luminal A) que dans les autres sous-types et que son expression est inversement corrélée à celle d'EZH2 dans les cancers du sein. L'expression anti-corrélée de EZH2 et EZH1 pourrait suggérer que les deux protéines assurent l'activité enzymatique de méthyltransférase dans le complexe PRC2 et pourraient être interchangeable. Cependant, les analyses présentées à la **Figure 4.2** suggèrent qu'alors qu'une expression élevée d'EZH2 est associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs Basales, tel n'est pas le cas pour l'expression élevée d'EZH1, qui est quant à elle associée à un bon pronostic dans les tumeurs Luminales B (tout comme SUZ12). Cette observation suggère que EZH2 et EZH1 pourraient donner lieu à différentes fonctions du complexe PRC2, tel que préalablement suggéré (X. Shen et al. 2008). Comme notre étude utilise principalement la molécule UNC1999, qui inhibe à la fois l'activité de EZH2 et EZH1, il serait important de répéter les expériences d'expression génique, de métabolomique et de survie avec des inhibiteurs spécifiques de l'activité de EZH2 (ex. EPZ-6438, GSK-126) ou en utilisant des siARN contre EZH2 ou EZH1 afin de bien comprendre le rôle spécifique que joue chacune de ces enzymes dans les mécanismes métaboliques rapportés ici et d'évaluer si EZH1 contribue aussi aux observations rapportées dans ce projet.

5.1.2) Le rôle d'EZH2 dans le contrôle du métabolisme cellulaire dans un contexte PRC2-dépendant et PRC2-indépendant.

Des études préalables ont rapporté des fonctions d'EZH2 qui sont indépendantes de son activité de méthyltransférase et du complexe PRC2. Notre étude utilise des inhibiteurs pharmacologiques de la fonction enzymatique (méthyltransférase) d'EZH2 (UNC1999, EPZ-6438) afin de bloquer son activité dans les modèles du CSTN utilisés. L'utilisation des inhibiteurs dans notre étude suggère que l'activité enzymatique de méthyltransférase d'EZH2 est requise pour les changements métaboliques observés dans cette étude. Cependant, des données de d'autres

membres du laboratoire indiquent que les traitements avec ces inhibiteurs n'affectent pas la stabilité et les niveaux protéiques d'EZH2 dans les cellules du CSTN. C'est donc possible que certains effets métaboliques observés soient aussi reliés à l'activité résiduelle non-canonique d'EZH2 (indépendante de PRC2 et de son activité de méthyltransférase). De plus, à la **Figure 4.2** nous avons noté que l'expression d'aucun autre membre du complexe PRC2 n'est associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs Basales. Pour la suite de ce projet, il sera important d'examiner plus en détail les rôles PRC2-dépendants et indépendants de EZH2 dans les CSTN, à l'aide d'inhibiteurs du complexe PRC2 (inhibiteur EED A-395 (Y. He et al. 2017)), d'ARN d'interférence ciblant spécifiquement EZH2, ainsi que des siARN ciblant les unités structurales et essentielles du complexe PRC2 (eg. SUZ12). Même si le rôle d'EZH2 est habituellement associé à la modification épigénétique H3K27me3, de nombreuses études récentes ont décrit ce rôle PRC2-indépendant d'EZH2, incluant dans les tumeurs du sein de type Basal (Lawrence and Baldwin 2016). Cet aspect devra être adressé en détail pour permettre une compréhension complète du rôle d'EZH2 dans la régulation du métabolisme des cancer du sein.

5.2) La méthyltransférase EZH2 joue un rôle dans la régulation du métabolisme des CSTN.

Cette étude met en lumière un rôle de la méthyltransférase EZH2 dans la régulation du métabolisme cellulaire des cellules Basales du CSTN. Les données présentées ici suggèrent une perturbation du métabolisme du glucose et une augmentation de la dépendance à la glutamine à la suite de l'inhibition pharmacologique de l'activité de EZH2 par la molécule UNC1999 dans les cellules de CSTN.

5.2.1) La régulation de la glycolyse par EZH2 dans les CSTN

Les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent une perturbation de la glycolyse dans les cellules du CSTN suite à l'inhibition pharmacologique d'EZH2 avec UNC1999. La diminution de l'expression des gènes et l'accumulation des métabolites de la glycolyse pourraient suggérer une diminution de l'activité glycolytique qui créerait l'accumulation des métabolites intermédiaires de la glycolyse car ils seraient moins utilisés. Aussi, comme la consommation de glucose n'est pas affectée par l'inhibition d'EZH2, c'est possible qu'il soit métabolisé vers des voies divergentes à la glycolyse (ex. le PPP). Des expériences de traçage métabolomique avec du glucose marqué au carbone-13 (traçage avec isotope stable) permettraient d'explorer cette

possibilité et d'identifier les changements potentiels dans l'utilisation des molécules de glucose par les cellules du CSTN lors de l'inhibition d'EZH2. Nos résultats suggèrent qu'une transition entre une dépendance au glucose vers une dépendance accrue à la glutamine pourrait avoir lieu lors du traitement avec un inhibiteur EZH2. Cependant, des expériences de profilages bioénergétiques par *Seahorse® BioFX Analyzer* permettant de mesurer l'activité glycolytique, en plus des traçages d'isotopes stables de glucose et de glutamine seraient nécessaires pour étudier plus en détails les changements d'activité glycolytique et la transition vers une dépendance à la glutamine à la suite de l'inhibition d'EZH2 dans les cellules du CSTN. Étant donné la grande dépendance des tumeurs du CSTN pour le métabolisme du glucose, l'étude de la régulation de cette voie par EZH2 pourrait être d'une grande importance.

5.2.2) L'augmentation de la dépendance à la glutamine à la suite de l'inhibition pharmacologique d'EZH2 dans les CSTN

L'augmentation de la dépendance à glutamine observée dans les cellules du CSTN traitées avec l'inhibiteur EZH2 suggère une nouvelle vulnérabilité métabolique induite suite au traitement. Même si la glutamine est un nutriment essentiel dans les milieux de culture des cellules cancéreuses *in vitro*, son rôle au sein des tumeurs solides *in vivo* est moins clair. Il a été montré que l'augmentation de la glutaminolyse peut jouer un rôle dans la croissance et la résistance aux thérapies dans les cancers du sein (Deblois et al. 2016, 2020) et l'inhibiteur de glutaminase (CB-839) est présentement en étude clinique dans les CSTN (phase2) (DeMichele et al. 2016). Pour ces raisons, il sera éventuellement important de tester la synergie entre l'inhibition de la glutaminolyse par CB-839 et l'inhibition d'EZH2 dans différents modèles de CSTN, incluant sur des modèles de CSTN *in vivo* (ex. PDX ou modèles murins). Il est à noter que d'autres études récentes ont aussi rapporté cette synergie entre l'inhibition d'EZH2 et l'inhibition de la glutaminolyse (Gu et al. 2019; Liu et al. 2021). À notre connaissance, notre étude est la première à rapporter une interaction entre l'inhibition d'EZH2 et de la synthèse du glutathion.

5.2.3) La régulation des voies métaboliques alimentées dépendantes à la glutamine par EZH2 dans les CSTN

En plus de la régulation de la consommation de glutamine et la régulation de la glutaminolyse, notre étude a identifié d'autres voies métaboliques alimentées par la glutamine qui pourraient être modulées à la suite de l'inhibition d'EZH2 dans les CSTN. En effet, nous avons

observé des augmentations de l'expression des gènes régulant le métabolisme des acides aminés ainsi que le cycle du TCA. Nous avons aussi observé une augmentation des métabolites intermédiaires de la synthèse des purines et pyrimidines. Toutes ces voies métaboliques utilisent la glutamine et pourraient contribuer aux effets métaboliques observés à la suite de l'inhibition pharmacologique d'EZH2. Le traçage d'isotope stable de la glutamine marquée dans les voies du cycle du TCA, de la synthèse d'acides aminés et de la glutamine marquée au 15-N dans les voies de la synthèse de purine et pyrimidine pourraient permettre d'identifier les changements d'utilisation de la glutamine vers ces autres voies métaboliques à la suite de l'inhibition d'EZH2 dans les cellules du CSTN.

5.2.4) La régulation d'autres voies métaboliques à la suite de l'inhibition d'EZH2 dans les CSTN

Nos données de transcriptomique générées à la suite de l'inhibition pharmacologiques d'EZH2 dans les cellules CSTN suggèrent un rôle d'EZH2 dans la régulation du métabolisme du cholestérol et des acides gras. Ces fonctions ont déjà été rapportées pour l'activité d'EZH2 dans d'autres modèles de cancers (Wan et al. 2018). Considérant l'importance du métabolisme des acides gras et du cholestérol dans les tumeurs et cellules de cancer, incluant les CSTN, il serait intéressant d'investiguer un rôle potentiel d'EZH2 dans cette régulation dans les CSTN.

5.2.5) L'importance d'étudier les changements métaboliques dans différents modèles.

La reprogrammation métabolique induite par l'inhibition pharmacologique d'EZH2 avec UNC1999 devra être profilée dans d'autres lignées cellulaires afin d'obtenir un portrait complet des changements métaboliques résultant de l'inhibition d'EZH2 et pour évaluer la reproductibilité des changements observés dans les cellules Hs 578T et MDA-MB-436. Comme il a été préalablement rapporté que les cellules Hs 578T possèdent une activité métabolique de base très glycolytique (Q. Wu et al. 2020), il est possible que les changements observés à la suite du traitement avec UNC1999 diffèrent dans des cellules du CSTN possédant un profil métabolique de base plus oxydatif. Tel que mentionné plus haut, il faudra aussi valider ces résultats dans des modèles de CSTN *in vivo* puisqu'il est connu que les conditions de culture *in vitro* affectent les profils métaboliques (et épigénétiques) des cellules cancéreuses.

5.3) La régulation mécanistique et transcriptionnelle des changements métaboliques en réponse à l'inhibition d'EZH2

Dans cette étude, nous avons identifié des facteurs de transcription dont les sites de liaison sont enrichis dans les promoteurs des gènes métaboliques modulés à la suite de l'inhibition pharmacologique d'EZH2. Notre hypothèse était que l'inhibition d'EZH2 permettrait l'accessibilité de ces promoteurs et le recrutement des facteurs de transcription les régulant. Cependant, nous n'avons pas observé des marques H3K27me3 sur tous les promoteurs de gènes métaboliques identifiés, ce qui suggère que l'activité métabolique résultant de l'inhibition d'EZH2 pourrait se faire à travers un mécanisme plus global (e. un facteur commun régulant le métabolisme). Étant donné le rôle caractérisé de $ERR\alpha$ dans la régulation du métabolisme de la glutamine dans le cancer du sein (Deblois et al. 2016; McGuirk et al. 2013), nous avons concentré nos efforts sur ce facteur de transcription. L'activité d' $ERR\alpha$ est aussi régulée par les coactivateurs PGC-1 alpha et beta, deux coactivateurs significativement associés à la régulation métabolique. Des études préalables ont aussi montré un lien entre l'inhibition d'EZH2 et l'expression des PGCs (Allison et al. 2020), et nous observons une induction des transcrits de PGC1 β dans nos données d'expression transcriptionnelles en réponse à UNC1999 ainsi qu'une accumulation de la marque H3K27me3 à son promoteur (données non présentées). Ceci pourrait suggérer un rôle pour $ERR\alpha$ -PGC dans le mécanisme de régulation métabolique résultant de l'inhibition pharmacologique d'EZH2.

Les autres facteurs de transcription identifiés par notre analyse ont aussi des rôles rapportés dans le contrôle du métabolisme cellulaire dans divers contextes, ce qui pourrait justifier d'étudier leur contribution à la reprogrammation métabolique à la suite du traitement avec UNC1999 dans les cellules du CSTN. Éventuellement, une expérience de séquençage d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP-seq) pour ces facteurs de transcription dans les cellules traitées ou non avec l'inhibiteur d'EZH2 serait nécessaire afin de révéler leur recrutement aux promoteurs des gènes métaboliques à la suite de l'inhibition d'EZH2.

5.4) L'utilisation des inhibiteurs d'EZH2 pour bloquer la progression des tumeurs du CSTN.

Jusqu'à maintenant, l'inhibiteur d'EZH2 EPZ-4836 est la seule molécule inhibitrice de méthyltransférase cliniquement approuvée pour le traitement des lymphomes folliculaires récidivants ou réfractaires (Morschhauser et al. 2020). Son utilisation dans d'autres types de tumeurs suscite donc beaucoup d'intérêt. Des études préalables ont suggéré l'efficacité des inhibiteurs d'EZH2 en combinaison avec les traitements de chimiothérapie dans les tumeurs du CSTN résistantes aux traitements (Deblois et al. 2020; Marsolier et al. 2022). Une meilleure compréhension des effets de ces molécules sur le métabolisme des cellules cancéreuses est donc nécessaire. De plus, plusieurs inhibiteurs du métabolisme cellulaire sont présentement testés en clinique, incluant pour le CSTN (ex. CB-839) (phase 2). L'étude de perturbations épigénétiques ayant le potentiel de sensibiliser les cellules du CSTN aux inhibitions du métabolisme cellulaire a donc une très grande importance. Finalement, des études pré-cliniques *in vivo* seraient nécessaires afin de valider les découvertes et synergies rapportés dans ce mémoire.

Chapitre 6 : Conclusion

Dans ce projet de maîtrise, nous avons caractérisé pour la première fois le rôle de la méthyltransférase EZH2 dans la régulation du métabolisme cellulaire du cancer du CSTN. Nous avons découvert que l'inhibition pharmacologique de l'activité enzymatique d'EZH2 augmente la dépendance à la glutamine et induit une vulnérabilité métabolique à l'inhibition des voies métaboliques qui sont alimentées par la glutamine (ex. synthèse du glutathion), alors qu'elle protège les cellules contre la déprivation de glucose. Ces voies métaboliques ont une importance primordiale dans la croissance des tumeurs du CSTN. Cependant les inhibiteurs ciblant le métabolisme cellulaire n'ont démontré que des résultats mitigés en tumeurs (incluant pour les CSTN) jusqu'à maintenant. Il serait donc d'un grand intérêt de caractériser plus en détails les reprogrammations métaboliques résultant de l'inhibition pharmacologique d'enzymes épigénétiques comme EZH2 dans les CSTN afin de comprendre comment elles peuvent être utilisées pour augmenter l'efficacité des inhibiteurs du métabolisme cellulaire.

Bibliographie

- Alabdulkareem, Hanan, Tiffany Pinchinat, Sarah Khan, Alyssa Landers, Paul Christos, Rache Simmons, and Tracy-Ann Moo. 2018. "The Impact of Molecular Subtype on Breast Cancer Recurrence in Young Women Treated with Contemporary Adjuvant Therapy." *The Breast Journal* 24 (2): 148–53.
- Albert, Mareike, and Kristian Helin. 2010. "Histone Methyltransferases in Cancer." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21 (2): 209–20.
- Allison, Kimberly H., M. Elizabeth H. Hammond, Mitchell Dowsett, Shannon E. McKernin, Lisa A. Carey, Patrick L. Fitzgibbons, Daniel F. Hayes, et al. 2020. "Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 38 (12): 1346–66.
- Almouzni, Geneviève, and Howard Cedar. 2016. "Maintenance of Epigenetic Information." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019372>.
- Anderson, Nicole M., Patrick Mucka, Joseph G. Kern, and Hui Feng. 2018. "The Emerging Role and Targetability of the TCA Cycle in Cancer Metabolism." *Protein & Cell* 9 (2): 216–37.
- Baldo, Brian A., and Nghia H. Pham. 2013. "Adverse Reactions to Targeted and Non-Targeted Chemotherapeutic Drugs with Emphasis on Hypersensitivity Responses and the Invasive Metastatic Switch." *Cancer Metastasis Reviews* 32 (3–4): 723–61.
- Bedard, Philippe L., Aaron R. Hansen, Mark J. Ratain, and Lillian L. Siu. 2013. "Tumour Heterogeneity in the Clinic." *Nature* 501 (7467): 355–64.
- Beld, Joris, D. John Lee, and Michael D. Burkart. 2015. "Fatty Acid Biosynthesis Revisited: Structure Elucidation and Metabolic Engineering." *Molecular BioSystems* 11 (1): 38–59.
- Berger, Luisa, Thomas Kolben, Sarah Meister, Theresa M. Kolben, Elisa Schmoeckel, Doris Mayr, Sven Mahner, Udo Jeschke, Nina Ditsch, and Susanne Beyer. 2020. "Expression of H3K4me3 and H3K9ac in Breast Cancer." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 146 (8): 2017–27.
- Bharti, Alok Chandra, Kanchan Vishnoi, Sukh Mahendra Singh, and Bharat Bhushan Aggarwal. 2018. "Chapter 1 - Pathways Linked to Cancer Chemoresistance and Their Targeting by Nutraceuticals." In *Role of Nutraceuticals in Cancer Chemosensitization*, edited by Alok Chandra Bharti and Bharat Bhushan Aggarwal, 2:1–30. Academic Press.
- Boix-Montesinos, Paz, Paula M. Soriano-Teruel, Ana Armiñán, Mar Orzáez, and María J. Vicent. 2021. "The Past, Present, and Future of Breast Cancer Models for Nanomedicine Development." *Advanced Drug Delivery Reviews* 173 (June): 306–30.
- Borun, T. W., D. Pearson, and W. K. Paik. 1972. "Studies of Histone Methylation during the HeLa S-3 Cell Cycle." *The Journal of Biological Chemistry* 247 (13): 4288–98.
- Brodsky, Arthur Nathan, Daniel C. Odenwelder, and Sarah W. Harcum. 2019. "High Extracellular Lactate Causes Reductive Carboxylation in Breast Tissue Cell Lines Grown under Normoxic Conditions." *PloS One* 14 (6): e0213419.
- Brown, R. S., and R. L. Wahl. 1993. "Overexpression of Glut-1 Glucose Transporter in Human Breast Cancer. An Immunohistochemical Study." *Cancer* 72 (10): 2979–85.
- Brownell, J. E., and C. D. Allis. 1996. "Special HATs for Special Occasions: Linking Histone Acetylation to Chromatin Assembly and Gene Activation." *Current Opinion in Genetics & Development* 6 (2): 176–84.

- Cancer Genome Atlas Network. 2012. "Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumours." *Nature* 490 (7418): 61–70.
- Cao, Ru, and Yi Zhang. 2004. "The Functions of E(Z)/EZH2-Mediated Methylation of Lysine 27 in Histone H3." *Current Opinion in Genetics & Development* 14 (2): 155–64.
- Carvalho, Carla C. C. R. de, and Maria José Caramujo. 2018. "The Various Roles of Fatty Acids." *Molecules* 23 (10). <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>.
- Cassago, Alexandre, Amanda P. S. Ferreira, Igor M. Ferreira, Camila Fornezari, Emerson R. M. Gomes, Kai Su Greene, Humberto M. Pereira, Richard C. Garratt, Sandra M. G. Dias, and Andre L. B. Ambrosio. 2012. "Mitochondrial Localization and Structure-Based Phosphate Activation Mechanism of Glutaminase C with Implications for Cancer Metabolism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (4): 1092–97.
- Cerami, Ethan, Jianjiong Gao, Ugur Dogrusoz, Benjamin E. Gross, Selcuk Onur Sumer, Bülent Arman Aksoy, Anders Jacobsen, et al. 2012. "The CBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data." *Cancer Discovery* 2 (5): 401–4.
- Chen, Emily I., Johannes Hewel, Joseph S. Krueger, Claire Tiraby, Martin R. Weber, Anastasia Kralli, Katja Becker, John R. Yates 3rd, and Brunhilde Felding-Habermann. 2007. "Adaptation of Energy Metabolism in Breast Cancer Brain Metastases." *Cancer Research* 67 (4): 1472–86.
- Chen, Jin-Qiang, and Jose Russo. 2012. "Dysregulation of Glucose Transport, Glycolysis, TCA Cycle and Glutaminolysis by Oncogenes and Tumor Suppressors in Cancer Cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1826 (2): 370–84.
- Chen, Ya-Huey, Mien-Chie Hung, and Long-Yuan Li. 2012. "EZH2: A Pivotal Regulator in Controlling Cell Differentiation." *American Journal of Translational Research* 4 (4): 364–75.
- Chen, Yue, Kai Li, Di Gong, Jie Zhang, Qin Li, Gang Zhao, and Ping Lin. 2020. "ACLY: A Biomarker of Recurrence in Breast Cancer." *Pathology, Research and Practice* 216 (9): 153076.
- Chik, Flora, and Moshe Szyf. 2011. "Effects of Specific DNMT Gene Depletion on Cancer Cell Transformation and Breast Cancer Cell Invasion; toward Selective DNMT Inhibitors." *Carcinogenesis* 32 (2): 224–32.
- Clarke, Robert, Minetta C. Liu, Kerrie B. Bouker, Zhiping Gu, Richard Y. Lee, Yuelin Zhu, Todd C. Skaar, et al. 2003. "Antiestrogen Resistance in Breast Cancer and the Role of Estrogen Receptor Signaling." *Oncogene* 22 (47): 7316–39.
- Collett, Karin, Geir E. Eide, Jarle Arnes, Ingunn M. Stefansson, Johan Eide, Audun Braaten, Turid Aas, Ariel P. Otte, and Lars A. Akslen. 2006. "Expression of Enhancer of Zeste Homologue 2 Is Significantly Associated with Increased Tumor Cell Proliferation and Is a Marker of Aggressive Breast Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12 (4): 1168–74.
- Cummins, Timothy D., Candice R. Holden, Brian E. Sansbury, Andrew A. Gibb, Jasmit Shah, Nagma Zafar, Yunan Tang, et al. 2014. "Metabolic Remodeling of White Adipose Tissue in Obesity." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 307 (3): E262-77.

- Curtis, Christina, Sohrab P. Shah, Suet-Feung Chin, Gulisa Turashvili, Oscar M. Rueda, Mark J. Dunning, Doug Speed, et al. 2012. "The Genomic and Transcriptomic Architecture of 2,000 Breast Tumours Reveals Novel Subgroups." *Nature* 486 (7403): 346–52.
- Dai, Xiaofeng, Ting Li, Zhonghu Bai, Yankun Yang, Xiuxia Liu, Jinling Zhan, and Bozhi Shi. 2015. "Breast Cancer Intrinsic Subtype Classification, Clinical Use and Future Trends." *American Journal of Cancer Research* 5 (10): 2929–43.
- De Carvalho, Daniel D., Shikhar Sharma, Jueng Soo You, Sheng-Fang Su, Phillippa C. Taberlay, Theresa K. Kelly, Xiaojing Yang, Gangning Liang, and Peter A. Jones. 2012. "DNA Methylation Screening Identifies Driver Epigenetic Events of Cancer Cell Survival." *Cancer Cell* 21 (5): 655–67.
- De Carvalho, Daniel D., Jueng Soo You, and Peter A. Jones. 2010. "DNA Methylation and Cellular Reprogramming." *Trends in Cell Biology* 20 (10): 609–17.
- DeBerardinis, R. J., and T. Cheng. 2010. "Q's next: The Diverse Functions of Glutamine in Metabolism, Cell Biology and Cancer." *Oncogene* 29 (3): 313–24.
- Deblois, Geneviève, and Vincent Giguère. 2013. "Oestrogen-Related Receptors in Breast Cancer: Control of Cellular Metabolism and Beyond." *Nature Reviews. Cancer* 13 (1): 27–36.
- Deblois, Geneviève, Harvey W. Smith, Ingrid S. Tam, Simon-Pierre Gravel, Maxime Caron, Paul Savage, David P. Labbé, et al. 2016. "ERR α Mediates Metabolic Adaptations Driving Lapatinib Resistance in Breast Cancer." *Nature Communications* 7 (July): 12156.
- Deblois, Geneviève, Seyed Ali Madani Tonekaboni, Giacomo Grillo, Constanza Martinez, Yunchi Ingrid Kao, Felicia Tai, Ilias Ettayebi, et al. 2020. "Epigenetic Switch-Induced Viral Mimicry Evasion in Chemotherapy-Resistant Breast Cancer." *Cancer Discovery* 10 (9): 1312–29.
- DeMichele, Angela, James J. Harding, Melinda L. Telli, Pamela N. Munster, Rana McKay, Othon Iliopoulos, Keith W. Orford, et al. 2016. "Phase 1 Study of CB-839, a Small Molecule Inhibitor of Glutaminase (GLS) in Combination with Paclitaxel (Pac) in Patients (Pts) with Triple Negative Breast Cancer (TNBC)." *Journal of Clinical Oncology: JCO* 34 (15_suppl): 1011–1011.
- Dias, Ana S., Catarina R. Almeida, Luisa A. Helguero, and Iola F. Duarte. 2019. "Metabolic Crosstalk in the Breast Cancer Microenvironment." *European Journal of Cancer* 121 (November): 154–71.
- Du, Jianhai, Aya Yanagida, Kaitlen Knight, Abbi L. Engel, Anh Huan Vo, Connor Jankowski, Martin Sadilek, et al. 2016. "Reductive Carboxylation Is a Major Metabolic Pathway in the Retinal Pigment Epithelium." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (51): 14710–15.
- Duan, Ran, Wenfang Du, and Weijian Guo. 2020. "EZH2: A Novel Target for Cancer Treatment." *Journal of Hematology & Oncology* 13 (1): 104.
- Egger, Gerda, Gangning Liang, Ana Aparicio, and Peter A. Jones. 2004. "Epigenetics in Human Disease and Prospects for Epigenetic Therapy." *Nature* 429 (6990): 457–63.
- El Messaoudi, Selma, Eric Fabbriozio, Carmen Rodriguez, Paul Chuchana, Lucas Fauquier, Donghang Cheng, Charles Theillet, Laurence Vandell, Mark T. Bedford, and Claude Sardet. 2006. "Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1 (CARM1) Is a Positive Regulator of the Cyclin E1 Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (36): 13351–56.

- El-Sahli, Sara, and Lisheng Wang. 2020. "Cancer Stem Cell-Associated Pathways in the Metabolic Reprogramming of Breast Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239125>.
- Elsheikh, Somaia E., Andrew R. Green, Emad A. Rakha, Des G. Powe, Rabab A. Ahmed, Hilary M. Collins, Daniele Soria, et al. 2009. "Global Histone Modifications in Breast Cancer Correlate with Tumor Phenotypes, Prognostic Factors, and Patient Outcome." *Cancer Research* 69 (9): 3802–9.
- Fabian, Carol J., Bruce F. Kimler, and Stephen D. Hursting. 2015. "Omega-3 Fatty Acids for Breast Cancer Prevention and Survivorship." *Breast Cancer Research: BCR* 17 (May): 62.
- Falahi, Fahimeh, Michel van Kruchten, Nadine Martinet, Geke A. P. Hospers, and Marianne G. Rots. 2014. "Current and Upcoming Approaches to Exploit the Reversibility of Epigenetic Mutations in Breast Cancer." *Breast Cancer Research: BCR* 16 (4): 412.
- Filippakopoulos, Panagis, Jun Qi, Sarah Picaud, Yao Shen, William B. Smith, Oleg Fedorov, Elizabeth M. Morse, et al. 2010. "Selective Inhibition of BET Bromodomains." *Nature* 468 (7327): 1067–73.
- Finn, Richard S., Miguel Martin, Hope S. Rugo, Stephen Jones, Seock-Ah Im, Karen Gelmon, Nadia Harbeck, et al. 2016. "Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer." *The New England Journal of Medicine* 375 (20): 1925–36.
- Fowle, B., D. A. Fein, A. L. Hanlon, B. L. Eisenberg, J. P. Hoffman, E. R. Sigurdson, M. B. Daly, and L. J. Goldstein. 1996. "The Impact of Tamoxifen on Breast Recurrence, Cosmesis, Complications, and Survival in Estrogen Receptor-Positive Early-Stage Breast Cancer." *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 35 (4): 669–77.
- Fukano, Marina, Morag Park, and Geneviève Deblois. 2021. "Metabolic Flexibility Is a Determinant of Breast Cancer Heterogeneity and Progression." *Cancers* 13 (18). <https://doi.org/10.3390/cancers13184699>.
- Fumagalli, Caterina, Alberto Ranghiero, Sara Gandini, Federica Corso, Sergio Taormina, Elisa De Camilli, Alessandra Rappa, et al. 2020. "Inter-Tumor Genomic Heterogeneity of Breast Cancers: Comprehensive Genomic Profile of Primary Early Breast Cancers and Relapses." *Breast Cancer Research: BCR* 22 (1): 107.
- Furlanetto, Jenny, and Sibylle Loibl. 2020. "Optimal Systemic Treatment for Early Triple-Negative Breast Cancer." *Breast Care* 15 (3): 217–26.
- Gajria, Devika, and Sarat Chandarlapaty. 2011. "HER2-Amplified Breast Cancer: Mechanisms of Trastuzumab Resistance and Novel Targeted Therapies." *Expert Review of Anticancer Therapy* 11 (2): 263–75.
- Gan, Lu, Midie Xu, Ruixi Hua, Cong Tan, Jieyun Zhang, Yiwei Gong, Zhenhua Wu, Weiwei Weng, Weiqi Sheng, and Weijian Guo. 2018. "The Polycomb Group Protein EZH2 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Pluripotent Phenotype of Gastric Cancer Cells by Binding to PTEN Promoter." *Journal of Hematology & Oncology* 11 (1): 9.
- Garcia-Martinez, Liliana, Yusheng Zhang, Yuichiro Nakata, Ho Lam Chan, and Lluís Morey. 2021. "Epigenetic Mechanisms in Breast Cancer Therapy and Resistance." *Nature Communications* 12 (1): 1786.
- Gibney, E. R., and C. M. Nolan. 2010. "Epigenetics and Gene Expression." *Heredity* 105 (1): 4–13.
- Gibson, Gary E., Anatoly Starkov, John P. Blass, Rajiv R. Ratan, and M. Flint Beal. 2010. "Cause and Consequence: Mitochondrial Dysfunction Initiates and Propagates Neuronal

- Dysfunction, Neuronal Death and Behavioral Abnormalities in Age-Associated Neurodegenerative Diseases.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1802 (1): 122–34.
- Gillette, Thomas G., and Joseph A. Hill. 2015. “Readers, Writers, and Erasers: Chromatin as the Whiteboard of Heart Disease.” *Circulation Research* 116 (7): 1245–53.
- Gillies, Robert J., and Robert A. Gatenby. 2007. “Adaptive Landscapes and Emergent Phenotypes: Why Do Cancers Have High Glycolysis?” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39 (3): 251–57.
- Granchi, C., S. Bertini, M. Macchia, and F. Minutolo. 2010. “Inhibitors of Lactate Dehydrogenase Isoforms and Their Therapeutic Potentials.” *Current Medicinal Chemistry* 17 (7): 672–97.
- Gravel, Simon-Pierre, Daina Avizonis, and Julie St-Pierre. 2016. “Metabolomics Analyses of Cancer Cells in Controlled Microenvironments.” *Methods in Molecular Biology* 1458: 273–90.
- Gross, Matt I., Susan D. Demo, Jennifer B. Dennison, Lijing Chen, Tania Chernov-Rogan, Bindu Goyal, Julie R. Janes, et al. 2014. “Antitumor Activity of the Glutaminase Inhibitor CB-839 in Triple-Negative Breast Cancer.” *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (4): 890–901.
- Grover-McKay, M., S. A. Walsh, E. A. Seftor, P. A. Thomas, and M. J. Hendrix. 1998. “Role for Glucose Transporter 1 Protein in Human Breast Cancer.” *Pathology Oncology Research: POR* 4 (2): 115–20.
- Gu, Zhimin, Yuxuan Liu, Feng Cai, Mckenzie Patrick, Jakub Zmajkovic, Hui Cao, Yuannu Zhang, et al. 2019. “Loss of EZH2 Reprograms BCAA Metabolism to Drive Leukemic Transformation.” *Cancer Discovery* 9 (9): 1228–47.
- Györfy, Balázs. 2021. “Survival Analysis across the Entire Transcriptome Identifies Biomarkers with the Highest Prognostic Power in Breast Cancer.” *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19 (July): 4101–9.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The next Generation.” *Cell* 144 (5): 646–74.
- Hathaway, Nathaniel A., Oliver Bell, Courtney Hodges, Erik L. Miller, Dana S. Neel, and Gerald R. Crabtree. 2012. “Dynamics and Memory of Heterochromatin in Living Cells.” *Cell* 149 (7): 1447–60.
- Hayami, Shinya, John D. Kelly, Hyun-Soo Cho, Masanori Yoshimatsu, Motoko Unoki, Tatsuhiko Tsunoda, Helen I. Field, et al. 2011. “Overexpression of LSD1 Contributes to Human Carcinogenesis through Chromatin Regulation in Various Cancers.” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 128 (3): 574–86.
- He, Aibin, Xiaohua Shen, Qing Ma, Jingjing Cao, Alexander von Gise, Pingzhu Zhou, Gang Wang, Victor E. Marquez, Stuart H. Orkin, and William T. Pu. 2012. “PRC2 Directly Methylates GATA4 and Represses Its Transcriptional Activity.” *Genes & Development* 26 (1): 37–42.
- He, Yupeng, Sujatha Selvaraju, Michael L. Curtin, Clarissa G. Jakob, Haizhong Zhu, Kenneth M. Comess, Bailin Shaw, et al. 2017. “The EED Protein-Protein Interaction Inhibitor A-395 Inactivates the PRC2 Complex.” *Nature Chemical Biology* 13 (4): 389–95.
- Healey, Megan A., Rong Hu, Andrew H. Beck, Laura C. Collins, Stuart J. Schnitt, Rulla M. Tamimi, and Aditi Hazra. 2014. “Association of H3K9me3 and H3K27me3 Repressive Histone Marks with Breast Cancer Subtypes in the Nurses’ Health Study.” *Breast Cancer Research and Treatment* 147 (3): 639–51.
- Heinz, Sven, Christopher Benner, Nathanael Spann, Eric Bertolino, Yin C. Lin, Peter Laslo, Jason X. Cheng, Cornelis Murre, Harinder Singh, and Christopher K. Glass. 2010. “Simple

- Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime Cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities.” *Molecular Cell* 38 (4): 576–89.
- Higgins, Michaela J., and José Baselga. 2011. “Targeted Therapies for Breast Cancer.” *The Journal of Clinical Investigation* 121 (10): 3797–3803.
- Hoadley, Katherine A., Christina Yau, Toshinori Hinoue, Denise M. Wolf, Alexander J. Lazar, Esther Drill, Ronglai Shen, et al. 2018. “Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer.” *Cell* 173 (2): 291–304.e6.
- Holm, Karolina, Dorthe Grabau, Kristina Lövgren, Steina Aradottir, Sofia Gruvberger-Saal, Jillian Howlin, Lao H. Saal, et al. 2012. “Global H3K27 Trimethylation and EZH2 Abundance in Breast Tumor Subtypes.” *Molecular Oncology* 6 (5): 494–506.
- Hyun, Kwangbeom, Jongcheol Jeon, Kihyun Park, and Jaehoon Kim. 2017. “Writing, Erasing and Reading Histone Lysine Methylations.” *Experimental & Molecular Medicine* 49 (4): e324.
- Idrissou, Mouhamed, Tiphane Boisnier, Anna Sanchez, Fatma Zohra Houfah Khoufah, Frederique Penault-Llorca, Yves-Jean Bignon, and Dominique Bernard-Gallon. 2020. “TIP60/P400/H4K12ac Plays a Role as a Heterochromatin Back-up Skeleton in Breast Cancer.” *Cancer Genomics & Proteomics* 17 (6): 687–94.
- Ilango, Suganya, Biswaranjan Paital, Priyanka Jayachandran, Palghat Raghunathan Padma, and Ramalingam Nirmaladevi. 2020. “Epigenetic Alterations in Cancer.” *Frontiers in Bioscience* 25 (6): 1058–1109.
- Jones, Peter A., and Stephen B. Baylin. 2002. “The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer.” *Nature Reviews. Genetics* 3 (6): 415–28.
- Joshi, Preeti, Elizabeth A. Carrington, Liangjun Wang, Carrie S. Ketel, Ellen L. Miller, Richard S. Jones, and Jeffrey A. Simon. 2008. “Dominant Alleles Identify SET Domain Residues Required for Histone Methyltransferase of Polycomb Repressive Complex 2.” *The Journal of Biological Chemistry* 283 (41): 27757–66.
- Josling, Gabrielle A., Shamista A. Selvarajah, Michaela Petter, and Michael F. Duffy. 2012. “The Role of Bromodomain Proteins in Regulating Gene Expression.” *Genes* 3 (2): 320–43.
- “KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.” n.d. Accessed August 31, 2022. <https://www.genome.jp/kegg/>.
- Kim, Eunhee, Misuk Kim, Dong-Hun Woo, Yongjae Shin, Jihye Shin, Nakho Chang, Young Taek Oh, et al. 2013. “Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells.” *Cancer Cell* 23 (6): 839–52.
- Kleer, Celina G., Qi Cao, Sooryanarayana Varambally, Ronglai Shen, Ichiro Ota, Scott A. Tomlins, Debashis Ghosh, et al. 2003. “EZH2 Is a Marker of Aggressive Breast Cancer and Promotes Neoplastic Transformation of Breast Epithelial Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (20): 11606–11.
- Knutson, Sarah K., Tim J. Wigle, Natalie M. Warholic, Christopher J. Sneeringer, Christina J. Allain, Christine R. Klaus, Joelle D. Sacks, et al. 2012. “A Selective Inhibitor of EZH2 Blocks H3K27 Methylation and Kills Mutant Lymphoma Cells.” *Nature Chemical Biology* 8 (11): 890–96.
- Konze, Kyle D., Anqi Ma, Fengling Li, Dalia Barsyte-Lovejoy, Trevor Parton, Christopher J. Macnevin, Feng Liu, et al. 2013. “An Orally Bioavailable Chemical Probe of the Lysine Methyltransferases EZH2 and EZH1.” *ACS Chemical Biology* 8 (6): 1324–34.
- Korde, Larissa A., Lara Lusa, Lisa McShane, Peter F. Lebowitz, Luanne Lukes, Kevin Camphausen, Joel S. Parker, Sandra M. Swain, Kent Hunter, and Jo Anne Zujewski. 2010.

- “Gene Expression Pathway Analysis to Predict Response to Neoadjuvant Docetaxel and Capecitabine for Breast Cancer.” *Breast Cancer Research and Treatment* 119 (3): 685–99.
- Kouzarides, Tony. 2007. “Chromatin Modifications and Their Function.” *Cell* 128 (4): 693–705.
- Krill, Lauren, Wei Deng, Ramez Eskander, David Mutch, Susan Zweizig, Bang Hoang, Olga Ioffe, et al. 2020. “Overexpression of Enhance of Zeste Homolog 2 (EZH2) in Endometrial Carcinoma: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study.” *Gynecologic Oncology* 156 (2): 423–29.
- Kuhl, Christiane K. 2015. “The Changing World of Breast Cancer: A Radiologist’s Perspective.” *Investigative Radiology* 50 (9): 615–28.
- Kumari, Kanchan, Amit K. Adhya, Arabinda Kumar Rath, P. B. Reddy, and Sandip K. Mishra. 2018. “Estrogen-Related Receptors Alpha, Beta and Gamma Expression and Function Is Associated with Transcriptional Repressor EZH2 in Breast Carcinoma.” *BMC Cancer* 18 (1): 690.
- Lawrence, Cortney L., and Albert S. Baldwin. 2016. “Non-Canonical EZH2 Transcriptionally Activates RelB in Triple Negative Breast Cancer.” *PloS One* 11 (10): e0165005.
- Le, Anne, Andrew N. Lane, Max Hamaker, Sminu Bose, Arvin Gouw, Joseph Barbi, Takashi Tsukamoto, et al. 2012. “Glucose-Independent Glutamine Metabolism via TCA Cycling for Proliferation and Survival in B Cells.” *Cell Metabolism* 15 (1): 110–21.
- Lehmann, Brian D., Joshua A. Bauer, Xi Chen, Melinda E. Sanders, A. Bapsi Chakravarthy, Yu Shyr, and Jennifer A. Pietenpol. 2011. “Identification of Human Triple-Negative Breast Cancer Subtypes and Preclinical Models for Selection of Targeted Therapies.” *The Journal of Clinical Investigation* 121 (7): 2750–67.
- Lemieux, Sebastien, Tobias Sargeant, David Laperrière, Houssam Ismail, Geneviève Boucher, Marieke Rozendaal, Vincent-Philippe Lavallée, et al. 2017. “MiSTIC, an Integrated Platform for the Analysis of Heterogeneity in Large Tumour Transcriptome Datasets.” *Nucleic Acids Research* 45 (13): e122.
- Li, Qing-Lan, Pin-Ji Lei, Quan-Yi Zhao, Lianyun Li, Gang Wei, and Min Wu. 2017. “Epigenomic Analysis in a Cell-Based Model Reveals the Roles of H3K9me3 in Breast Cancer Transformation.” *Epigenomics* 9 (8): 1077–92.
- Liberzon, Arthur, Aravind Subramanian, Reid Pinchback, Helga Thorvaldsdóttir, Pablo Tamayo, and Jill P. Mesirov. 2011. “Molecular Signatures Database (MSigDB) 3.0.” *Bioinformatics* 27 (12): 1739–40.
- Liu, Yongfeng, Cheng-E Tu, Xuxue Guo, Changjie Wu, Chuncai Gu, Qiuhua Lai, Yuxin Fang, et al. 2021. “Tumor-Suppressive Function of EZH2 Is through Inhibiting Glutaminase.” *Cell Death & Disease* 12 (11): 1–13.
- Lo, Pang-Kuo, and Saraswati Sukumar. 2008. “Epigenomics and Breast Cancer.” *Pharmacogenomics* 9 (12): 1879–1902.
- Locasale, Jason W., Alexandra R. Grassian, Tamar Melman, Costas A. Lyssiotis, Katherine R. Mattaini, Adam J. Bass, Gregory Heffron, et al. 2011. “Phosphoglycerate Dehydrogenase Diverts Glycolytic Flux and Contributes to Oncogenesis.” *Nature Genetics* 43 (9): 869–74.
- Loewe, Laurence, and William G. Hill. 2010. “The Population Genetics of Mutations: Good, Bad and Indifferent.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 365 (1544): 1153–67.
- Love, Michael I., Wolfgang Huber, and Simon Anders. 2014. “Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2.” *Genome Biology* 15 (12): 550.

- Lu, Y., X. Zi, Y. Zhao, D. Mascarenhas, and M. Pollak. 2001. “Insulin-like Growth Factor-I Receptor Signaling and Resistance to Trastuzumab (Herceptin).” *Journal of the National Cancer Institute* 93 (24): 1852–57.
- Marqués, Marta, Maria Alba Sorolla, Izaskun Urdanibia, Eva Parisi, Iván Hidalgo, Serafin Morales, Antonieta Salud, and Anabel Sorolla. 2022. “Are Transcription Factors Plausible Oncotargets for Triple Negative Breast Cancers?” *Cancers* 14 (5). <https://doi.org/10.3390/cancers14051101>.
- Marsolier, Justine, Pacôme Prompsy, Adeline Durand, Anne-Marie Lyne, Camille Landragin, Amandine Trouchet, Sabrina Tenreira Bento, et al. 2022. “H3K27me3 Conditions Chemotolerance in Triple-Negative Breast Cancer.” *Nature Genetics* 54 (4): 459–68.
- Martinez-Outschoorn, Ubaldo E., Marco Prisco, Adam Ertel, Aristotelis Tsirigos, Zhao Lin, Stephanos Pavlides, Chengwang Wang, et al. 2011. “Ketones and Lactate Increase Cancer Cell ‘Stemness,’ Driving Recurrence, Metastasis and Poor Clinical Outcome in Breast Cancer: Achieving Personalized Medicine via Metabolo-Genomics.” *Cell Cycle* 10 (8): 1271–86.
- “Mastectomy.” 2021. August 8, 2021. <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/breast-cancer/mastectomy>.
- McCabe, Michael T., Heidi M. Ott, Gopinath Ganji, Susan Korenchuk, Christine Thompson, Glenn S. Van Aller, Yan Liu, et al. 2012. “EZH2 Inhibition as a Therapeutic Strategy for Lymphoma with EZH2-Activating Mutations.” *Nature* 492 (7427): 108–12.
- McFarland, James M., Zandra V. Ho, Guillaume Kugener, Joshua M. Dempster, Phillip G. Montgomery, Jordan G. Bryan, John M. Krill-Burger, et al. 2018. “Improved Estimation of Cancer Dependencies from Large-Scale RNAi Screens Using Model-Based Normalization and Data Integration.” *Nature Communications* 9 (1): 4610.
- McGuirk, Shawn, Simon-Pierre Gravel, Geneviève Deblois, David J. Papadopoli, Brandon Faubert, André Wegner, Karsten Hiller, et al. 2013. “PGC-1 α Supports Glutamine Metabolism in Breast Cancer.” *Cancer & Metabolism* 1 (1): 22.
- Messier, Terri L., Jonathan A. R. Gordon, Joseph R. Boyd, Coralee E. Tye, Gillian Browne, Janet L. Stein, Jane B. Lian, and Gary S. Stein. 2016. “Histone H3 Lysine 4 Acetylation and Methylation Dynamics Define Breast Cancer Subtypes.” *Oncotarget* 7 (5): 5094–5109.
- Miller, Todd W., Justin M. Balko, and Carlos L. Arteaga. 2011. “Phosphatidylinositol 3-Kinase and Antiestrogen Resistance in Breast Cancer.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (33): 4452–61.
- Mohan, Man, Hans-Martin Herz, Yoh-Hei Takahashi, Chengqi Lin, Ka Chun Lai, Ying Zhang, Michael P. Washburn, Laurence Florens, and Ali Shilatifard. 2010. “Linking H3K79 Trimethylation to Wnt Signaling through a Novel Dot1-Containing Complex (DotCom).” *Genes & Development* 24 (6): 574–89.
- Monaco, Marie E. 2017. “Fatty Acid Metabolism in Breast Cancer Subtypes.” *Oncotarget* 8 (17): 29487–500.
- Morschhauser, Franck, Hervé Tilly, Aristeidis Chaidos, Pamela McKay, Tycel Phillips, Sarit Assouline, Connie Lee Batlevi, et al. 2020. “Tazemetostat for Patients with Relapsed or Refractory Follicular Lymphoma: An Open-Label, Single-Arm, Multicentre, Phase 2 Trial.” *The Lancet Oncology* 21 (11): 1433–42.
- Mullen, Andrew R., William W. Wheaton, Eunsook S. Jin, Pei-Hsuan Chen, Lucas B. Sullivan, Tzulung Cheng, Youfeng Yang, W. Marston Linehan, Navdeep S. Chandel, and Ralph J.

- DeBerardinis. 2011. "Reductive Carboxylation Supports Growth in Tumour Cells with Defective Mitochondria." *Nature* 481 (7381): 385–88.
- Musselman, Catherine A., Marie-Eve Lalonde, Jacques Côté, and Tatiana G. Kutateladze. 2012. "Perceiving the Epigenetic Landscape through Histone Readers." *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (12): 1218–27.
- Naifeh, Jeffrey, Manjari Dimri, and Matthew Varacallo. 2022. "Biochemistry, Aerobic Glycolysis." In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Nassa, Giovanni, Annamaria Salvati, Roberta Tarallo, Valerio Gigantino, Elena Alexandrova, Domenico Memoli, Assunta Sellitto, et al. 2019. "Inhibition of Histone Methyltransferase DOT1L Silences ER α Gene and Blocks Proliferation of Antiestrogen-Resistant Breast Cancer Cells." *Science Advances* 5 (2): eaav5590.
- Norum, J. H., K. Andersen, and T. Sørli. 2014. "Lessons Learned from the Intrinsic Subtypes of Breast Cancer in the Quest for Precision Therapy." *The British Journal of Surgery* 101 (8): 925–38.
- Nutt, Stephen L., Christine Keenan, Michaël Chopin, and Rhys S. Allan. 2020. "EZH2 Function in Immune Cell Development." *Biological Chemistry* 401 (8): 933–43.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber, and E. Li. 1999. "DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for de Novo Methylation and Mammalian Development." *Cell* 99 (3): 247–57.
- Onitilo, Adedayo A., Jessica M. Engel, Robert T. Greenlee, and Bickol N. Mukesh. 2009. "Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival." *Clinical Medicine & Research* 7 (1–2): 4–13.
- Ortega, Miguel A., Oscar Fraile-Martínez, Ángel Asúnsolo, Julia Buján, Natalio García-Honduvilla, and Santiago Coca. 2020. "Signal Transduction Pathways in Breast Cancer: The Important Role of PI3K/Akt/MTOR." *Journal of Oncology* 2020 (March): 9258396.
- Ostrow, Kimberly Laskie, Hannah Lui Park, Mohammad Obaidul Hoque, Myoung Sook Kim, Junwei Liu, Pedram Argani, William Westra, Wim Van Criekinge, and David Sidransky. 2009. "Pharmacologic Unmasking of Epigenetically Silenced Genes in Breast Cancer." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (4): 1184–91.
- Owen, Oliver E., Satish C. Kalhan, and Richard W. Hanson. 2002. "The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (34): 30409–12.
- Paplomata, Elisavet, and Ruth O'Regan. 2014. "The PI3K/AKT/MTOR Pathway in Breast Cancer: Targets, Trials and Biomarkers." *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 6 (4): 154–66.
- Parker, Joel S., Michael Mullins, Maggie C. U. Cheang, Samuel Leung, David Voduc, Tammi Vickery, Sherri Davies, et al. 2009. "Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (8): 1160–67.
- Pavlova, Natalya N., Jiajun Zhu, and Craig B. Thompson. 2022. "The Hallmarks of Cancer Metabolism: Still Emerging." *Cell Metabolism* 34 (3): 355–77.
- Peiris-Pagès, Maria, Ubaldo E. Martinez-Outschoorn, Richard G. Pestell, Federica Sotgia, and Michael P. Lisanti. 2016. "Cancer Stem Cell Metabolism." *Breast Cancer Research: BCR* 18 (1): 55.

- Pelicano, Hélène, Wan Zhang, Jinyun Liu, Naima Hammoudi, Jiale Dai, Rui-Hua Xu, Lajos Pusztai, and Peng Huang. 2014. "Mitochondrial Dysfunction in Some Triple-Negative Breast Cancer Cell Lines: Role of MTOR Pathway and Therapeutic Potential." *Breast Cancer Research: BCR* 16 (5): 434.
- Perou, C. M., T. Sørlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, et al. 2000. "Molecular Portraits of Human Breast Tumours." *Nature* 406 (6797): 747–52.
- Pollari, Sirkku, Sanna-Maria Käkönen, Henrik Edgren, Maija Wolf, Pekka Kohonen, Henri Sara, Theresa Guise, Matthias Nees, and Olli Kallioniemi. 2011. "Enhanced Serine Production by Bone Metastatic Breast Cancer Cells Stimulates Osteoclastogenesis." *Breast Cancer Research and Treatment* 125 (2): 421–30.
- Polyak, Kornelia. 2007. "Breast Cancer: Origins and Evolution." *The Journal of Clinical Investigation* 117 (11): 3155–63.
- Public Health Agency of Canada. n.d. "[No Title]." Accessed August 31, 2022. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/sun-safety/skin-cancer.html>.
- Qiu, Bai-Quan, Xia-Hui Lin, Xu-Dong Ye, Wei Huang, Xu Pei, Dian Xiong, Xiang Long, et al. 2020. "Long Non-Coding RNA PSMA3-AS1 Promotes Malignant Phenotypes of Esophageal Cancer by Modulating the MiR-101/EZH2 Axis as a CeRNA." *Aging* 12 (2): 1843–56.
- "ReMap2022." n.d. Accessed December 2, 2022. <https://remap2022.univ-amu.fr/>.
- Richardson, Adam D., Chen Yang, Andrei Osterman, and Jeffrey W. Smith. 2008. "Central Carbon Metabolism in the Progression of Mammary Carcinoma." *Breast Cancer Research and Treatment* 110 (2): 297–307.
- Rnaimax, Lipofectamine ®. n.d. "Lipofectamine RNAiMAX Reagent." Accessed August 31, 2022. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Lipofectamine_RNAiMAX_Reag_protocol.pdf.
- Robert, N. J. 1997. "Clinical Efficacy of Tamoxifen." *Oncology* 11 (2 Suppl 1): 15–20.
- Röhrig, Florian, and Almut Schulze. 2016. "The Multifaceted Roles of Fatty Acid Synthesis in Cancer." *Nature Reviews. Cancer* 16 (11): 732–49.
- Romond, Edward H., Edith A. Perez, John Bryant, Vera J. Suman, Charles E. Geyer Jr, Nancy E. Davidson, Elizabeth Tan-Chiu, et al. 2005. "Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer." *The New England Journal of Medicine* 353 (16): 1673–84.
- Ryan, Qin, Amna Ibrahim, Martin H. Cohen, John Johnson, Chia-Wen Ko, Rajeshwari Sridhara, Robert Justice, and Richard Pazdur. 2008. "FDA Drug Approval Summary: Lapatinib in Combination with Capecitabine for Previously Treated Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER-2." *The Oncologist* 13 (10): 1114–19.
- Sajjani, Karishma, Farhadul Islam, Robert Anthony Smith, Vinod Gopalan, and Alfred King-Yin Lam. 2017. "Genetic Alterations in Krebs Cycle and Its Impact on Cancer Pathogenesis." *Biochimie* 135 (April): 164–72.
- Sammons, Sarah, Noah S. Kornblum, and Kimberly L. Blackwell. 2019. "Fulvestrant-Based Combination Therapy for Second-Line Treatment of Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer." *Targeted Oncology* 14 (1): 1–12.
- Santini, Valeria, and Gert J. Ossenkoppele. 2019. "Hypomethylating Agents in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: A Guide to Optimal Use." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 140 (August): 1–7.

- Schneider, Robert, Andrew J. Bannister, Fiona A. Myers, Alan W. Thorne, Colyn Crane-Robinson, and Tony Kouzarides. 2004. "Histone H3 Lysine 4 Methylation Patterns in Higher Eukaryotic Genes." *Nature Cell Biology* 6 (1): 73–77.
- Schulze, Julia M., Jessica Jackson, Shima Nakanishi, Jennifer M. Gardner, Thomas Hentrich, Jeff Haug, Mark Johnston, Sue L. Jaspersen, Michael S. Kobor, and Ali Shilatifard. 2009. "Linking Cell Cycle to Histone Modifications: SBF and H2B Monoubiquitination Machinery and Cell-Cycle Regulation of H3K79 Dimethylation." *Molecular Cell* 35 (5): 626–41.
- Scriver, C. R., and L. E. Rosenberg. 1973. "Amino Acid Metabolism and Its Disorders." *Major Problems in Clinical Pediatrics* 10: 1–478.
- Sharma, Priyanka. 2016. "Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer." *The Oncologist* 21 (9): 1050–62.
- Sharma, Shikhar, Theresa K. Kelly, and Peter A. Jones. 2010. "Epigenetics in Cancer." *Carcinogenesis* 31 (1): 27–36.
- Shen, Meiyang, Huawen Pan, Yuxia Chen, Yu Hang Xu, Weixiong Yang, and Zhaojun Wu. 2020. "A Review of Current Progress in Triple-Negative Breast Cancer Therapy." *Open Medicine: A Peer-Reviewed, Independent, Open-Access Journal* 15 (1): 1143–49.
- Shen, Xiaohua, Yingchun Liu, Yu-Jung Hsu, Yuko Fujiwara, Jonghwan Kim, Xiaohong Mao, Guo-Cheng Yuan, and Stuart H. Orkin. 2008. "EZH1 Mediates Methylation on Histone H3 Lysine 27 and Complements EZH2 in Maintaining Stem Cell Identity and Executing Pluripotency." *Molecular Cell* 32 (4): 491–502.
- Siebeneicher, Holger, Arwed Cleve, Hartmut Rehwinkel, Roland Neuhaus, Iring Heisler, Thomas Müller, Marcus Bauser, and Bernd Buchmann. 2016. "Identification and Optimization of the First Highly Selective GLUT1 Inhibitor BAY-876." *ChemMedChem* 11 (20): 2261–71.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, and Ahmedin Jemal. 2020. "Cancer Statistics, 2020." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 70 (1): 7–30.
- Simon, Jeffrey A., and Carol A. Lange. 2008. "Roles of the EZH2 Histone Methyltransferase in Cancer Epigenetics." *Mutation Research* 647 (1–2): 21–29.
- Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, et al. 2001. "Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2." *The New England Journal of Medicine* 344 (11): 783–92.
- Sørlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, et al. 2001. "Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (19): 10869–74.
- Strahl, B. D., and C. D. Allis. 2000. "The Language of Covalent Histone Modifications." *Nature* 403 (6765): 41–45.
- Subramanian, Aravind, Pablo Tamayo, Vamsi K. Mootha, Sayan Mukherjee, Benjamin L. Ebert, Michael A. Gillette, Amanda Paulovich, et al. 2005. "Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (43): 15545–50.
- Suzuki, Junko, Yunn-Yi Chen, Gary K. Scott, Sandy Devries, Koei Chin, Christopher C. Benz, Frederic M. Waldman, and E. Shelley Hwang. 2009. "Protein Acetylation and Histone

- Deacetylase Expression Associated with Malignant Breast Cancer Progression.” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (9): 3163–71.
- Terunuma, Atsushi, Nagireddy Putluri, Prachi Mishra, Ewy A. Mathé, Tiffany H. Dorsey, Ming Yi, Tiffany A. Wallace, et al. 2014. “MYC-Driven Accumulation of 2-Hydroxyglutarate Is Associated with Breast Cancer Prognosis.” *The Journal of Clinical Investigation* 124 (1): 398–412.
- The Editors of Encyclopedia Britannica. 2021. “Metabolism Summary.” In *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/summary/metabolism>.
- Thurston, David E., and Ilona Pysz. 2021. *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*. CRC Press.
- Toss, Angela, and Massimo Cristofanilli. 2015. “Molecular Characterization and Targeted Therapeutic Approaches in Breast Cancer.” *Breast Cancer Research: BCR* 17 (April): 60.
- Tutt, Andrew, Mark Robson, Judy E. Garber, Susan M. Domchek, M. William Audeh, Jeffrey N. Weitzel, Michael Friedlander, et al. 2010. “Oral Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Olaparib in Patients with BRCA1 or BRCA2 Mutations and Advanced Breast Cancer: A Proof-of-Concept Trial.” *The Lancet* 376 (9737): 235–44.
- Vaquerizas, Juan M., Sarah K. Kummerfeld, Sarah A. Teichmann, and Nicholas M. Luscombe. 2009. “A Census of Human Transcription Factors: Function, Expression and Evolution.” *Nature Reviews. Genetics* 10 (4): 252–63.
- Varambally, Sooryanarayana, Saravana M. Dhanasekaran, Ming Zhou, Terrence R. Barrette, Chandan Kumar-Sinha, Martin G. Sanda, Debashis Ghosh, et al. 2002. “The Polycomb Group Protein EZH2 Is Involved in Progression of Prostate Cancer.” *Nature* 419 (6907): 624–29.
- Verdone, Loredana, Micaela Caserta, and Ernesto Di Mauro. 2005. “Role of Histone Acetylation in the Control of Gene Expression.” *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire* 83 (3): 344–53.
- Verma, Sharad K., Xinrong Tian, Louis V. LaFrance, Céline Duquenne, Dominic P. Suarez, Kenneth A. Newlander, Stuart P. Romeril, et al. 2012. “Identification of Potent, Selective, Cell-Active Inhibitors of the Histone Lysine Methyltransferase EZH2.” *ACS Medicinal Chemistry Letters* 3 (12): 1091–96.
- Vu, Thuy, and Francois X. Claret. 2012. “Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer.” *Frontiers in Oncology* 2 (June): 62.
- Waddington, C. H. 2012. “The Epigenotype. 1942.” *International Journal of Epidemiology* 41 (1): 10–13.
- Walmsley, B., and R. Stuklis. 1989. “Effects of Spatial and Temporal Dispersion of Synaptic Input on the Time Course of Synaptic Potentials.” *Journal of Neurophysiology* 61 (4): 681–87.
- Wan, Lixin, Kexin Xu, Yongkun Wei, Jinfang Zhang, Tao Han, Christopher Fry, Zhao Zhang, et al. 2018. “Phosphorylation of EZH2 by AMPK Suppresses PRC2 Methyltransferase Activity and Oncogenic Function.” *Molecular Cell* 69 (2): 279-291.e5.
- Wang, Diyu, Lei Yin, Jinrong Wei, Zhixue Yang, and Guoqin Jiang. 2017. “ATP Citrate Lyase Is Increased in Human Breast Cancer, Depletion of Which Promotes Apoptosis.” *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 39 (4): 1010428317698338.

- Wang, Jian-Bin, Jon W. Erickson, Reina Fuji, Sekar Ramachandran, Ping Gao, Ramani Dinavahi, Kristin F. Wilson, et al. 2010. "Targeting Mitochondrial Glutaminase Activity Inhibits Oncogenic Transformation." *Cancer Cell*.
- Wang, Lingling, Shizhen Zhang, and Xiaochen Wang. 2020. "The Metabolic Mechanisms of Breast Cancer Metastasis." *Frontiers in Oncology* 10: 602416.
- Wang, Yi-Ping, and Qun-Ying Lei. 2017. "Perspectives of Reprogramming Breast Cancer Metabolism." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1026: 217–32.
- Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein. 1927. "THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY." *The Journal of General Physiology* 8 (6): 519–30.
- Ward, Patrick S., and Craig B. Thompson. 2012. "Signaling in Control of Cell Growth and Metabolism." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (7): a006783.
- "Wisent Bio Products." n.d. Accessed August 31, 2022. <https://www.wisentbioproducts.com/fr/>.
- Wong, C. C., Y. Qian, and J. Yu. 2017. "Interplay between Epigenetics and Metabolism in Oncogenesis: Mechanisms and Therapeutic Approaches." *Oncogene* 36 (24): 3359–74.
- Wong, Kah Keng. 2021. "DNMT1: A Key Drug Target in Triple-Negative Breast Cancer." *Seminars in Cancer Biology* 72 (July): 198–213.
- Wu, Guoyao, Yun-Zhong Fang, Sheng Yang, Joanne R. Lupton, and Nancy D. Turner. 2004. "Glutathione Metabolism and Its Implications for Health." *The Journal of Nutrition* 134 (3): 489–92.
- Wu, Qin, Wail Ba-Alawi, Genevieve Deblois, Jennifer Cruickshank, Shili Duan, Evelyne Lima-Fernandes, Jillian Haight, et al. 2020. "GLUT1 Inhibition Blocks Growth of RB1-Positive Triple Negative Breast Cancer." *Nature Communications* 11 (1): 4205.
- Wu, Z., J. Wu, Q. Zhao, S. Fu, and J. Jin. 2020. "Emerging Roles of Aerobic Glycolysis in Breast Cancer." *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 22 (5): 631–46.
- Xu, Kexin, Zhenhua Jeremy Wu, Anna C. Groner, Housheng Hansen He, Changmeng Cai, Rosina T. Lis, Xiaoqiu Wu, et al. 2012. "EZH2 Oncogenic Activity in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Is Polycomb-Independent." *Science* 338 (6113): 1465–69.
- Yao, Yizhou, Hao Hu, Yong Yang, Guoqiang Zhou, Zengfu Shang, Xiaodong Yang, Kang Sun, et al. 2016. "Downregulation of Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Is Essential for the Induction of Autophagy and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells." *Genes* 7 (10). <https://doi.org/10.3390/genes7100083>.
- Yu, Jia, Jacqueline Zayas, Bo Qin, and Liewei Wang. 2019. "Targeting DNA Methylation for Treating Triple-Negative Breast Cancer." *Pharmacogenomics* 20 (16): 1151–57.
- Zahan, Tasnim, Plabon K. Das, Syeda F. Akter, Rowshanul Habib, Md Habibur Rahman, Md Rezaul Karim, and Farhadul Islam. 2020. "Therapy Resistance in Cancers: Phenotypic, Metabolic, Epigenetic and Tumour Microenvironmental Perspectives." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 20 (18): 2190–2206.
- Zhuang, Jialang, Qin Huo, Fan Yang, and Ni Xie. 2020. "Perspectives on the Role of Histone Modification in Breast Cancer Progression and the Advanced Technological Tools to Study Epigenetic Determinants of Metastasis." *Frontiers in Genetics* 11 (October): 603552.