

Université de Montréal

Ciblage de la machinerie traductionnelle pour surmonter la résistance aux inhibiteurs de kinase
dans le mélanome

Par

TAKDENTI MERIEM

Programmes de biologie moléculaire,
Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire, option : Maladies complexes chez l'humain

Août 2023

© TAKDENTI Meriem, 2023

Université de Montréal
Programmes de biologie moléculaire,
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

**Ciblage de la machinerie traductionnelle pour surmonter la résistance aux inhibiteurs de
kinases dans le mélanome**

Présenté par

Meriem TAKDENTI

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Mathieu Ferron

Président-rapporteur

Laura Hulea

Directeur de recherche

Geneviève Deblois

Membre du jury

Résumé

Malgré les thérapies anti-cancéreuses ciblées, beaucoup de patients récidivent à cause de la résistance aux traitements qui constitue un problème clinique majeur. Cette résistance est soutenue par la reprogrammation métabolique et traductionnelle. La synthèse des protéines oncogéniques fait appel au complexe d'initiation de la traduction eucaryote 4F (eIF4F), compris des facteurs : eIF4A, eIF4E et eIF4G. Il est ainsi possible de cibler la synthèse protéique spécifique aux cellules cancéreuses par des inhibiteurs de l'initiation de la traduction. Nous proposons que le ciblage de la machinerie traductionnelle, via l'inhibition du eIF4A (eIF4Ai), affecte particulièrement les cellules cancéreuses. Mais est-ce qu'il est en mesure d'atténuer la résistance aux inhibiteurs de kinase (IKs) et d'en empêcher l'adaptation et la reprogrammation métabolique?

L'efficacité des eIF4Ais est vérifiée par l'évaluation de la croissance et de la mort cellulaire (Annexine V) dans des cellules de mélanome, sensibles et résistantes aux IKs. Celle-ci est accompagnée de la réduction de la synthèse protéique évaluée par profilage polysomique, de la baisse des cibles de l'eIF4Ai (BCL-2, CDK4...) quantifiées par western-blots, d'un important stress bioénergétique mesuré par Seahorse et du contrôle des principales voies métaboliques analysées par GCMS. L'analyse du profilage polysomique, de l'ARNseq et du métabolome permettront de mettre en évidence les réseaux qui soutiennent l'efficacité des eIF4Ais et les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'efficacité de cette thérapie. Ces derniers seront par la suite validés par des approches génétiques évaluant les principaux gènes et voies métaboliques qui y sont impliqués.

Cette étude comblera de grosses lacunes dans les connaissances relatives aux mécanismes moléculaires qui soutiennent la résistance aux IKs afin d'améliorer leur efficacité en clinique.

Mots-clés : Cancer, Métabolisme, Traduction d'ARNm, Résistance aux inhibiteurs de kinase, Complexe d'initiation de la traduction eucaryote eIF4F.

Abstract

Despite advances in research and development of targeted cancer therapies, many patients relapse due to treatment resistance. This is the case of melanoma resistant to BRAF inhibitors (BRAFi). 40-50% of melanoma cancer cells express the constitutively active oncoprotein BRAF^{V600E}, leading to metabolic and translational reprogramming that is proposed to support resistance to cancer therapies. Studies have shown the importance of the eukaryotic translation initiation complex 4F (eIF4F), including factors: eIF4A, eIF4E and eIF4G, in the oncogenic proteins' synthesis (e.g. growth factors, metabolic factors, etc.). The cancer cells translome is distinct from the normal cells translome. It is thus possible to target protein synthesis specific to cancer cells using molecules that inhibit translation initiation, the limiting phase in this process, affecting the cancer cells specifically. We propose that targeting the translational machinery via eIF4A inhibitors (eIF4Ai) would attenuate resistance to kinase inhibitors (KIs) and we seek to dissect the underlying molecular mechanisms.

The efficacy of eIF4Ais in BRAFi sensitive and/or resistant melanoma is evaluated showing that eIF4Ais inhibit cell growth and induce melanoma cells death, using growth curves and FACS (Annexin_V). This is accompanied by a protein synthesis reduction, evaluated by polysome profiling showing a decrease in eIF4Ais treated cells and western-blots showing a decrease in translational targets of eIF4Ai (BCL-2, CDK4, etc.). A significant bioenergetic stress is measured by Seahorse and the control of the main metabolic pathways including glycolysis, TCA cycle and amino acids metabolism is analyzed by GCMS. Then the analysis of the translome by polysome profiling and RNAseq and of the metabolome by GCMS/LCMS and Seahorse shed light on the translational networks that dictate metabolic reprogramming supporting eIF4Ai efficacy. Finally, the molecular mechanisms underlying the efficacy of eIF4Ai will be identified using genetic approaches to validate the main genes and metabolites and/or corresponding metabolic pathways involved in the response to eIF4Ai of the kinase inhibitor resistant melanoma.

This study will fill large gaps in knowledge about the molecular mechanisms that support resistance to KIs in order to improve their clinical efficacy.

Keywords: Cancer, Metabolism, cap-dependent mRNA Translation, kinase inhibitor resistance, translation initiation complex eIF4F.

Table des matières

	Pages
Résumé	01
Abstract	02
Liste des tableaux	06
Liste des figures	07
Liste des sigles et abréviations	09
Remerciements	12
Contribution	13
Chapitre 1 : Introduction	14
1. La synthèse protéique et le métabolisme cellulaire soutiennent la survie et la croissance cellulaire	14
1.1. La synthèse protéique et le complexe d'initiation de la traduction eIF4F	14
1.1.1. La traduction d'ARNm.....	14
1.1.2. Le complexe d'initiation de la traduction	18
1.1.3. Les mécanismes de régulation de la traduction et du complexe eIF4F	19
1.2. Le métabolisme cellulaire et les principales sources d'énergie et de biomasses.....	21
1.2.1. Les principales voies métaboliques de la cellule	22
a. La glycolyse	22
b. Le cycle de l'acide citrique (TCA)	24
c. La phosphorylation oxydative	25
d. Le métabolisme des acides aminés	26
e. La β -oxydation des acides gras	28
1.2.2. La régulation des principales voies métaboliques modulée par le complexe mTORC1-eIF4F	30
2. La reprogrammation traductionnelle et métabolique soutiennent la prolifération cellulaire et maintient la résistance aux inhibiteurs de kinase	31
3. Le mélanome malin et la thérapie ciblée aux inhibiteurs de kinase	33

4.	L'efficacité préliminaire des inhibiteurs de la traduction dans le mélanome malin résistant aux inhibiteurs de kinase.....	37
5.	Hypothèse et objectifs du projet.....	38
Chapitre 2 : Matériels et méthodes		41
	-Conditions de culture cellulaire.....	41
	-Analyse de la croissance cellulaire	41
	-Essais clonogéniques.....	42
	-Western blot.....	43
	-RT-q-PCR.....	44
	-Cytométrie en flux (FACS Annexine-V/DAPI).....	45
	-Fractionnement et profilage des polysomes	46
	-Test de Puromycilation.....	46
	-Mesure de l'activité mitochondriale.....	47
	-Spectrométrie de masse (GCMS)	47
	-Test de déprivation à la glutamine	48
	-Quantifications et analyses statistiques.....	49
Chapitre 3 : Résultats		50
1.	La résistance aux inhibiteurs de BRAF et l'efficacité des inhibiteurs de eIF4A	50
1.1.	La résistance aux inhibiteurs de la kinase oncogénique BRAF.....	50
1.2.	Les inhibiteurs de eIF4A ralentissent la prolifération cellulaire des paires de lignées sensibles et résistantes aux inhibiteurs de BRAF.....	53
1.3.	L'inhibiteur du eIF4A CR-1-31b ne ralentit pas uniquement la prolifération cellulaire mais induit aussi l'apoptose	57
1.4.	L'inhibiteur de BRAF régule à la baisse l'activité de mTORC1 dans les cellules sensibles, sans affecter autant les cellules résistantes	58
2.	L'inhibiteur du eIF4A CR-1-31b ralentit le processus traductionnel actif et réduit la synthèse protéique	60
3.	Effet de l'inhibiteur du eIF4A CR-1-31b sur le métabolisme cellulaire	63
3.1.	Le CR-1-31b réduit la production mitochondriale d'ATP et induit les cellules du	

mélanome en crise bioénergétique.....	63
3.2. Le CR-1-31b réduit les métabolites de la glycolyse et du cycle TCA et entraîne une accumulation des acides aminés	66
4. La dépendance des cellules du mélanome à la glutamine	68
5. Le CR-1-31b réduit plusieurs cibles potentielles impliquées dans différentes voies métaboliques	71
Chapitre 4 : Discussion.....	76
Chapitre 5 : Conclusion et perspectives.....	85
Références bibliographiques.....	86
Annexes.....	93

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des amorces utilisées pour les q-PCR	93
Tableau 2. Liste des anticorps utilisés en Western blot	94

Liste des figures

Figure 1.1. Aperçu du processus de la traduction d'ARNm eIF4F dépendants	17
Figure 1.2. Schéma représentatif des voies de signalisation oncogènes MAPK et PI3/mTOR qui modulent la régulation de l'appareil traductionnel	21
Figure 1.3. Schéma représentatif de la glycolyse	23
Figure 1.4. Schéma représentatif des réactions du cycle TCA	24
Figure 1.5. Schéma représentatif de la Chaîne de transfert d'électrons	26
Figure 1.6. Schéma représentatif du métabolisme de la glutamine et de la glutamate	27
Figure 1.7. Schéma représentatif de la Béta-oxydation des acides gras.....	29
Figure 1.8. Schéma représentatif des effecteurs en aval de la voie mTORC1.....	31
Figure 1.9. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF.....	35-36
Figure 3.1. Les cellules A375R, MM102R et MDA-MB-231R résistent aux fortes doses d'inhibiteurs de kinase comparativement aux A375, MM102 et MDA-MB- 231.....	52
Figure 3.2. Les inhibiteurs de eIF4A ralentissent la prolifération et induisent en apoptose les paires de cellules sensibles et résistantes aux inhibiteurs de BRAF.....	55-56
Figure 3.3. PLX4032 inhibe l'activité de mTORC1 uniquement dans les cellules sensibles alors que CR-1-31b réduit les niveaux des protéines cibles dans les deux lignées cellulaires.....	59
Figure 3.4. Le CR-1-31b ralentit le processus traductionnel actif ainsi que la production protéique totale dans les cellules du mélanome sensibles et résistantes aux inhibiteurs de BRAF.....	62
Figure 3.5. Le CR-1-31b induit les cellules A375 et A375R en crise bioénergétique par réduction de la production d'ATP.....	64-65
Figure 3.6. Le CR-1-31b inhibe la glycolyse, le cycle TCA et la synthèse protéique dans les cellules sensibles et résistantes au PLX4032.....	67
Figure 3.7. Les cellules A375 et A375R sont hautement dépendantes à la Glutamine et réduisent leur potentiel prolifératif à faible concentration ou en absence de cet acide aminé	70
Figure 3.8. Les cibles potentielles de CR-1-31b.....	73-75
Figure Supplémentaire 1 : Le blocage du MPC via le UK5099 affecte la capacité respiration mitochondriale maximale spécifiquement dans les cellules A375.....	95

Figure Supplémentaire 2 : Le blocage de la glutaminase (GLS) via le BPTES n'affecte aucune
fonction mitochondriale ni dans les cellules A375 ni dans les A375R.....97

Liste des sigles et abréviations

ACAD : Acyl-CoA Deshydrogenase
ACS : acyl-CoA synthetase
ADP : Adenosine Di Phosphate
ARNm : Acide ribo nucléique messenger
ARNt : Acide ribo nucléique de Transport
ARNt_Met : Acide ribo Nucléique de Transport de la Methionine
ATF2 : Activation transcription facteur 2
ATP : Adenosine Tri Phosphate
ATP5F1D : ATP synthase F1 subunit D
ATP5F1O : ATP synthase F1 subunit O
BCL2 : B-Cell Leukemia/Lymphoma 2 protein
CDK : Cyclin-Dependent kinases
COT : Cancer de la thyroïde d'Osaka
DEPTOR : DEP domain-containing mTOR interacting protein
ECH : Enoyl-Coa hydratase
EIF4F : Eukaryotic Initiation Factor 4 F
EIF2a : Eucaryotic Initiation Factor 2a
EIF1 : Eucaryotic Initiation Factor 1
EIF3 : Eucaryotic Initiation Factor 3
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases
ETC : Electron transport Chain
FADH2 : Flavine Adénine Dinucléotide
GSK-3B : Glycogen Synthase Kinase-3 beta
GDH ou GLUD1 : Glutamine Dehydrogenase
GDP : Guanosine Di Phosphate
GLS : L-glutamine aminohydrolase
GltS : glutamate synthase
GLUT : Glucose transporter

GTP : Guanosine Tri Phosphate
GS : Glutamine Synthetase
HADH : Hydroxyacyl-CoA Déshydrogénase
HIFA1 A : Hypoxie Inductible Factor 1 Subunit Alpha
HMG-cMet : Hepatocyte Growth Factor - c Met
IGF-1R : Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
LCAD ou ACADL : ACAD à chaîne longue
LDHA : Lactate Deshydrogenase
MAPK : Mitogene Activated Protein Kinase
MCAD ou ACADM : ACAD à chaîne moyenne
MCL-1 : Myeloid Cell Leukemia sequence 1
MDR1 : Multidrug Resistance 1 gene
MPC : Mitochondrial Pyruvate carrier
MITF : Microphthalmia associated Transcription Factor
MTFP1 : Mitochondrial Fission Proteine 1
mTORC1 : mammalian Target of Rapamycin Complex 1
mTORC2 : mammalian Target of Rapamycin Complex 2
mLST8 : mammalian Lethal with SEC13 protein 8
MYC: Facteur de Transcription Oncogénique
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NF1 : Neurofibromatosis Type 1
PDGFR- β : Platelet-Derived Growth Factor Receptor β
PDH : Pyruvate Deshydrogenase
PTEN : Phosphatase and TENs
PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma Coactivator-1alpha
PIC : Pre Initiation Complex
PKM2 : pyruvate kinase M2
RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (Protein serine kinase)
RPS6 : Ribosomal Protein S6

RAS : Rat Sarcoma virus (Protein GTPase)

Raptor : Regulatory-associated protein of mTOR

RPS6KB : Ribosomal Protein S6 Kinase beta

Rictor: Rapamycin-insensitive companion

SIRT4 : Sirtuine 4

SIN1: Stress-activated protein kinase Interacting protein 1

SLC25A1 : Solute Carrier Family 25 A1

SCAD ou ACADS : ACAD à chaîne courte

SOS : Son of Sevenless homolog 1

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TCA : tricarboxylic acid cycle, Cycle de l'acide citrique ou Cycle de Krebs

TFAM : Mitochondrial Transcription Facteur A

UTR: Untranslated Region

VLCAD ou ACADVL : ACAD à chaîne très longue

40S : Ribosomal subunit 40S

60S : Ribosomal subunit 60S

80S : Initiation complexe 80s

Remerciements

D'abord et avant tout, je tiens à remercier ma directrice de recherche Dre Hulea Laura pour m'avoir donné l'occasion de travailler sur ce projet, pour m'avoir soutenu et encouragé, pour avoir été présente et si généreuse de son temps et de ses conseils. Merci beaucoup Laura. Je suis chanceuse d'avoir travaillé dans votre laboratoire. Merci aux merveilleux membres du laboratoire : Dre Zaynab Nouhi pour tous les conseils et l'aide qu'elle m'a offerte. Dr Alejandro Schcolnik-Cabrera et Dr Caroline Capdeville ainsi que Victor Gife pour tous les apprentissages et l'encadrement, l'assistance et les conseils qu'ils m'ont donnés. Je remercie également tous les membres du jury qui évalueront et apprécieront mon humble travail. Enfin, je ne serais jamais arrivée à ce que je suis aujourd'hui sans le soutien de mes parents, de mon mari, de mes chères sœurs et de mon cher frère. Papa, maman, merci beaucoup d'avoir été toujours présents à mes côtés, de me soutenir, de m'écouter et de me redonner espoir à chaque fois. Mon cher mari Youcef, merci beaucoup pour ton aide, pour ton écoute et surtout pour ta présence. Ma chère sœur Zineb, tu as été ma bouée de secours, tu m'as sauvé à chaque noyade, merci d'avoir été à mes côtés, de m'avoir écouté et de m'avoir soutenu durant tout mon parcours. Ma chère sœur Amel et mon cher frère Amine, même de loin vous avez toujours été présents pour m'encourager et me féliciter pour les actes que je fais, merci beaucoup à vous deux. Je tiens aussi à remercier mes petites chéries d'amours Sirine et Nesrine, mes adorables filles, d'avoir embelli ma vie et de l'avoir rendue si joyeuse. Je remercie également du fond du cœur mes beaux-parents pour m'avoir soutenu durant toute la période de ma formation.

Merci beaucoup à tous!

Contribution :

Ce projet a été réalisé avec la collaboration de Dr Alex Schcolnik-Cabrera (Post-doctorat au laboratoire de la Dre Hulea) et Dre Zaynab Nouhi (Associé de recherche au laboratoire de la Dre Hulea) ainsi que les plateformes de la cytométrie en flux et de la microscopie du Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve Rosemont. Dans ce mémoire, j'ai réalisé une bonne partie des expériences présentées à l'exception des expériences ou parties d'expériences suivantes : Le profilage de polysome et une partie des western blots a été réalisé par la Dre Z. Nouhi. Le Seahorse, la GCMS, le FACS, les courbes de croissance des cellules A375 et A375R traitées aux quatre inhibiteurs de eIF4A, le traitement des cellules de la puromycilation ainsi qu'une partie des Western blots ont été réalisés par Dr A. Schcolnik-Cabrera. J'ai contribué à ces expériences par la réalisation des contrôles de viabilité cellulaire (comptage et courbe de croissance), de l'extraction des protéines et des contrôles de l'efficacité des drogues (western-blots). Les figures, les analyses et les tests statistiques ont été réalisés en partie avec la collaboration de Dr A. Schcolnik-Cabrera.

Ce projet a été réalisé sous la supervision et les conseils de la Dre Laura Hulea.

Chapitre 1 : Introduction

Le cancer constitue la principale cause de mortalité dans le monde. Au Canada le taux de mortalité lié au cancer est estimé à 30% de tous les décès selon la Société Canadienne du cancer. Malgré les progrès apportés par les thérapies anticancéreuses ciblées, beaucoup de patients récidivent et souffrent encore à cause de la résistance qu'ils développent vis-à-vis à ces traitements. Cette résistance constitue ainsi un problème clinique majeur qui affecte la survie et le bien-être des patients et qui détériore leur mode de vie.

1. La synthèse protéique et le métabolisme cellulaire soutiennent la survie et la croissance cellulaire:

Les cellules de l'organisme endurent de nombreux stress et dommages qui menacent leur survie. Elles doivent mettre en œuvre des mécanismes leur permettant de faire face à toutes ces menaces, c'est pourquoi elles se mettent à croître et à se diviser. Cette croissance et division cellulaires sont cependant exagérées et non contrôlées dans les cellules cancéreuses et nécessitent un grand approvisionnement en biomasse et en énergie que les cellules se procurent à partir des principaux phénomènes biologiques. En effet, la synthèse protéique et le métabolisme cellulaire constituent deux phénomènes cruciaux pour la survie, la croissance et la réplication cellulaire. Ils fournissent à la cellule ce dont elle a besoin en matière de macromolécules et d'énergie au cours de son processus prolifératif.

1.1. La synthèse protéique et le complexe d'initiation de la traduction

eIF4F :

1.1.1. La traduction d'ARNm :

La traduction d'ARNm est un mécanisme que les cellules utilisent pour transformer l'information codée par la séquence d'ARN messager en une séquence polypeptidique (1). Ceci assure le passage de l'information génétique de la forme d'acide nucléique (alphabet à 4 lettres) à la forme de protéine (alphabet à 20 lettres) selon le code génétique qui attribue à chaque codon, soit un triplet de bases nucléiques, un acide aminé ou un signe d'arrêt de la traduction (2). Ce processus permet de synthétiser toutes les protéines dont la cellule en a besoin, notamment

celles qui sont cruciales pour la croissance, la survie, la différenciation ainsi que la prolifération cellulaire (1, 3). C'est un phénomène hautement régulé qui ajoute un niveau additionnel de contrôle à l'expression génique par le changement immédiat des niveaux protéiques nécessaires à l'adaptation aux différents états cellulaires tels que le stress, la réplication et la différenciation (4, 5). Ainsi, le contrôle du niveau de certaines familles de protéines particulièrement indispensables pour les cellules cancéreuses permet d'établir une fenêtre thérapeutique potentielle ciblant ces cellules, tout en épargnant les cellules saines (6).

La synthèse protéique est un processus compris de trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Elle fait intervenir plusieurs composantes qui se mettent ensemble pour former les complexes requis pour le déroulement de ce processus (1). Parmi ces composantes, il y a l'ARNm, les ribosomes, les ARNt, les acides aminés ainsi que les facteurs d'initiation et les facteurs d'élongation de la traduction (**Figure 1.1**) (1).

La régulation de la traduction d'ARNm est soutenue par plusieurs mécanismes moléculaires spécifiques à chacune de ces trois étapes (1, 4). L'initiation de la traduction constitue l'étape limitante de ce processus. Elle fait appel à un ensemble de facteurs de traduction, dont les facteurs d'initiation (eIF1, eIF1A, eIF2 α et eIF3) et les composantes du complexe d'initiation eIF4F (eukaryotic Initiation Factor 4F) (7, 8). En effet, le facteur eIF2 α actif recrute l'ARNt_{Met} et s'associe aux facteurs eIF1, eIF1A et eIF3 et à la petite sous unité ribosomale 40S pour former le complexe de pré initiation 43S (PIC). En parallèle, les composantes du complexe d'initiation de la traduction eIF4F, soit les facteurs eIF4A, eIF4E et eIF4G se lient à la coiffe de l'ARNm et s'associent au PIC. À cette étape, le complexe 43S-ARNm formé, balaye l'ARNm de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' jusqu'au codon de départ (AUG). La reconnaissance du codon de départ (codon de l'acide aminé méthionine) induit l'attachement de l'ARNt_{Met} à l'ARNm et la libération des facteurs eIFs suivi du recrutement de la grande sous unité ribosomale pour former un monosome (8, 9) (**Figure 1.1**). Lorsque cet assemblage est fait, un second ARNt chargé de l'acide aminé correspondant au deuxième codon de l'ARNm vient s'y attacher et permet d'établir la première liaison peptidique (8, 9). Le complexe ribosomal transloque sur l'ARNm et l'étape d'élongation s'amorce par l'ajout d'un autre ARNt chargé de l'acide aminé correspondant au troisième codon ainsi que des facteurs spécifiques d'élongation permettant de générer une deuxième liaison

peptidique toute en libérant les ARNts en amont. Les translocations du complexe ribosomal se poursuivent avec l'ajout séquentiel d'acides aminés à la chaîne polypeptidique jusqu'à la terminaison (8). Cette dernière a lieu lorsque le complexe ribosomal arrive à l'un des trois codons stop reconnu par un facteur de relargage qui vient s'y associer au site de liaison de l'ARNt et entraîne ainsi l'arrêt de la translocation du complexe, la dissociation du dernier ARNt et des sous unités ribosomales et la libération du polypeptide (**Figure 1.1**) (8, 10). La synthèse protéique est un processus très énergivore et l'hydrolyse des nucléotides triphosphates "ATP" ou "GTP" en nucléotide diphosphate "ADP" ou "GDP" permet de fournir l'énergie requise au cours des différentes étapes de ce processus (11).

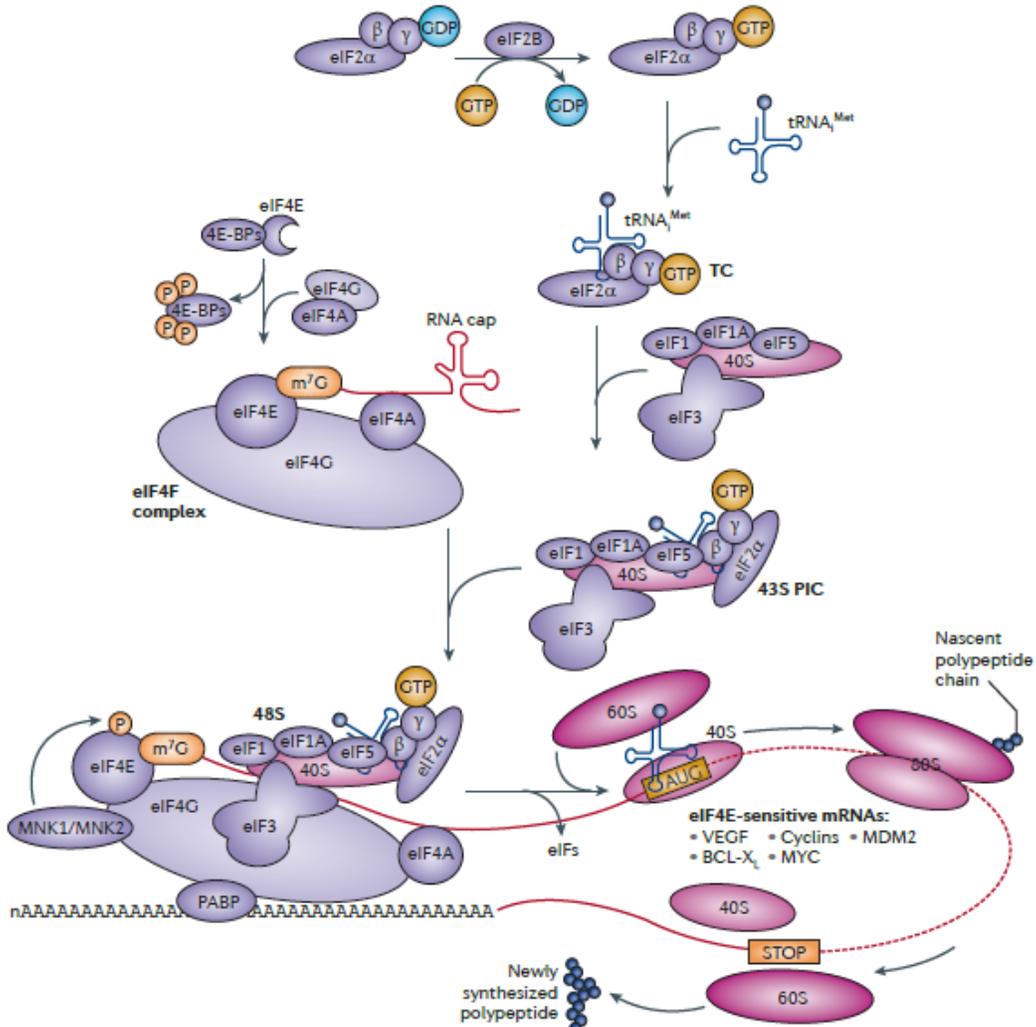


Figure 1.1. Aperçu du processus de la traduction d'ARNm eIF4F dépendants (adaptée de M. Bhat et al., 2015).

Après son activation, le facteur eIF2 α recrute l'ARNt_{Met} et s'associe aux facteurs d'initiation (eIF1, eIF1A et eIF3) et à la sous unité ribosomale 40S pour former le complexe de pré initiation 43S (PIC). Le complexe d'initiation de la traduction eIF4F se lie à la coiffe de l'ARNm puis s'associe au PIC pour former le complexe 43S-ARNm. Ce dernier se met à balayer l'ARNm du 5' au 3' jusqu'au codon de départ (AUG). La reconnaissance de ce codon induit la libération des eIFs suivi du recrutement de la sous-unité ribosomale 60S pour former un monosome 80S. Ceci induit la phase d'élongation de la traduction. Le monosome 80S transloque au long de l'ARNm et donne

naissance à un polypeptide par la liaison successive des acides aminés correspondants aux codons de l'ARNm jusqu'à ce que le complexe atteint le codon STOP. Ceci amorce la phase de terminaison, le polypeptide est relâché et le complexe ribosomal se dissocie en petite sous unité 40S et grande sous unité 60S qui seront recyclées pour reformer un autre complexe ribosomal à l'extrémité 5' de l'ARNm. Figure adaptée de (8).

1.1.2. Le complexe d'initiation de la traduction eIF4F (eukaryotic Initiation Factor 4F):

Dans les cellules eucaryotes, les ARNm matures sont marqués à leurs extrémités 5' non traduites (5'UTR) par une structure particulière appelée "la coiffe" (12). Celle-ci joue un rôle important dans la stabilité des ARNm, leur transport au cytoplasme, et surtout, leur recrutement pour la traduction dépendante de la coiffe (*cap-dependent translation*) (12). En effet, l'étape d'initiation de la traduction commence par l'interaction de cette coiffe avec les facteurs d'initiation qui se regroupent sous forme de complexes, dont le complexe d'initiation de la traduction 4F "eIF4F" (eukaryotic Initiation Factor 4F) (7, 12). Ce dernier comprend trois facteurs: i) eIF4G : une grosse protéine d'échafaudage qui maintient les facteurs du complexe d'initiation de la traduction en place (7, 9); ii) eIF4E : un composant essentiel pour la reconnaissance de la coiffe à l'extrémité 5'UTR de l'ARNm et dont l'activité est régulée par plusieurs voies de signalisation notamment la voie PI3K/mTOR (phosphatidylinositol-3 kinase / mammalian Target Of Rapamycin) et la voie MAPK (Mitogene Activated Protein Kinase) (7, 13) qui modulent la liaison des partenaires protéiques inhibiteurs de ce facteur : 4E-BP (eIF4E binding protein) et 4E-T (eIF4E transporter) (7, 9); iii) eIF4A : une protéine hélicase qui catalyse l'ouverture des structures secondaires à l'extrémité 5'UTR de l'ARNm. eIF4A est une protéine ATP dépendante qui appartient à la famille DEAD Box. Son activité est régulée par son association aux facteurs eIF4G ou eIF4B, qui est modulée par différentes voies de signalisation dont la voie MAPK et la voie mTOR (7, 13).

Les besoins protéiques varient selon les types et les états cellulaires. Contrairement aux cellules cancéreuses, de nombreux types de cellules normales n'ont que des besoins protéiques de base, majoritairement restreints aux protéines de survie et d'entretien. Afin de subvenir à ces

besoins protéiques de base, la machinerie traductionnelle de ces cellules ne nécessite que de faibles niveaux du complexe d'initiation de la traduction eIF4F, suffisants pour assurer la traduction d'ARNm codant certaines protéines mitochondriales, les protéines constitutives et les protéines d'entretien (housekeeping proteins) (14). En effet, les ARNm codant certaines protéines mitochondriales, comme les protéines de la chaîne de transfert d'électron, possèdent généralement des extrémités 5'UTR très courtes (moins de 40 nucléotides) et ne sont qu'accessoirement affectés par les variations du niveau du complexe eIF4F (14). Les ARNm codant les protéines constitutives comme l'actine, possèdent quant à eux des extrémités 5'UTR non-structurées optimales (70-150 nucléotides) et ne sont également pas très dépendants d'un haut niveau du complexe eIF4F (14, 15). En revanche, dans les cellules à grand potentiel prolifératif comme les cellules cancéreuses, les besoins protéiques s'élargissent aux protéines essentielles au développement tumoral et aux proto-oncogènes comme les protéines du cycle cellulaire, les facteurs de croissance et les facteurs pro-angiogéniques (7, 16-18). Ces protéines sont majoritairement codées par des ARNm à extrémités 5'UTR très longues (plus de 200 nucléotides) et de structure très complexe et requièrent des niveaux élevés du complexe eIF4F (7, 9) afin d'assurer le dépliement de leurs extrémités 5'UTR en structure primaire. Ces cellules recourent donc à l'activation de leurs voies de signalisation prolifératives et anaboliques qui convergent souvent à l'hyperactivation des voies MAPK et mTOR (6) conduisant à une augmentation du niveau et de l'activité du complexe d'initiation de la traduction eIF4F et donc à la traduction d'ARNm codant pour ces protéines (7).

1.1.3. Les mécanismes de régulation de la traduction et du complexe eIF4F :

La formation et l'activité du complexe d'initiation de la traduction eIF4F est induite et modulée par deux cascades de signalisation : i) la voie AKT/PI3K/mTOR et ii) la voie MAPK comprise des protéines kinase RAS/RAF/MEK/ERK.

Le complexe protéique mTOR peut intégrer deux complexes distincts : mTORC1 et mTORC2. Chacun des deux complexes est régulé par différents stimuli et contrôle à son tour des processus cellulaires et métaboliques distincts (19, 20). Le complexe mTORC1 est composé de la

protéine mTOR, la protéine associée à la régulation de mTOR (RAPTOR), la protéine mammalienne létale 8 (mLST8) et la protéine d'interaction mTOR contenant le domaine DEP (DEPTOR). Il est régulé par plusieurs voies de signalisation. Il intègre les signaux de plusieurs facteurs de croissance, nutriments et apports énergétiques afin de favoriser la croissance cellulaire ou le catabolisme dépendamment de l'état énergétique de la cellule. Il contrôle principalement la croissance et le métabolisme cellulaires. mTORC1 constitue un régulateur clé de l'initiation et de l'élongation de la traduction (21, 22). Il se trouve à la convergence de la cascade des protéines kinase AKT et PI3K. À l'état actif, mTORC1 catalyse la phosphorylation des facteurs eIF4B et 4E-BP, partenaires potentiels des facteurs eIF4A et eIF4E respectivement, libérant ces derniers et les rendant ainsi disponibles pour la formation du complexe eIF4F (4). L'activation de la voie mTORC1 induit donc une augmentation du niveau et de l'activité du complexe eIF4F permettant ainsi la traduction spécifique des ARNm mTORC1/eIF4F dépendants qui sont souvent associés à des processus pro-oncogéniques (18, 23). Les facteurs eIF4B et 4E-BP, partenaires protéiques de eIF4A et eIF4E, ainsi que la protéine S6K (Protein S6 Kinase), représentent les médiateurs les plus connus des effets de mTORC1 concernant son rôle dans la régulation de la synthèse protéique (24). Quant au complexe mTORC2, il est composé de la protéine mTOR, d'un compagnon insensible à la Rapamycine (Rictor), de la protéine kinase 1 d'interaction au stress (SIN1), de mLST8 et de DEPTOR (20). Les signaux activateurs et les mécanismes impliqués dans la régulation de ce complexe sont moins bien compris comparés au complexe mTORC1 (25). Il est cependant impliqué principalement dans le contrôle de la prolifération, la survie, le métabolisme, l'organisation du cytosquelette et la migration cellulaire (19, 26, 27).

La voie MAPK est une voie centrale qui régule la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (28). Elle comprend la cascade des kinases : **RAS** (Protéine GTPase) / **RAF** (protéine sérine-thréonine Kinase) / **ERK** (Extra cellular signal-regulated kinases-sérine-thréonine kinase activée par un mitogène) (**Figure 1.2**). Elle est activée, entre autres, par l'engagement des récepteurs tyrosine kinases et la transphosphorylation de leurs domaines intracellulaires qui mènent à l'activation de la GTPase RAS via l'échange du GDP en GTP par la protéine SOS (facteur d'échange des nucléotides guanyliques (GEF) de la petite protéine G, RAS) (29). RAS activée recrute et active la kinase RAF, qui se dimérise et active à son tour la kinase MEK. Celle-ci

phosphoryle ERK, une protéine sérine-thréonine kinase, qui phosphoryle et active à son tour les protéines kinases MNK1/2 (30). Celles-ci jouent un rôle important dans la régulation de l'initiation de la traduction via la phosphorylation du facteur eIF4E, inhibant ainsi la formation du complexe eIF4F (30). Parallèlement, ERK phosphorylé peut transloquer dans le noyau et y phosphoryler certains substrats contrôlant différentes autres fonctions cellulaires (30).

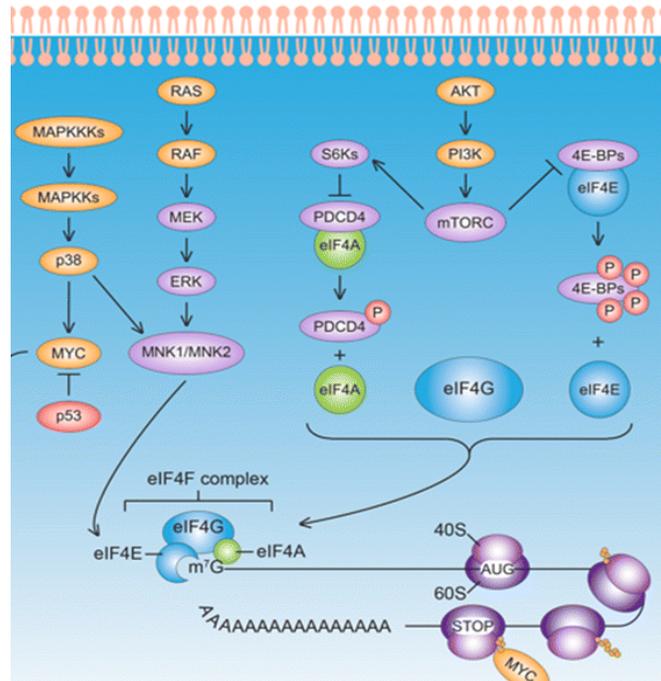


Figure 1.2. Schéma représentatif des voies de signalisation oncogènes MAPK et PI3K/mTOR qui modulent la régulation de l'appareil traductionnel (adaptée de Steinberger et al. 2017)

La formation du complexe d'initiation de la traduction eIF4F est induite par la cascade de signalisation AKT/PI3K/mTOR ainsi que la voie MAPK comprise des protéines kinases RAS/RAF/MEK/ERK/MNK 1 et 2. Figure adaptée de (31).

1.2. Le métabolisme cellulaire et les principales sources d'énergie et de biomasses :

Le métabolisme cellulaire est un ensemble de réactions biochimiques, catalysées par des enzymes spécifiques, qui permet à la cellule de transformer les nutriments et les substrats obtenus de son milieu ou contenus dans ces différents compartiments afin de produire l'énergie et les éléments dont elle a besoin pour assurer son fonctionnement et sa survie (32, 33). En effet,

la cellule puise de son milieu extracellulaire les différents nutriments (glucose, acides aminés, acides gras). Une fois introduits dans la cellule, ces nutriments sont soit utilisés directement, soit transformés en métabolites et en énergie, stockée principalement sous forme de nucléosides triphosphates (ATP, GTP), que la cellule utilise pour ses nombreuses fonctions. Le métabolisme cellulaire est un réseau complexe composé d'un grand nombre de réactions biochimiques interconnectées. Ce réseau est réparti en sous-groupes de réactions enzymatiques qui se succèdent et partagent un rôle commun. Ces sous-groupes de réactions sont appelés "voies métaboliques" (32).

1.2.1. Les principales voies métaboliques de la cellule:

Parmi les principales voies métaboliques impliquées dans la production d'énergie et dans la survie cellulaire, nous discuterons : la glycolyse, le cycle de l'acide citrique (TCA), la phosphorylation oxydative, la β -oxydation des acides gras et le métabolisme des acides aminés.

a. La glycolyse:

La glycolyse est un ensemble de réactions d'oxydation des molécules de glucose (glucide à six carbones) introduites du milieu extracellulaire dans le cytosol par diffusion facilitée via des transporteurs de glucose ou par transport actif assuré par les protéines de symport transmembranaires (34). La glycolyse comprend une série de neuf réactions biochimiques catalysées par des enzymes spécifiques qui consomment deux molécules d'ATP et en produisent quatre en plus de deux molécules de NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) et deux molécules de pyruvates (Glucide à trois carbones) par molécule de glucose (**Figure 1.3**) (34). Le pyruvate peut ensuite être introduit dans la mitochondrie pour alimenter le cycle de l'acide citrique suivi de la phosphorylation oxydative en état d'aérobie ou rester dans le cytoplasme pour servir de précurseur pour d'autres réactions, dont la conversion en lactate lors de la fermentation en état d'anaérobie (34).

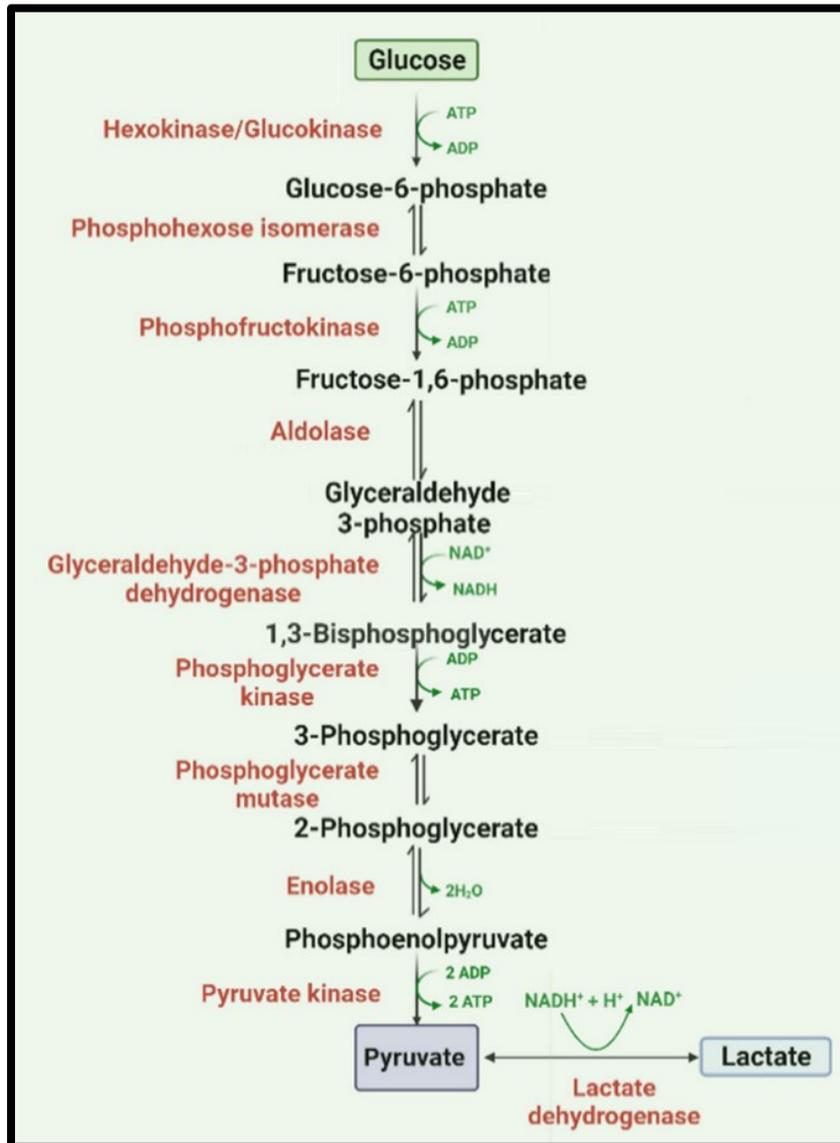


Figure 1.3. Schéma représentatif de la glycolyse (adaptée de Alramadhani, D. et al. 2022)

Le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate par la glucokinase puis transformé en fructose-6-phosphate par la phosphohexose isomerase. Le fructose-6-phosphate est phosphorylé par la phosphofructokinase en fructose-1,6-phosphate qui est catalysé en glyceraldehyde-3-phosphate par l'aldolase. Le glyceraldehyde-3-phosphate est déshydrogéné en 1,3-bisphosphoglycérate puis phosphorylé en 3-phosphoglycérate. Ce dernier est transformé en 2-phosphoglycérate par la mutase puis en phosphoenolpyruvate par l'énolase. Le

phosphoenolpyruvate est ensuite clivé en deux molécules de pyruvate par la pyruvate kinase. Figure adaptée de (35).

b. Le cycle de l'acide citrique (TCA):

Le cycle de l'acide citrique, aussi appelé cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques (TCA), est compris d'une série de réactions ayant lieu dans la mitochondrie (36). Il est alimenté entre autres par : i) le pyruvate issu de la glycolyse et converti en Acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH), ii) par le glutamate issu du métabolisme de la glutamine via la glutaminase 1 et 2 "GLS" et "GLS2" et converti en α -cétoglutarate via la glutamate déshydrogénase 1 et 2 "GDH1/2" expliqué dans les détails plus bas (37) ou iii) par le citrate présent dans le milieu ou issu de la navette malate-citrate (38) et introduit dans la mitochondrie via des protéines transmembranaires telles que la SLC25A1 (Solute Carrier Family 25 Member 1) (38). Ce cycle comprend une dizaine de réactions enzymatiques catalysant la conversion de ses métabolites intermédiaires, dont le citrate, l'isocitrate, l' α -cétoglutarate, le succinyl-CoA, le succinate, le fumarate, le malate et l'oxaloacetate (**Figure 1.4**) (36). Il assure principalement le catabolisme des résidus acétylés, sous forme d'Acétyl-CoA, en libérant des équivalents hydrogènes (NADH et FADH₂) dont l'oxydation par les réactions de la chaîne respiratoire permet de libérer la plus grande partie d'énergie cellulaire stockée sous forme de molécules d'ATP (36).

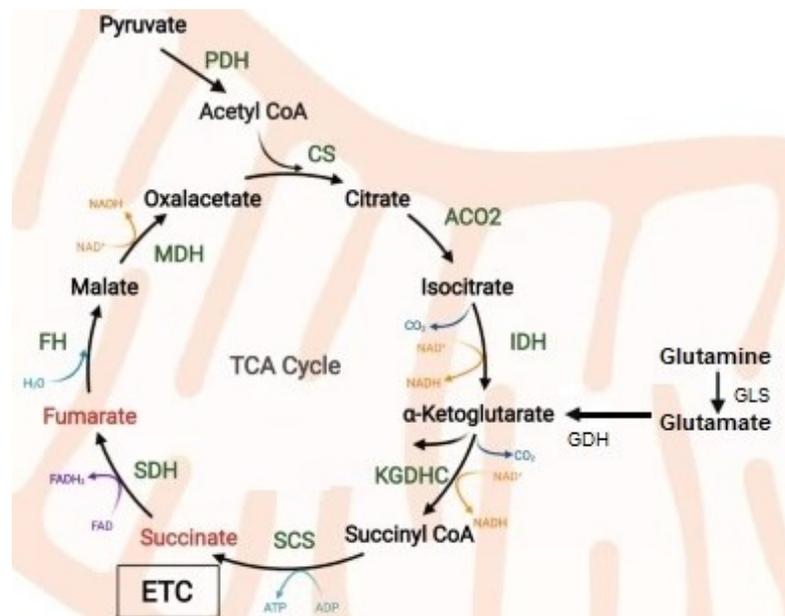


Figure 1.4. Schéma représentatif des réactions du cycle TCA (adaptée de Sainero-Alcolado, L. et al. 2022).

Le Pyruvate dérivé du glucose pénètre dans la mitochondrie ou il est converti en Acétyl-CoA via la Pyruvate Déshydrogénase (PDH). L'Acétyl-CoA est converti en Citrate via la Citrate Synthase (CS). Le Citrate est transformé en Isocitrate par l'Aconitase 2 (ACO2). L'Isocitrate est transformé en α -cétooglutarate via l'Isocitrate Déshydrogénase (IDH). Cet α -cétooglutarate en plus du α -cétooglutarate dérivé de la Glutamate par la Glutamate Déshydrogénase (GDH) est converti en Succinyl-CoA via le complexe α -cétooglutarate déshydrogénase (KGDHC). Le Succinyl-CoA est ensuite converti en Succinate via la Succinyl-CoA Synthétase (SCS). Le Succinate est converti en Fumarate via la Succinate déshydrogénase (SDH). Le fumarate est converti en Malate via la Fumarate Hydratase (FH). Le Malate est converti en Oxaloacétate via la Malate Déshydrogénase (MDH). L'Oxaloacétate est converti en Citrate via la Citrate Synthase (CS) et le cycle reprend. Les NADH et FADH₂ produits alimentent par la suite la chaîne de transfert l'électrons (ETC). Figure adaptée de (39).

c. La phosphorylation oxydative:

La phosphorylation oxydative est le principal processus cellulaire qui assure la génération de molécules d'adénosine triphosphate (ATP) (40). Il s'agit d'une série de réactions d'oxydoréduction aboutissant à la formation de liaison phosphate à haute énergie (40). Cette oxydoréduction implique le transfert d'électrons du NADH et du FADH₂ vers les molécules d'oxygène à travers un ensemble de complexes protéiques, métalliques et lipidiques localisés au niveau de la membrane mitochondriale et qui constituent la chaîne de transport d'électrons, aussi connue sous le nom de la chaîne respiratoire (**Figure 1.5**) (40). Cette dernière utilise les molécules de NADH et FADH₂ générées à partir d'autres processus cellulaires cataboliques, dont la glycolyse et le cycle de l'acide citrique, et se sert de l'oxygène élémentaire comme agent oxydant, accepteur final d'électrons (40). Le rendement de la phosphorylation oxydative en production d'énergie est très significatif comparé à la glycolyse. En effet, la chaîne de transport d'électrons permet de générer 30 à 32 molécules d'ATP tandis que la glycolyse ne génère que deux molécules d'ATP à partir d'une molécule de substrat (glucose) (40). La chaîne de transport d'électrons est

comprise de cinq complexes. Les complexes I, II, III et IV sont constitués d'enzymes qui catalysent les réactions d'oxydation et de réduction permettant le transfert en série d'électrons et menant à la génération d'une force motrice par processus de chimiosmose (pompage d'ions hydrogène dans l'espace intermembranaire secondaire au transfert d'électrons réduits vers l'oxygène) (41, 42). Le complexe V, appelé "ATP synthase", exploite cette force motrice pour générer des liaisons phosphates équivalentes en énergie stockée sous forme d'ATP (40, 42). Ces complexes sont formés de plusieurs domaines. Chaque domaine comprends plusieurs sous unités protéiques dont la NADUFA8 (NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A8) et la NDUFB8 (NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit B8) impliquées dans l'assemblage du complexe I et ayant une fonction déshydrogénase et oxydoréductase (43, 44).

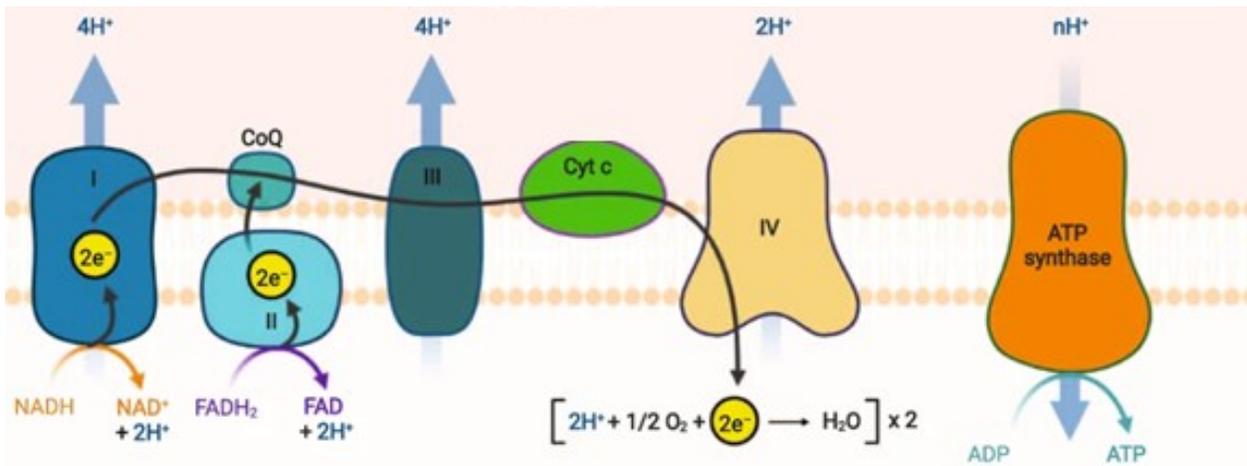


Figure 1.5. Schéma représentatif de la Chaîne de transport d'électrons (adaptée de Sainero-Alcolado, L. et al. 2022)

La chaîne de transport d'électrons est comprise de cinq complexes protéiques transmembranaires : Complexe I (I), Complexe II (II), Complexe III (III), Complexe IV (IV), Complexe V (ATP synthase) en plus de l'ubiquinone (CoQ) et du Cytochrome C (Cyt C). Figure adaptée de (39)

d. Le métabolisme des acides aminés:

Selon la capacité de l'organisme à les synthétiser ou non, les acides aminés sont classés en deux catégories : les acides aminés non essentiels et les acides aminés essentiels. Ces

molécules ont, en plus de leur rôle d'unité fondamentale de la synthèse protéique, plusieurs fonctions dans la cellule. En effet, elles représentent un réservoir de groupements réactifs (amine, thiol, méthyle ...), elles alimentent plusieurs voies métaboliques, dont le cycle TCA, et constituent des métabolites cruciaux pour d'autres comme la biosynthèse des nucléotides (45). Le métabolisme des acides aminés implique plusieurs voies, notamment la voie du métabolisme de la glutamine qui comprend la synthèse de la glutamine, la glutaminolyse et les voies du métabolisme de la glutamate, un des précurseurs clés des processus bioénergétiques (**Figure 1.6**) (46). La glutamine est un acide aminé non essentiel, crucial pour le fonctionnement de multiples types de tissus (46). Elle est synthétisée à partir du glutamate par la glutamine synthétase (GS) (47) et hydrolysée en glutamate par la glutaminase GLS (L-glutamine aminohydrolase) contenue dans les mitochondries. Cette enzyme est exprimée dans les cellules sous forme de deux isoformes : la glutaminase rénale GLS1 (aussi connue par GLS) et la glutaminase hépatique GLS2 (aussi connue par LGA) (46). Le glutamate quant à lui, il est généralement produit par l'amination réductrice du α -cétoglutarate, un intermédiaire du cycle TCA, catalysé par la glutamate déhydrogénase (GDH ou GLUD1) (48) en utilisant l'azote provenant de l'ammonium (37); ou par la glutamate synthase (GltS) en utilisant l'azote provenant de la glutamine (37).

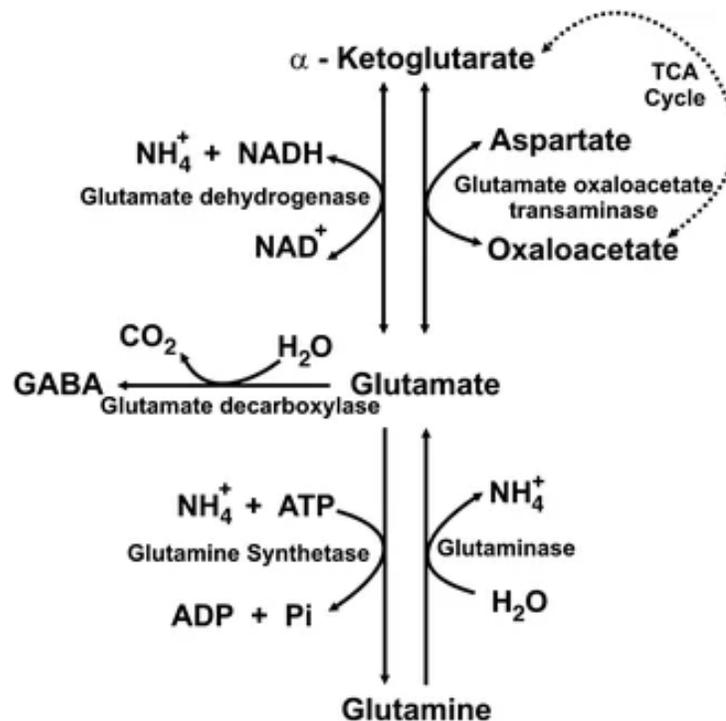


Figure 1.6. Schéma représentatif du métabolisme de la glutamine et du glutamate (adaptée de Öz, G. et al. 2012)

La Glutamine est convertie en glutamate par la Glutaminase et régénérée à partir de cet acide aminé par la Glutamine Synthétase. Ces deux réactions utilisent l'ammonium comme donneur et accepteur d'azote. En plus de générer la Glutamine, le Glutamate est métabolisé en GABA via la Glutamate Décarboxylase, et en α -cétoglutarate via la Glutamate Déshydrogénase alimentant ainsi le cycle TCA. Figure adaptée de (49).

e. La β -oxydation des acides gras:

La β -oxydation des acides gras se définit comme une séquence répétitive de quatre réactions enzymatiques, appelée la spirale de Lypen, aboutissant à la conversion des acides gras en molécules d'acétyl-CoA (**Figure 1.7**) (50, 51). Ces derniers alimentent par la suite le cycle TCA qui permet de générer des équivalents hydrogénés (NADH et FADH₂). Ces équivalents en plus de ceux produits par les réactions de déshydrogénation de l'hélice de Lypen alimentent à leurs tours la chaîne de transfert d'électrons (**Figure 1.7**). Il s'agit ainsi d'une autre source à haut rendement énergétique (51). Dans le cytoplasme, les acides gras sont activés en Acyl-CoA par des Acyl-CoA Synthétase (ACS). Ces enzymes catalysent la liaison des acides gras à la Coenzyme-A pour former des thioesters d'Acyl-CoA par une réaction de Thio-estérification comprise de deux étapes (50, 52). Ils sont classés en fonction de la longueur de leur substrat en ACS à chaîne courte, ACS à chaîne moyenne, ACS à chaîne longue et ACS à chaîne très longue (53). Parmi ceux-ci, il y a la Acyl-CoA Synthetase Family member 2 (ACSF2) qui active préférentiellement les acides gras à chaîne moyenne et qui se distingue des autres ACS par sa localisation mitochondriale dans certains types cellulaires notamment dans les fibroblastes cutanés (53). Après cette activation, les résidus acyl-CoA sont transférés dans la matrice mitochondriale par le système carnitine (50, 54). Ils subissent une réaction de déshydrogénation catalysée par les acyl-CoA déshydrogénases (ACAD) mitochondriales. Ces enzymes catalysent l'induction d'une double liaison en position C2 de l'acyl-CoA, produisant ainsi le 2-énoyl-CoA, un esters CoA insaturé, et des équivalents réducteurs qui seront transférés à la chaîne de transfert d'électrons (50). Tout comme les acyl-CoA synthétases (ACS), les acyl-CoA déshydrogénases (ACAD) sont classés en fonction de la longueur de leur substrat en ACAD à chaîne courte (SCAD ou ACADS), à chaîne moyenne (MCAD ou ACADM), à

chaîne longue (LCAD ou ACADL) et à chaîne très longue (VLCAD ou ACADVL) (55, 56). La double liaison de l'énoyl-CoA est ensuite hydratée par l'énoyl-CoA Hydratase (ECH) et génère un dérivé hydroxy-acyl-CoA qui sera ensuite catalysé en 3-cétoacyl-CoA par la hydroxy-acyl-CoA Déshydrogénase (HADH). Enfin, le clivage de la chaîne de ce 3-cétoacyl-CoA par la thiolase génère un résidu acétyl-CoA et un ester d'acyl-CoA plus court de deux carbones qui fera l'objet d'un autre cycle de β -oxydation (Figure 1.7) (50).

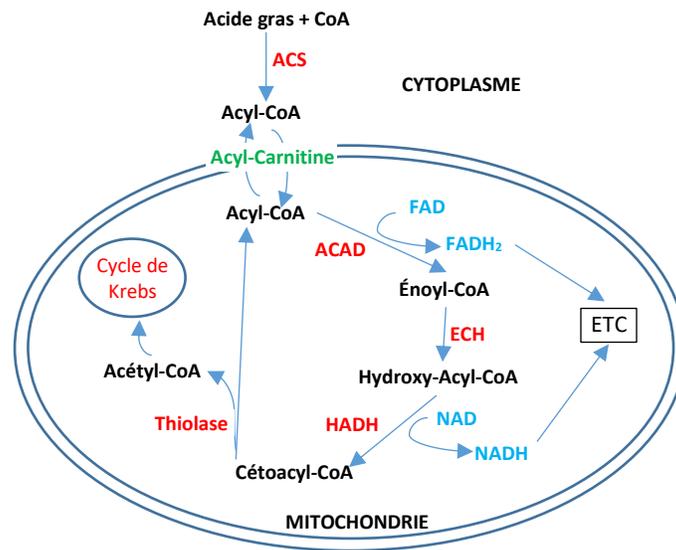


Figure 1.7. Schéma représentatif de la Béta-oxydation des acides gras (générée dans Word, adaptée de Ravindranath A. et al 2022)

Les acides gras sont activés en acyl-CoA via l'acyl-CoA synthétase (ACS) puis l'acyl-CoA est transféré dans la matrice mitochondriale via le système acyl-carnitine. L'acyl-CoA est déshydrogéné en énoyl-CoA via l'acyl-CoA déshydrogénase (ACAD). L'énoyl-CoA est hydraté en hydroxy-acyl-CoA via l'énoyl-CoA hydratase (ECH) puis déshydrogéné en cétoacyl-CoA via l'hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase (HADH). Le cétoacyl-CoA est ensuite converti via la thiolase en acétyl-CoA qui alimente le cycle TCA et en acyl-CoA à deux carbones de moins qui reprend le cycle de la Béta oxydation. Les équivalents hydrogénés ($FADH_2$ et $NADH$) produits alimentent la chaîne de transport d'électrons (ETC). Figure adaptée de (57).

1.2.2. La régulation des principales voies métaboliques modulée par le complexe mTORC1-eIF4F :

En fonction de la disponibilité des nutriments et des besoins cellulaires en énergie, en biomasse et en facteurs de croissance (58-61), le complexe mTORC1 module différents processus cellulaires, notamment la synthèse protéique, l'homéostasie des acides aminés, le métabolisme du glucose et de la glutamine, le métabolisme des lipides, la synthèse des nucléotides et la voie des pentoses phosphates (**Figure 1.8**) (24, 62, 63).

Le complexe mTORC1 stimule la glycolyse, en partie, par la régulation traductionnelle de certains facteurs tels que le facteur de transcription MYC et le facteur HIF1A (Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha) (62, 64) et en autre partie, par la phosphorylation de STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) qui aboutit à l'accumulation de la protéine HIF1A en état d'hypoxie (6). La régulation traductionnelle de HIF1A a lieu via la modulation des facteurs 4E-BP et RPS6KB (Ribosomal Protein S6 Kinase Beta) qui contrôlent à leurs tours le niveau et l'activité du complexe eIF4F (6). Tous les deux, la protéine HIF1A et le facteur de transcription MYC stimulent le flux cellulaire du glucose en régulant à la hausse l'expression et l'activation des transporteurs membranaires et des protéines glycolytiques telles que la lactate déshydrogénase (LDHA), l'hexokinase et la pyruvate kinase M2 (PKM2) (6, 65-67).

Le complexe mTORC1 régule aussi le métabolisme des acides aminés qui constitue également une importante source d'énergie, notamment la glutamine, l'un des acides aminés les plus disponibles et facilement accessibles (68, 69). En effet, mTORC1 active la GLS d'un côté, et stimule ainsi la glutaminolyse aboutissant à la production du glutamate qui sera converti en α -cétoglutarate par la GDH et alimentera le cycle TCA (48). D'un second côté, mTORC1 régule à la hausse le niveau de la GLS en augmentant l'expression de ces transporteurs transmembranaire qui est modulée par le facteur MYC dépendant à son tour du complexe mTORC1-eIF4F (48). D'un troisième côté, mTORC1 induit indirectement la répression du facteur SIRT4 (Sirtuine 4), un inhibiteur de la GDH, par la dégradation du facteur de transcription ATF2 (Activation Transcription Facteur 2) crucial pour l'expression de SIRT4 (48).

Ajouté à cela, le complexe mTORC1 est également impliqué dans la synthèse des acides aminés non essentiels. Ceci a lieu, de façon indirecte, suite à : i) la stimulation de la glycolyse, du

cycle TCA, et de la voie des pentoses phosphate, qui fournissent tous des métabolites clés et cruciaux pour la synthèse des acides aminés non essentiels (62, 70) et ii) la régulation de la traduction des ARNm codants pour les enzymes clés de la synthèse des acides aminés non essentiels (sérine, aspartate, asparagine) (6).

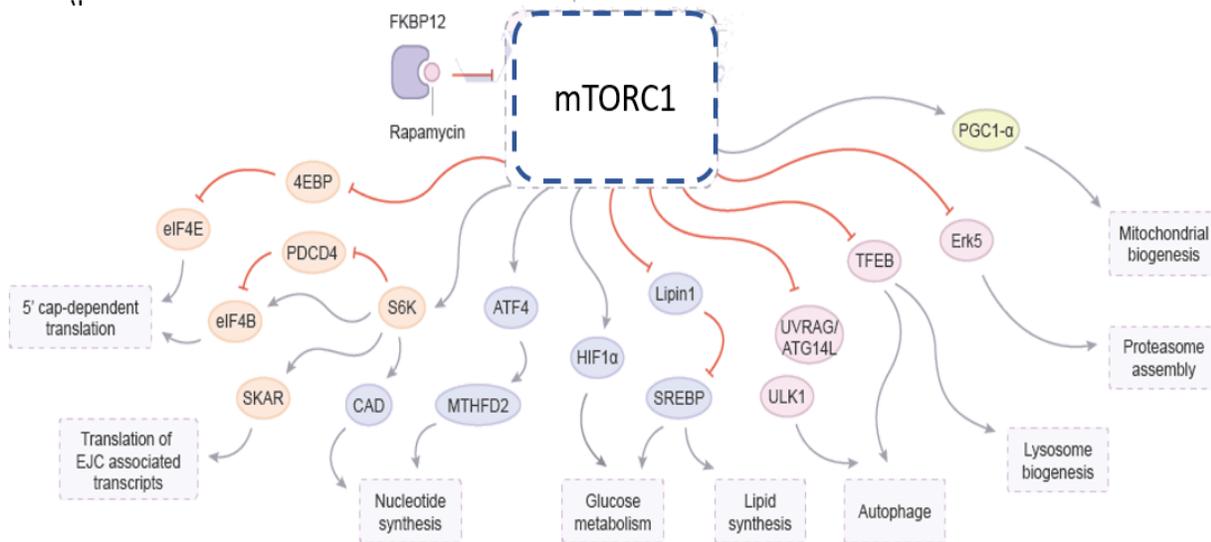


Figure 1.8. Schéma représentatif des effecteurs en aval de la voie mTORC1. (adaptée de Uchenunu et al. 2019)

mTORC1 contrôle divers processus métaboliques via la régulation traductionnelle et/ou transcriptionnelle de nombreux effecteurs. Il module la traduction des ARNm à extrémité 5' UTR structurée via le contrôle du niveau et de l'activité du complexe eIF4F. Il régule la synthèse des nucléotides, le métabolisme du glucose et la synthèse des lipides, l'autophagie, la biogenèse des lysosomes et des mitochondries. Figure adaptée de (24).

2. La reprogrammation traductionnelle et métabolique soutiennent la prolifération cellulaire et maintient la résistance aux inhibiteurs de kinase:

Tenant compte de la grande consommation d'énergie par le processus traductionnel, celui-ci est remodelé de façon étroitement coordonnée avec le métabolisme afin de répondre aux besoins cellulaires (71). Ceci se voit particulièrement dans les cellules cancéreuses sollicitant

hautement l'appareil traductionnel et devront donc répondre aux besoins énergétiques accrus de la synthèse protéique (72, 73). Pour combler leurs besoins, ces cellules adoptent plusieurs mécanismes qui leur permettent plutôt de réduire la consommation d'énergie au lieu d'en produire plus. Parmi ces mécanismes, il y a i) le contrôle à la baisse de l'activité de la voie mTORC1 et de la synthèse des protéines mitochondriales entraînant un déficit en production d'ATP mitochondriale qui est compensé par une hausse du flux glycolytique connu par "l'effet Warburg" (74), ii) le recyclage mitochondrial et iii) le contrôle de l'apoptose (75, 76). En effet, l'activité du complexe mTORC1 est relativement proportionnelle à la production d'énergie (75). Ce complexe régule, d'un côté, la production d'énergie mitochondriale par le contrôle traductionnel des protéines dépendantes du complexe eIF4F comme les protéines mitochondriales dont les protéines du complexe I et V (ATP1F5D et ATP1F5O) de la chaîne de transport d'électrons, le facteur A de transcription mitochondriale (TFAM) et les protéines des ribosomes mitochondriales (75). De manière intéressante, ces protéines sont majoritairement codées par des ARNm à courte extrémité 5' mais leur traduction est hautement dépendante du complexe eIF4F (76). Ainsi, l'inhibition de la voie mTORC1 provoque une réduction de la traduction de ces ARNm permettant de contrôler à la baisse la consommation d'ATP par les mécanismes de la synthèse protéique (75, 77). De l'autre côté, le complexe mTORC1 régule la dynamique mitochondriale en modulant la traduction des protéines du processus de fission mitochondriale 1 (MTFP1), médié par le niveau et l'activité des protéines d'initiation de la traduction eIF4E et 4E-BP, et contrôle ainsi la dynamique mitochondriale et le processus de l'apoptose cellulaire (77). En effet, une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe est induite par des stimuli pro apoptotiques. Ce processus est régulé par les protéines apoptotiques et les protéines de survie dont les membres de la famille BCL2 (BCL2, BCL-XL et MCL-1) contrôlées par la voie mTORC1-4E-BP (14) et qui modulent la libération du Cytochrome C menant à l'activation des protéases apoptotiques telles que les caspases (78). De plus, l'inhibition de mTORC1 permet d'induire des phénomènes de recyclage tels que la fusion mitochondriale et l'autophagie qui favorisent la reconstitution des nutriments et l'élimination des organites endommagés permettant de soutenir la survie et la prolifération cellulaire (77).

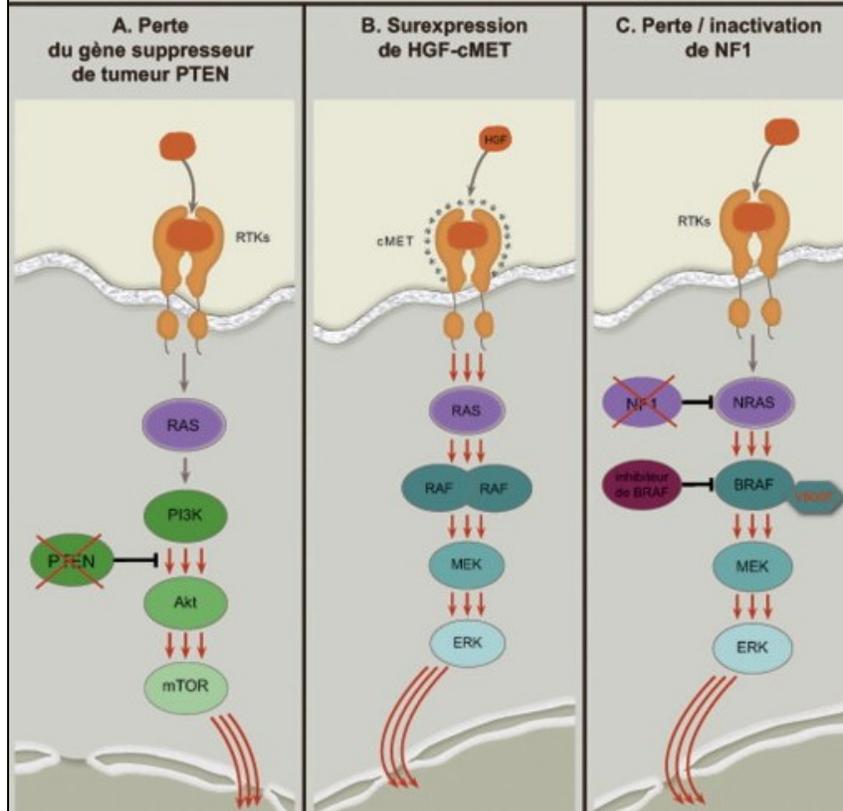
En plus du remodelage traductionnel, les cellules néoplasiques reprogramment leurs voies métaboliques en faveur de leur survie et de leur prolifération. En effet, contrairement aux cellules saines, les cellules à haut potentiel prolifératif sont hautement dépendantes de la glycolyse, en plus de la phosphorylation oxydative pour subvenir à leurs besoins énergétiques. Ainsi, les mélanocytes (cellules normales), sont caractérisées par leur haute dépendance de la phosphorylation oxydative plutôt que de la glycolyse (74). En effet, des études ont montré que le facteur de transcription spécifique des mélanocytes MITF (microphthalmia associated transcription factor) régule à la hausse le facteur coactivateur PGC-1 α entraînant une augmentation de la phosphorylation oxydative (74). Cependant, l'activation mutationnelle de BRAF, l'isoforme de la protéine kinase RAF la plus mutée dans le mélanome (28), entraîne une inhibition de MITF, de PGC1 α et de la phosphorylation oxydative, donnant ainsi un phénotype plutôt glycolytique (79). Cela représente une bonne cible qui a été exploitée en clinique et a fait l'objet de plusieurs thérapies ciblées dont les biguanides et les inhibiteurs des protéines kinases (6). Depuis 2011, le ciblage de la kinase oncogénique BRAF par trois molécules : Vémurafénib, Dabrafénib et Encorafenib (voir Chapitre 1 *Section 3*), a été approuvé pour traiter les cancers à BRAF muté et qui sont diagnostiqués aux stades avancés, notamment le type le plus fréquent de mélanome malin (28). Néanmoins, ce type de cancer résiste à ces drogues et entraîne beaucoup de récurrences chez de nombreux patients (80, 81). Cette résistance n'est souvent pas associée à l'inefficacité des molécules ni à leur élimination ou dégradation précoce, mais elle est plutôt en rapport avec la reprogrammation métabolique et traductionnelle soutenue par l'activation des voies de signalisation oncogénique (82-84). Cette reprogrammation appuie ainsi l'adaptation des cellules cancéreuses aux thérapies, et conduit donc à la survie et la croissance néoplasique (82).

3. Le mélanome malin et la thérapie ciblée aux inhibiteurs de kinase :

Le mélanome malin est l'une des formes du cancer de la peau qui se développe à partir des mélanocytes ayant acquis un potentiel prolifératif non contrôlé. C'est l'une des pathologies néoplasiques les plus agressives avec un pronostic très sombre. La prise en charge clinique des patients qui en sont atteints se base, de nos jours, sur les thérapies ciblées telles que les inhibiteurs de kinases (85). En fait, le profil génétique des cellules du mélanome comprend plusieurs mutations qui induisent la transformation et la prolifération tumorale. Basé sur ces

mutations, ces cellules sont classées en quatre sous-groupes : 1) les mélanomes à BRAF muté, 2) les mélanomes à NRAS muté, 3) les mélanomes à NF1 muté et 4) les mélanomes sauvages (triples négatifs) qui ne portent pas de mutations aux BRAF, NRAS et NF1 (86). 50% des mélanomes sont porteurs d'une mutation sur la protéine kinase BRAF, notamment, la substitution BRAF^{V600E}, qui est présente dans 80-90% des mélanomes malins. Cette mutation génère une oncoprotéine constitutivement active agissant indépendamment des signaux régulateurs en amont, et menant au remodelage métabolique et traductionnel qui soutiennent la survie et la prolifération néoplasique (87). Cette mutation est non seulement très répandue dans le mélanome malin, mais elle est retrouvée également dans d'autres tumeurs solides telles que le carcinome de la thyroïde, le cancer du poumon et le cancer colorectal et elle y est associée avec un très mauvais pronostic et un grand potentiel de malignité (28). Comme déjà mentionné plus haut, le ciblage de la kinase oncogénique BRAF par les trois inhibiteurs : Vémurafenib, Dabrafenib et Encorafénib, a été approuvé en clinique pour traiter les cancers BRAF mutés tel que le mélanome malin (28). Cependant, ces inhibiteurs n'apportent de bénéfice qu'à court terme suite à l'apparition d'une résistance, qui reste inévitable chez beaucoup de patients. En effet, bien qu'environ 20% des patients n'y répondent pas d'emblée à cause d'une résistance primaire, la grande majorité des patients répondeurs développent une résistance secondaire ou acquise qui se manifeste par la rechute après une réponse positive au traitement initial. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour soutenir la résistance primaire notamment, la réactivation de la voie PI3K/mTOR suite à une perte du gène suppresseur de tumeur PTEN, ou la réactivation de la voie MAPK suite à la surexpression de HGF-cMET ou à la perte/inactivation de NF1 (**Figure 1.9**) (83, 84). D'autres mécanismes sont également proposés pour expliquer la résistance secondaire, particulièrement : la réactivation de la voie MAPK suite à une mutation activatrice de MEK; l'hétérogénéité tumorale avec un contingent BRAF sauvage; l'activité de la protéine COT (Cancer de la thyroïde d'Osaka); ou l'hyper-expression des récepteurs PDGFR- β (Platelet Derived Growth Factor Receptor β) ou IGF-1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor) (**Figure 1.9**); ou encore l'activité du micro-environnement tumoral (83, 84).

LES MÉCANISMES DE RÉSISTANCES INTRINSÈQUES



LES MÉCANISMES DE RÉSISTANCES ACQUISES

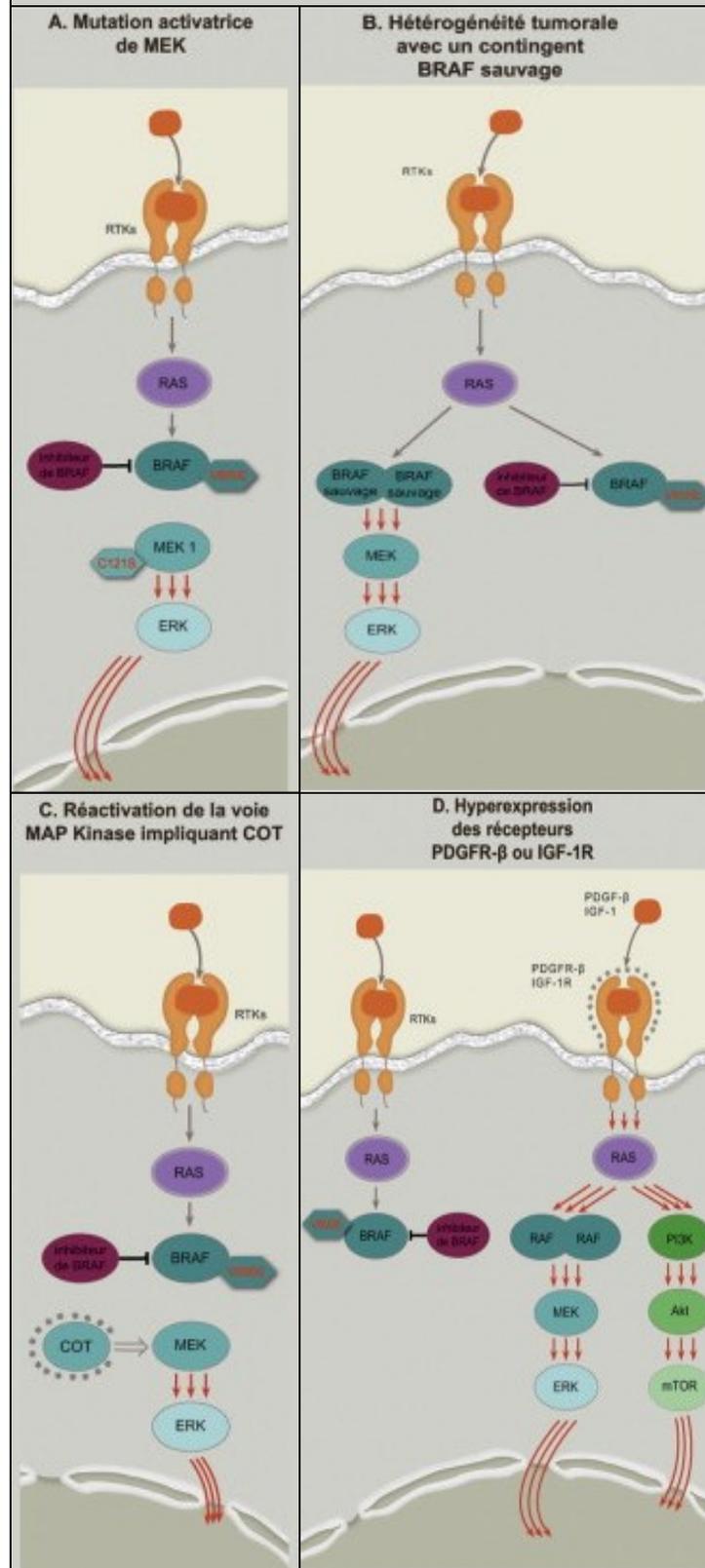


Figure 1.9. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF (adaptée de J. Charles *et al.*, 2014)

Les cellules du mélanome malin utilisent plusieurs mécanismes pour résister aux thérapies ciblées à base d'inhibiteurs de BRAF, notamment la perte du gène suppresseur de tumeur PTEN, la surexpression de HGF-cMET, la perte/inactivation de NF1, la mutation activatrice de MEK, l'hétérogénéité tumorale à BRAF sauvage, l'activité de la protéine COT et l'hyperexpression des récepteurs PDGFR- β ou IGF-1R . Figure adaptée de (83).

4. L'efficacité préliminaire des inhibiteurs de la traduction dans le mélanome malin résistant aux inhibiteurs de kinase:

Dans le mélanome, beaucoup de mécanismes de résistance aux inhibiteurs de la kinase BRAF mènent à la réactivation de la voie mTORC1 et donc à la traduction des ARNm mTORC1-eIF4F dépendants. Pour pallier cette résistance, plusieurs stratégies ciblant mTORC1-eIF4F ont été mises à l'étude. Ceci comprend l'inhibition directe de mTORC1 (e.g. Rapamycine), ou le blocage de la formation de la liaison eIF4E:eIF4G via l'inhibiteur compétitif "4EGI-1" qui a une grande affinité et se lie fortement au eIF4E (14, 88). Cependant, ces stratégies ne s'avèrent pas aussi efficaces qu'attendu, en partie, à cause de la surexpression néoplasique du facteur eIF4E et donc de la hausse subséquente du ratio eIF4E/4E-BP (29). Afin de surmonter ce problème, des stratégies alternatives ont été conçues, ciblant plutôt l'assemblage du complexe eIF4F ou sa fonction. Notamment, le ciblage de l'assemblage du complexe eIF4F via le "SBI-756", un inhibiteur compétitif à haute affinité pour la protéine d'échafaudage eIF4G. Cette stratégie semble avoir une bonne efficacité pour atténuer la résistance des cellules du mélanome aux inhibiteurs de BRAF *in vitro*, et ceci indépendamment du niveau d'expression de 4E-BP ou du ratio eIF4F/4E-BP (89). Le ciblage de la fonction du complexe eIF4F via des "rocaglates", inhibiteurs de la protéine hélicase eIF4A constitue une autre stratégie efficace pour atténuer la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome. Ces rocaglates sont des drogues isolées de l'arbre *Aglaia* qui ont démontré une grande sélectivité et un grand potentiel d'interaction avec le facteur eIF4A (90-92). Ils agissent en stimulant l'interaction et en augmentant l'affinité de eIF4A aux ARNm conduisant ainsi à une sorte de fixation du complexe eIF4F sur l'ARNm et donc au blocage de la

traduction à la phase d'initiation (90-92). Silvestrol est l'un des rocaglates les plus caractérisés qui a démontré une bonne pharmacocinétique et une efficacité thérapeutique *in vivo* à des concentrations nano molaires (92, 93). Cependant, il a été identifié comme substrat d'une glycoprotéine à multirésistance thérapeutique (MDR1) limitant ainsi son usage comme agent anticancéreux (94) et incitant la synthèse de ses dérivées, dont le WGD-57-59 et le CR-1-31b (91, 95). Les rocaglates constituent des inhibiteurs puissants du complexe eIF4F, caractérisés par leur double réponse : 1) l'association du facteur eIF4A aux l'ARNm enrichis en purine afin de bloquer l'initiation de la traduction et 2) l'épuisement subséquent de la sous-unité eIF4A du complexe eIF4F. Ces substances ciblent la traduction des ARNm codants pour des onco-protéines anti apoptotiques comme MCL1, BCL2 et les protéines du cycle cellulaire telles que les cyclines D1/D3/E1, la CDK4 et la CDK6, dans plusieurs types de cancer, notamment le mélanome et le cancer du sein (18). Pour s'assurer que les inhibiteurs de eIF4A (rocaglates) et de eIF4G (SBI-756), contrairement aux 4EGI-1 et aux inhibiteurs de mTOR, sont efficaces dans les cellules cancéreuses avec ratio eIF4E/4E-BP élevé, des expériences utilisant CRISPR / Cas9 pour épuiser 4E-BP1/2 dans les cellules de mélanome humain A375 (lignée de cellules exprimant BRAF^{V600E}) ont été générées. Il a été ainsi constaté que la perte de 4E-BP1/2 diminue la sensibilité des cellules A375 à l'inhibiteur de mTOR (Torin1) (96). En revanche, le SBI-756 reste efficace, quel que soit le niveau d'expression du 4E-BP1/2 (96).

5. Hypothèse et objectifs du projet:

De nombreuses pathologies néoplasiques malines ont de très sombre pronostic à cause de la résistance aux thérapies ciblées approuvées à ce jour. Plusieurs mécanismes sont proposés pour soutenir cette résistance. Ils convergent majoritairement à la reprogrammation du métabolisme et aux remodelages des mécanismes traductionnels contrôlés par différentes voies de signalisation oncogéniques.

Dans le contexte de la résistance du mélanome malin aux inhibiteurs de BRAF, une réactivation du complexe mTORC1 et du complexe eIF4F a été observée. Cette réactivation appuie fortement l'expression des gènes mTORC1-eIF4F dépendants qui soutiennent la prolifération et la survie cellulaire et maintiennent la résistance aux inhibiteurs de BRAF. Nous proposons ainsi l'hypothèse que le ciblage de la traduction des ARNm transcrits à partir de ces

gènes en inhibant le facteur eIF4A du complexe eIF4F permettrait de surmonter cette résistance aux inhibiteurs de BRAF et nous cherchons à disséquer les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Pour répondre à cette hypothèse nous avons inhibé la machinerie traductionnelle des paires de cellules de mélanome malin, sensibles et résistantes aux inhibiteurs de BRAF, en ciblant le facteur eIF4A du complexe eIF4F, indispensable à la traduction des ARNm oncogéniques, et évaluer les effets de cette inhibition sur la synthèse protéique et le métabolisme. L'analyse comparative de ces effets dans les paires des cellules cancéreuses sensibles et résistantes aux thérapies ciblées nous a permis de valider l'efficacité de cette stratégie thérapeutique et l'exploration des différentes voies métaboliques nous a permis de décrypter les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Nous avons ainsi établi plusieurs objectifs :

Objectif 1: Déterminer l'efficacité des inhibiteurs de eIF4A dans le mélanome sensible et résistant aux inhibiteurs de BRAF. Nous avons vérifié l'efficacité des inhibiteurs de eIF4A via l'évaluation de la croissance et de la mort cellulaire (Annexine-V) dans des cellules du mélanome, sensibles ou résistantes aux inhibiteurs de BRAF (essais *in vitro*). Cela nous a permis d'établir les conditions optimales pour étudier les interactions des inhibiteurs de la traduction et des inhibiteurs de kinases.

Objectif 2: Caractériser la coordination entre les programmes translationnels et métaboliques qui soutiennent la résistance aux inhibiteurs de BRAF. D'abord, le traductome a été analysé par des expériences de profilage des polysomes et d'incorporation à la Puromycine. Ensuite, le métabolisme a été analysé par des expériences de Seahorse et de GC/MS, où l'on a quantifié (i) le profil bioénergétique des cellules de mélanome sensibles et résistantes aux inhibiteurs de BRAF, traitées ou non avec les inhibiteurs de eIF4A et (ii) les métabolites issus des différentes voies (la glycolyse, le cycle TCA et les acides aminés). Finalement, une analyse bio-informatique de ces données sera réalisée prochainement et les résultats de celle-ci nous permettront d'éclairer les réseaux translationnels qui dictent la reprogrammation métabolique responsable de l'efficacité des inhibiteurs de la traduction.

Objectif 3: Identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'efficacité des inhibiteurs de eIF4Ai dans le mélanome résistant aux inhibiteurs de BRAF. Nous avons évalué la dépendance à

la glutamine des cellules du mélanome sensibles et résistantes aux inhibiteurs de BRAF puis validé par Western-blot et RT-qPCR plusieurs cibles potentielles de l'inhibiteur de eIF4A1 CR1-31b, appartenant aux différentes voies métaboliques dont le métabolisme de la glutamine, le cycle TCA, la B-oxydation des acides gras ainsi que des protéines de la chaîne respiratoire.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Conditions de culture cellulaire :

Les cellules A375, A375R, MDA-MB-231 et MDA-MB-231R ont été maintenues dans du milieu DMEM (Wisent, cat# 319-005-CL) alors que les cellules MM102 et MM102R ont été maintenues dans du milieu HAM'S F-12 (Wisent, cat# 318-011-CL). Les deux milieux ont été supplémentés avec 10% de sérum de fœtus bovin (Hyclone de Sigma, cat# A7906-10G) et 1% de Pénicilline / Streptomycine (Wisent, cat# 450-201-EL). Toutes les cultures cellulaires ont été incubées à 37°C et 5% CO₂. Les trois lignées de cellules résistantes ont été continuellement exposées aux inhibiteurs de BRAF ou de MEK, soit le PLX4032 (Selleckchem, cat# S1267) à 10nM pour les A375R ou le ENCORAFENIB (LGX818, cat# CT-LGX818-50MG) à 1000nM et le BINIMETINIB (ARRY-162, cat# CT-A162) à 200nM pour les MDA-MB-231R et les MM102R. Ces drogues ont été retirées du milieu de culture un passage avant toutes les expériences qui suivront. Des tests au Kit PCR de détection Mycoplasma (abm, cat# G238) ont confirmé l'absence de contamination aux mycoplasmes. Le cas échéant, les cellules ont été traitées avec du DMSO (Sigma, cat# D2650-100ML), CR-1-31b (MedChemExpress, cat# HY-19356A), SILVESTROL (offert généreusement par Dr Jerry Pelletier, McGill), SDS-1-021 (offert par Dr Jerry Pelletier), CMLD (offert par Dr Jerry Pelletier), PLX4032 (Selleckchem, cat # S1267), ENCORAFENIB (LGX818, cat# CT-LGX818-50MG), BINIMETINIB (ARRY-162, cat# CT-A162) tel qu'indiqué dans chacune des figures 3.1 à 3.8.

Le nombre des cellulesensemencées et les différentes durées de traitement pour chacune des expériences qui suivront ont été déterminés par l'évaluation préalable de la confluence et de la viabilité cellulaires des six lignées plaquées en différents nombres et observées au microscope après 24h, 48h, 72h, 96h et 120h d'incubation à 37°C et 5% CO₂.

NOTE : Les lignées cellulaires A375 et A375R nous ont été fournies par notre collaborateur Dr Z. Ronai (Sanford Burnham, California) et les lignées cellulaires MM102, MM102R, MDA-MB-231 et MDA-MB-231R nous ont été fournies par notre collaboratrice Dre A. Rose (LDI, McGill).

Analyse de la croissance cellulaire :

Les cellules A375 et A375R ont étéensemencées à raison de 30.000 cellules par puit dans des plaques à 6 puits, incubées pour 24h à 37°C et 5% CO₂ puis traitées comme indiqué dans les

figures 3.1.A, 3.2.A et 3.7 pour une durée de 72h. Elles ont ensuite été trypsinées, colorées avec le bleu de trypan (Fisher scientific, cat# MT25900CI) et comptées en utilisant le compteur de cellules automatisé (Cell Drop, FraggioBio). Les valeurs du comptage des cellules vivantes dans différentes conditions ont été normalisées par rapport à celles obtenues pour les cellules vivantes après 72h de traitement au DMSO (contrôle). Les données sont présentées en pourcentage de cellules vivantes par rapport au contrôle et sont représentatives de trois expériences indépendantes réalisées en trois répliquas techniques chacune.

Les cellules MM102, MM102R, MDA-MB-231 et MDA-MB-231R, ont étéensemencées à raison de 3.000 cellules par puit dans des plaques à 96 puits, incubées pour 24h à 37°C et 5% CO₂ puis traitées comme indiqué dans les figures 3.1.B, et 3.2.A puis suivies à l'aide du système d'imagerie des cellules vivantes IncuCyte SX5 (de Sartorius) avec une prise de photos toutes les 4 ou 6 heures durant 72h. Une analyse avec le module basic de l'IncuCyte a été réalisée et un comptage des cellules vivantes et des cellules apoptotiques a été fait sur les photos prises pour chaque condition en combinant le contraste de phase et le marquage des cellules apoptotiques par le marqueur de l'annexine V (AnnexIncuCyte® Annexin V Orange Dye, cat # 4759). Les nombres des cellules vivantes après 72h de traitement aux différentes drogues ont été normalisées par rapport à ceux obtenues pour les cellules vivantes après 72h de traitement au DMSO. Les données sont présentées en pourcentage de cellules vivantes par rapport au contrôle et sont représentatives de trois expériences indépendantes réalisées en trois répliquas techniques chacune.

Essais clonogénique:

Les cellules A375, A375R, MDA-MB-231 et MDA-MB-231R ont étéensemencées dans des plaques à 6 puits à raison de 1000 cellules par puit pour les A375 et A375R et 3000 cellules par puit pour les MDA-MB-231 et MDA-MB-231R et de trois puits par condition comme indiqué dans les figures 3.1.B et 3.2.B. Après une incubation de 24h à 37°C et 5% CO₂, les cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-231R ont été traitées à l'Encorafenib + Binimetinib ou au CR-1-31b aux concentrations indiquées dans les figures 3.1.C et 3.2.B et les cellules A375, A375R ont été traitées au CR-1-31b aux concentrations indiquées à la figure 3.2.B et remises dans l'incubateur (37°C et 5% CO₂) pendant six jours avec renouvellement du traitement après 72h. Au septième jour,

lorsque les puits des contrôles (DMSO) ont atteint de bonnes confluences, les cellules ont été lavées au PBS, fixées aux plaques avec 1mL de la solution du Violet de Crystal par puit [50% (v/v) éthanol à 100%, 2,5mg/mL NaCl, 4.8% (v/v) Formaldéhyde à 37%, 7,5mg/mL Violet de Crystal], puis lavées abondamment et gentiment avec de l'eau froide. Les plaques ont été laissées sécher à l'air pendant une nuit puis scannées et les images obtenues ont été analysées par Image-J (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) afin de compter le nombre de colonies formées dans chaque condition. Les valeurs obtenues ont ensuite fait l'objet d'une analyse ANOVA à une voie et du tukey-test (GraphPad Prism 9), normalisées par rapport aux cellules traitées au DMSO (contrôle) et présentées aux figures 3.1.C et 3.2.B. Les données sont exprimées en pourcentage d'intensité des colonies relatif aux cellules contrôles et sont représentatifs de trois répliquas indépendants.

Western blot :

Les cellules A375, A375R, MDA-MB-231, MDA-MB-231R, MM102 et MM102R ont été ensemencées dans des boîtes de pétrie de 10cm et incubées à 37°C et 5% CO₂ pour 24h puis traitées pendant 6h, 24h, 48h ou 72h selon les différentes expériences décrites dans les figures 3.2.C, 3.3, 3.4.C et 3.8.A. Elles ont par la suite été collectées, lysées sur glace dans du tampon de lyse RIPA [50 mM Tris / HCL à pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% SDS, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, inhibiteurs de protéase complet 1X (Roche), PhosSTOP 1X (Roche)] puis centrifugés à 13.3RPM pendant 10min à 4°C. La concentration des protéines dans les lysats cellulaires (surnageants) a été déterminée en utilisant le kit de dosage de protéines BCA (Pierce, Thermo Fisher Scientific, cat# PI23225). Les protéines ont été séparées sur SDS-PAGE 10 à 15% en fonction des cibles analysées, puis transférées sur des membranes de nitrocellulose (Amersham, cat # 45-004-002). Le marqueur de poids moléculaire (Precision plus, Dual color, Bio-Rad, cat#161-0374) a été utilisé pour déterminer les bandes d'intérêts en fonction de la taille de chaque protéine. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés après les avoir dilués dans 5% (p / v) BSA (Wisent, BSA Fraction V pH7 (COHN), 500g, cat# 800-095-CG) ou 5% (p / v) lait écrémé (selon les instructions du fabricant), dissous dans du TBST 1X : **β-ACTINE** (1/5000 , cat # A5441-100UL, Sigma), **BCL2** (1/1000, cat # 4223S, NEB), **CDK4** (1/1000, cat # ab137675, Abcam), **CYCLINE D3** (1/1000, cat # 2936S, NEB), **MCL1** (1/1000, cat# 5453S, NEB), **4EBP1** et **p-4EBP1** en Ser 65 (1/1000 , cat # 9644S

et 9451S, NEB), **ERK** et **p-ERK** en Thr 202/204 (1/1000, cat # 9102S et 9101S , NEB), **RPS6** et **p-RPS6** en Ser 240/244 (1/1000, cat # sc-74459 Santacruz et cat # 2215S, NEB), **GLS1** (1/1000, cat # 56750S, NEB) , **NDUFA8** (1/2000, cat # ab184952, Abcam), **NDUFB8** (1/1000, cat # ab110242, Abcam), **ACADS** (1/1000, cat # ab154823, Abcam), **ACSF2** (1/2000, cat # NBP2-47558-25UL, Novus Biologicals Canada/Cedarlane), **SLC25A1** (1/2000, cat # 15235-1-AP, Proteintech/Cedarlane), **PDH** (1/500, cat # 2784, NEB), **GDH1/2** (1/500, cat # 12793, NEB) et **Sirt2 1/2** (1/500, cat # 12650S, NEB). Les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires aux dilutions indiquées pendant une nuit à 4°C. Les anticorps secondaires (IgG) anti-lapin et anti-souris conjugués à la peroxydase ont été utilisés à une dilution de 1: 3000 dans du BSA à 5% ou du lait écrémé à 5% (p / v) dissous dans du TBST 1X pendant 1 heure à température ambiante. Les signaux ont été révélés par chimioluminescence en utilisant le ECL super signal femto (Fisher Scientific, cat # 34096) ou le ECL super signal pico (Fisher Scientific, cat # 2751941) au moyen du révélateur Azure 600C. Le logiciel Image-j (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) a été utilisé pour quantifier les résultats par densitométrie et le logiciel Graphpad Prism 9 a été utilisé pour les analyser. Les Westerns blots présentés sont représentatifs d'au moins deux ou trois répliquas indépendants.

RT-q-PCR:

Les cellules A375 et A375R ont étéensemencées à raison de 1 million de cellules par boîte de pétrie de 10cm et incubées pendant 24h à 37°C et 5% CO₂ puis traitées pendant 48h comme indiqué dans la figure 3.8.B Les cellules ont été collectées et leur ARNs ont été extraits à l'aide de Trizol (Invitrogen/Life Technologies, TRIZOL REAGENT 200ML, cat# 15596018) conformément au protocole du fabricant. La RT-PCR et la q-PCR ont été réalisées à l'aide du kit 5X All-In-One RT MasterMix (abm, cat # G592) et du kit BlasTaq 2X qPCR MasterMix (abm, cat # G891, G892) respectivement et conformément au protocole de la compagnie en utilisant les amorces suivantes : GLS1_F 5'-TCTACAGGATTGCGAACGTCT-3'; GLS1_R 5'-CTTTGTCTAGCATGACACCATCT-3'; NDUFA8_F 5'-GGAGAACTGTCAAAGGTCACC-3'; NDUFA8-R 5'-GCAGATCTCCCTCGATCTCA-3'; NDUFB8_F 5'-GACTACCCGAAGCTCCCTGA-3'; NDUFB8_R 5'- TAGGTGCCAGTGCATCGGTT-3'; ACSF2_F 5'-TGAAGGACCTGGTGGTTGCT-3' ; ACSF2_R 5'-GCTTCCTGTCTTCTGAGGC-3'; ACADS_F 5'-TTCTGAATGGAACCAAAGCCTG-3'; ACADS_R 5'- AAGGCACTGATGCCCTTGT-3'; SIRT2_F 5'-GGTGGAGAAGCAGACATGGA-3'; SIRT2_R 5'-ACAGATGACTCTGCGACAGC-3'; SLC25A1_F 5'-

CAACTGGTACCGAGGGGACA-3'; SLC25A1_R 5'- CGTGTTCGGTATTTGTGCG-3'; β -ACTINE_F 5'- ACCACACCTTCTACAATGAGC-3'; β -ACTINE_F 5'- GATAGCACAGCCTGGATAGC-3'. Les expériences ont été réalisées au QS10K Flex (Thermo Fisher Scientific). Les données ont été analysées à l'aide d'une courbe standard relative (http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocument/s/cms_040980.pdf). Une normalisation aux contrôles et une analyse ANOVA à deux Voies (GraphPad Prism 9) ont permis d'obtenir les niveaux d'ARNm relatifs à celui de la β -ACTINE présentés dans la figure 3.8.B. Les statistiques ont été établies à partir de deux ou trois expériences indépendantes réalisées en trois répliquas techniques chacune.

Cytométrie en flux (FACS Annexine-V/DAPI):

Les cellules A375 et A375R ont étéensemencées à raison de 30.000 cellules par puits dans des plaques à 6 puits et incubées pendant 24h à 37°C et 5% CO₂, puis traitées pendant 72h comme indiqué sur les figures 3.2.D et 3.2.E. Les cellules ont été lavées au PBS (Wisent, cat# 311-425-CL), trypsinées, collectées dans des tubes, puis centrifugées pendant 2min à 16000 RPM et 4°C. Les culots cellulaires ont ensuite été lavés avec 200 μ l de PBS + FBS 2% et comptées puis recentrifugées à 16000 RPM, 4°C pendant 2min. Les cellules traitées ont été re-suspendues dans 185 μ l de tampon de dilution d'Annexine V (Annexine V binding Buffer de BioLegend, cat # 422201) et les cellules du contrôle positif de la mort cellulaire ont été re-suspendues dans 100 μ l de PBS puis soumis à un choc thermique à 65°C pendant 10min, centrifugées à 16000 RPM puis re-suspendues dans le tampon de dilution d'Annexine V. Les cellules des échantillons traités et des contrôles ont ensuite été incubées avec soit de l'Annexine V-APC (50 μ l, 1/400, BioLegend, cat# 640920) seul ou du DAPI (50 μ l, 1/1000, BioLegend, cat# 422801) seul ou de l'Annexine V-APC + DAPI, pendant 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Tous les échantillons ont ensuite été analysés avec le cytomètre en flux de Bioscience (BD FACS Celesta) et séparés en : cellules vivantes (Annexine V- / DAPI-), cellules en apoptose précoce (Annexine V + / DAPI-), cellules en apoptose tardive (Annexine V + / DAPI +), et cellules nécrosées (Annexine V- / DAPI +). Les statistiques ont été établies à l'aide des tests ANOVA à une voie et tukey Post-hok (GraphPad Prism 9) à partir de trois expériences indépendantes réalisées en trois

répliquas techniques chacune. Les données ont été rapportées dans la figure 3.2.D par la moyenne \pm l'écart type des trois expériences indépendantes.

Fractionnement et profilage des polysomes :

Les cellules A375 et A375R ont étéensemencées à raison de 2 millions de cellules par boîte de pétrie de 15 cm et cultivées pendant 48h puis traitées pendant 1h comme indiqué dans la figure 3.4.A. Elles ont ensuite été incubées avec 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cycloheximide (Sigma, cat# 01810-5G) dans du milieu DMEM pendant 5 min à 37°C et 5% CO_2 ; puis lavées deux fois avec 10 ml de PBS froid contenant 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cycloheximide, collectées rapidement sur glace dans 5mL PBS + 100mg/mL cycloheximide froide et centrifugées à 200g et 4°C pendant 5min. Les cellules récupérées ont été lysées dans un tampon de lyse hypotonique [Tris HCl 5 mM pH 7,5, MgCl_2 2,5 mM, KCl 1,5 mM, cycloheximide 100 mg/mL, DTT 1 mM, inhibiteur de protéase 1X, inhibiteur d'ARNase 200U/mL, 0,5% Triton, 0,5% de désoxycholate de sodium] puis centrifugées à 16000g et 4°C pendant 7min. La densité optique (OD) des ARN contenus dans le surnageant de chaque échantillon a été mesurée à 260 nm par le spectrophotomètre TECAN (The infinite M 1000 Pro). 10% de chaque échantillon a été conservé, comme Input, dans 750 μl de TRIzol LS (Invitrogene, cat # 10296010) et stocké à -80°C. Les lysats ont été ajustés pour avoir la même densité optique puis chargés sur des gradients de sucrose 5-50% pré-préparés et conservés à 4°C. Les tubes de gradients chargés avec les lysats cellulaires ont ensuite été centrifugés à 39.000 RPM/ 4°C, pendant 2 heures en utilisant le rotor SW41Ti de l'ultracentrifugeuse Beckman. Les tubes ont par la suite été transférés au fractionnateur Triax. L'absorbance à 254 nm a été mesurée en continu au cours du fractionnement afin d'obtenir les tracés du profil polysomique et 16 fractions de 750 μl collectées à partir de chaque tube suivant les étapes du programme sur le catalogue. Les ARNm de chaque fraction ont ensuite été fixés avec 750 μl de Trizol et gardés à -80°C.

Test de Puromycilation:

Les cellules A375 et A375R ont étéensemencées à raison de 500.000 cellules par boîte de pétrie de 10cm et incubées pendant 24h à 37°C et 5% CO_2 puis traitées pendant 24h comme indiqué dans la figure 3.4.B. La puromycine (Wisent, cat# 400-160-EM) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a été ajoutée 1h avant de collecter les cellules. Les protéines totales contenues dans les lysats de ces cellules

ont été séparées par western blot comme indiqué dans la section " Western-blot" en utilisant l'anticorps primaire anti-puromycine (1/3000, Sigma, cat # MABE343). La quantification de l'intensité des bandes a été réalisée à l'aide du logiciel Image-J (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) et les résultats de trois expériences indépendantes ont fait l'objet d'une analyse ANOVA à une voie et Tukey-test et ont été rapportées dans la figure 3.4.B par la moyenne \pm l'écart type de la réduction des niveaux de puromycilation par rapport au contrôle DMSO.

Mesure de l'activité mitochondriale:

Les cellules A375 et A375R ont étéensemencées à raison de 4.000 cellules par puits dans des plaques à 96 puits pour Seahorse (Agilent) et traitées au DMSO, PLX4032, CR-1-31b ou CR-1-31b + PLX4032 pendant 24h comme indiqué dans la figure 3.5 et les figures supplémentaires 1 et 2, après 24h d'incubation à 37°C et 5% CO₂. Le Cartridge (Agilent) a été hydraté pendant une nuit à 37°C en absence de CO₂ et l'équipement a été mis en marche une nuit avant l'essai. Pour déterminer les taux de consommation d'oxygène (OCR : oxygen consumption rate), les cellules traitées ont été incubées dans du milieu XF de Base pour Seahorse (Agilent, cat# 103576-100) supplémenté avec de la glutamine (Wisent/ L-glutamine 200mM, 100mL, cat# 609-065-EL) à 2mmol/L, du glucose (Agilent/solution de glucose XF 1,0 M, 50 mL, cat# 103577-100) à 10mmol/L et du pyruvate (Agilent/seahorse XF 100mM Pyruvate solution, cat# 103578-100) à 1mmol/L, pendant 1h dans un incubateur à 37°C sans CO₂. Les cellules ont été analysées dans des conditions de stress provoqué par des injections préprogrammées d'Oligomycine (Sigma, cat# 75351-5MG) à 1uM, FCCP (Sigma, cat# C2920-10MG) à 1uM, Roténone + Antimycin A (Sigma, cat# R8875-1G, cat# A8674-25MG) à 0.5uM, UK5099 (Cedarlane, cat# HY-15475-5MG) à 10 μ M ou BPTES (Sigma, cat# SML0601-5MG) à 10 μ M, comme indiqué dans les figures 3.5 et les figures supplémentaires 1 et 2, à l'aide d'un analyseur de flux extracellulaire Seahorse XF96 (Agilent). Pour déterminer les taux d'acidification extracellulaire (EACR : extracellular acidification rate), les cellules traitées ont été incubées dans du milieu XF de Base pour Seahorse, supplémenté avec de la glutamine à 2mmol/L, pendant 1h dans un incubateur à 37°C sans CO₂. Les cellules ont été analysées dans des conditions de stress provoqué par des injections préprogrammées de Glucose à 10mM, Oligomycin à 1uM et 2-Deoxy-glucose (2-DG) (Sigma, cat# D3179-1G) à 50mM, à l'aide d'un

analyseur de flux extracellulaire Seahorse XF96 (Agilent). Les rapports OCR et EACR basaux ont été générés par le logiciel Wave (Agilent) et les données ont été rapportés dans la figure 3.5 et les figures supplémentaires 1 et 2 par la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes réalisées en trois répliquas techniques chacune.

Spectrométrie de masse (GCMS) :

Les cellules des deux lignées A375 et A375R ont étéensemencées à raison de 500.000 cellules par boîte de pétrie de 10cm, incubées pendant 24 h à 37°C et 5% CO₂ puis traitées pendant 24h comme indiqué dans la figure 3.6. Elles ont ensuite été rincées trois fois avec une solution saline (9g/L de NaCl à 4°C) et collectées sur glace dans 1200µL de méthanol à 80% dans des eppendorfs pré refroidis. Les membranes cellulaires ont été lysées via deux cycles de sonication à 4°C (réglage automatique du sonicateur : 10min/cycle, 30sc allumé, 30sc éteint). Les lysats ont été centrifugés pendant 10min à 14000 RPM, 4°C et les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes et mélangés à l'acide myristique (750µg/µL) puis séchés dans un speedvac pendant toute la nuit à 4°C et conservés à -80°C. Ces échantillons ont ensuite été analysés à la plateforme métabolomique du centre de recherche sur le cancer Goodman à McGill par GCMS selon les étapes suivantes: solubilisation par sonication des échantillons dans 30mL de pyrimidine + 30µL de méthoxyamine-HCl (10mg/mL, Sigma), vortex et incubation de 30min à 70°C puis centrifugation à 10000 RPM pour 10min et récupération des surnageants. Ces derniers ont par la suite été dérivés avec MTBSTFA (70mL, Sigma) à 70°C pendant 1h. 1mL par échantillon a été injecté pour l'analyse GC-MS (Agilent). Les métabolites de la glycolyse (DHAP, Glyceraldehydes-3-phosphates, Pyruvate et Lactate) et du cycle de l'acide citrique (Citrate, α -Cétoglutarate, 2-Hydroxyglutarate, Succinate, Fumarate et Malate) ainsi que les acides aminés essentiels et non essentiels ont été quantifiés dans chacune des conditions indiquées, normalisés par rapport au contrôle (A375 ou A375R traitées au DMSO), analysés par le test statistique ANOVA à une voie et rapportés dans la figure 3.6.

Test de déprivation à la glutamine :

Les cellules A375 et A375R ont été mises en culture à raison de 30.000 cellules par puit dans des plaques à 6 puits à 37°C et 5% CO₂ pendant 24h dans un milieu DMEM sans glutamine,

supplémenté avec 10% de sérum de fœtus bovin et 1% de Pénicilline / Streptomycine . La glutamine (Wisent, cat# 609-065-EL) a été ajoutée au milieu par la suite, aux concentrations finales de 4mM, 1mM, 0.25mM, 0.1mM ou 0mM ainsi que le CR-1-31b à 3.5nM et le PLX4032 à 100nM ou à 2000nM comme indiqué dans la figure 3.7. Après 72h, ces cellules ont été trypsinées, colorées au bleu de trypan et comptées avec le compteur de cellules automatisé (Cell Drop, FraggioBio). Les valeurs du comptage des cellules vivantes dans les différentes conditions indiquées dans la figure 3.7 ont été normalisées par rapport à celles obtenues pour les cellules mises en culture avec 4mM de Glutamine (contrôle). Les données sont exprimées en pourcentages de cellules vivantes relatifs au contrôle, rapportés par la moyenne \pm l'écart type de trois expériences indépendantes réalisées en trois répliquas techniques chacune.

Quantifications et analyses statistiques:

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test ANOVA à une ou deux voies et du Tukey-test du logiciel GraphPad Prism 9 comme indiqué pour chaque méthode expérimentale ou dans la légende de chaque figure. Les statistiques ont été générées en comparant deux ou trois expériences indépendantes réalisées en trois répliquas techniques dont la moyenne a été calculée et utilisée pour l'analyse statistique. Les données ont été présentées par la moyenne \pm l'écart type des expériences indépendantes. Les détails de la quantification des données, leur présentation et l'analyse statistique spécifique à chaque méthode expérimentale sont indiqués dans sa section respective et dans les légendes des figures qui leur sont assignées.

Chapitre 3 : Résultats

1. La résistance aux inhibiteurs de BRAF et l'efficacité des inhibiteurs de eIF4A:

1.1. La résistance aux inhibiteurs de la kinase oncogénique BRAF :

Dans le but de vérifier l'efficacité des inhibiteurs de BRAF, nous avons utilisé deux paires de lignées cellulaires de mélanome humain. La première paire est comprise des cellules A375 porteuses de la mutation BRAF^{V600E}, sensibles à l'inhibiteur de BRAF Vemurafenib (PLX4032) et des cellules A375R dérivées des cellules A375 suite à l'exposition prolongée aux doses croissantes de Vemurafenib, leur conférant ainsi une résistance à cet inhibiteur de BRAF. La deuxième paire est comprise des cellules MM102 porteuses des mutations BRAF^{N581S} et NRAS^{G60E}, sensibles à l'inhibiteur de BRAF Encorafenib (LGX818) et des cellules MM102R dérivées des cellules MM102 suite à leur exposition prolongée aux doses croissantes d'Encorafenib leur conférant ainsi une résistance à cet inhibiteur de BRAF.

Afin de confirmer la résistance aux inhibiteurs de BRAF, la paire des cellules A375/A375R a été traitées aux doses croissantes (0, 25, 100, 400, 2000 et 10000 nM) de Vemurafenib et la paire des cellules MM102/MM102R a été traitées aux doses croissantes (0, 200, 400, 800, 2000, 8000, 16000 nM) d'Encorafenib pour une période de 72h. Le nombre de cellules vivantes rapporté sur des courbes de croissance normalisé par rapport aux contrôles (**Figures 3.1.A et 3.1.B**), présente une réponse positive des cellules sensibles marquée par la diminution de la prolifération cellulaire aux IC₅₀ d'environ 150nM PLX4032 pour les A375 et d'environ 500nM encorafenib pour les MM102. En revanche les cellules résistantes A375R et MM102R continuent de proliférer malgré les doses élevées de Vemurafenib et d'Encorafenib, respectivement.

Nous avons également étendu notre recherche sur un autre type de cancer porteur de la mutation BRAF. Nous avons utilisé une troisième paire de lignées cellulaires comprise des cellules MDA-MB-231, un sous type du cancer du sein, porteuses des mutations BRAF^{G464V} et KRAS^{G13D}, qui sont sensibles à l'inhibiteur de BRAF Encorafenib (LGX818) et des cellules MDA-MB-231R dérivées des cellules MDA-MB-231 suite à leur exposition prolongée aux doses croissantes de l'inhibiteur de BRAF Encorafenib et de l'inhibiteur de MEK Binimetinib, leur conférant ainsi une

résistance à ces deux inhibiteurs. L'ajout de l'inhibiteur de MEK permet d'empêcher la croissance tumorale en bloquant la voie de signalisation alternative MAPK. Cette association de Encorafenib au Binimetenib permet d'avoir une meilleure activité antiproliférative in vitro par rapport à l'administration de l'une ou de l'autre drogue séparément (97).

Dans le but de vérifier l'efficacité de l'inhibiteur de BRAF Encorafenib sur cette paire de cellules, un essai clonogénique aux doses croissantes de 0, 200, 400, 800, 2000, 8000 et 16000nM d'Encorafenib combiné à l'inhibiteur de MEK Binimetenib aux doses croissantes de 0, 50, 100, 400, 800, 1200, 1600 et 3200nM, a été réalisé pour une période de 6 jours (**Figure 3.1.C**). En fait, cette technique ainsi que ces conditions expérimentales, soit le nombre de cellules plaquées et la durée de l'essai, ont été sélectionnés suite à l'analyse des profils prolifératifs des deux lignées et de leur potentielle capacité d'attachement aux plaques. Les observations, par microscopie optique, des confluences de différents nombres de cellules des deux lignées mises en culture sur plusieurs périodes montrent que les cellules parentales possèdent un potentiel de croissance beaucoup plus grand que les cellules résistantes. Étant donné que le but de cet essai est de comparer l'effet de l'inhibiteur de BRAF sur les cellules parentales versus les cellules résistantes, le nombre de cellules et la durée du traitement devraient être pareils pour les deux lignées. Ces conditions ont donc été optimisés à 3000 cellules par puits et une durée de traitement de 6 jours, permettant ainsi d'avoir des colonies de cellules qui restent bien attachées aux plaques, qui sont bien visibles et pas très confluentes, tout en assurant un bon état cellulaire. Le nombre des colonies marquées au Violet de Crystal est quantifié et normalisé par rapport au contrôle (DMSO) et rapporté sur la figure 3.1.C. Une grande variation du nombre des colonies est observée dans les contrôles (DMSO) formés par les cellules des deux lignées. En effet, les cellules MDA-MB-231R poussent moins vite comparativement aux cellules MDA-MB-231 mais elles étaient en bon état lors du contrôle microscopique au moment de la fixation et de la coloration au Violet de Crystal. Une réponse positive des cellules sensibles marquée par une diminution du nombre de colonies aux concentrations croissantes de Encorafenib + Binimetenib est observée pour les cellules MDA-MB-231. En revanche le nombre de colonies formées par les cellules résistantes MDA-MB-231R reste stable malgré le traitement aux doses élevées de Encorafenib + Binimetenib.

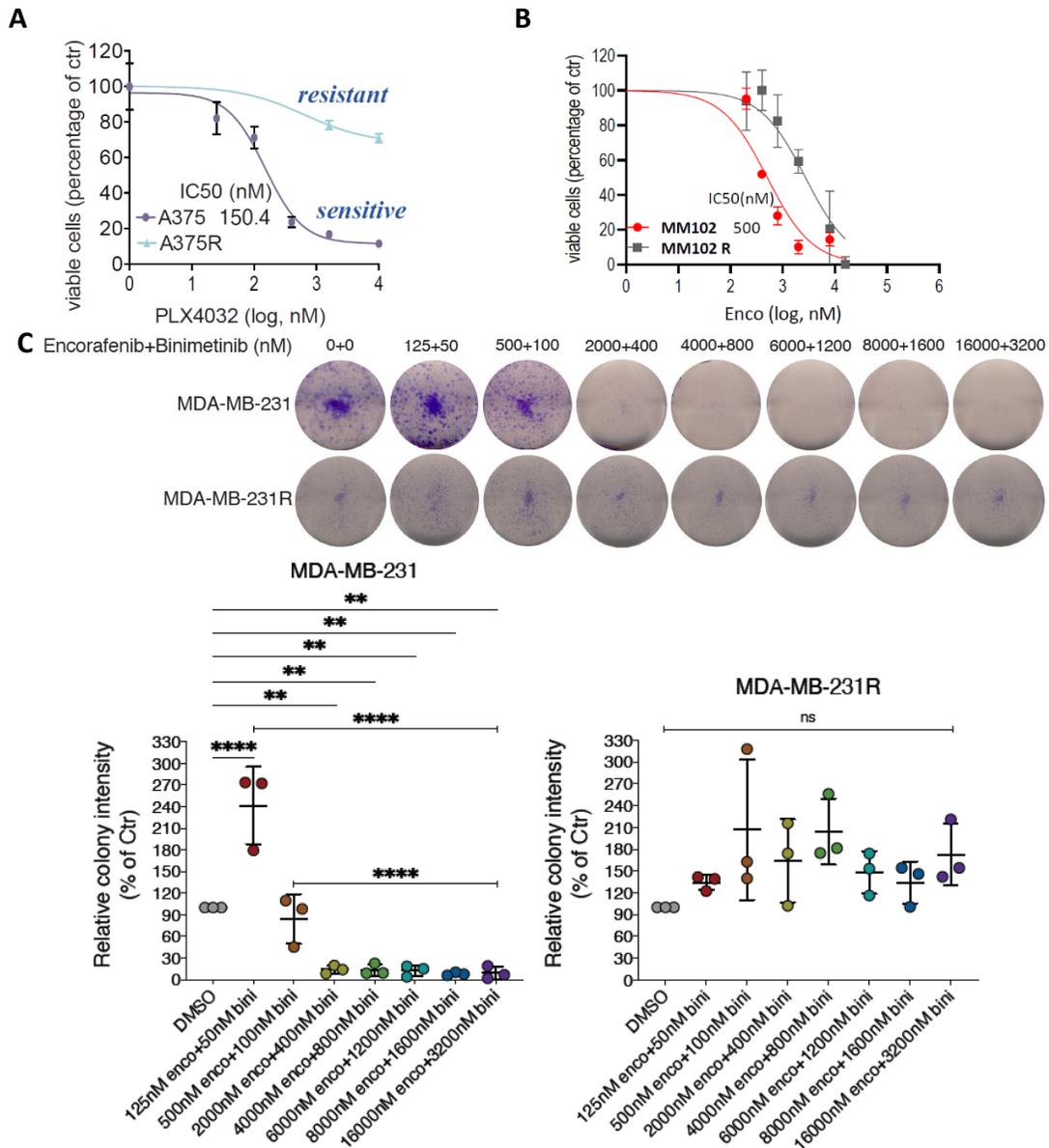


Figure 3.1. Les cellules A375R, MM102R et MDA-MB-231R résistent aux fortes doses d'inhibiteurs de kinase comparativement aux A375, MM102 et MDA-MB-231. (A) Les cellules A375 et A375R ont été traitées, comme indiqué, aux concentrations croissantes de 0, 25, 100, 400, 2000 et 10000 nM de Vemurafenib (PLX4032) pendant 72 h et le nombre de cellules vivantes a été déterminé par l'exclusion au bleu de Trypan et le comptage au Dropcell. (B) Les cellules MM102 et MM102R ont été traitées, comme indiqué, aux concentrations croissantes de 0, 200, 400, 800, 2000, 8000 et 16000 nM d'Encorafenib (ENCO) pendant 72 h et le nombre de cellules vivantes a été déterminé par un comptage à l'IncuCyte SX5 pour chaque condition via le module de base en combinant le contraste de phase et le marquage à l'annexine V. Les données

résultantes en (A) et (B) sont rapportées par les courbes de croissance, présentées en pourcentage de cellules vivantes par rapport aux contrôles (DMSO). (C) Les cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-231R ont été traitées, comme indiqué, aux concentrations croissantes d'Encorafenib (ENCO) + Binimetinib (BINI) pendant 6 jours puis marquées au Violet de Crystal. Les plaques ont été scannées et les images en haut sont représentatives des trois expériences réalisées. Le potentiel de formation de colonies a été évalué par l'analyse densitométrique et illustré par le pourcentage d'intensité des colonies relatif au contrôle (DMSO) en bas. Les valeurs obtenues ont été analysées par les tests ANOVA à une voie et Tukey-test (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; $n = 3$ expériences indépendantes).

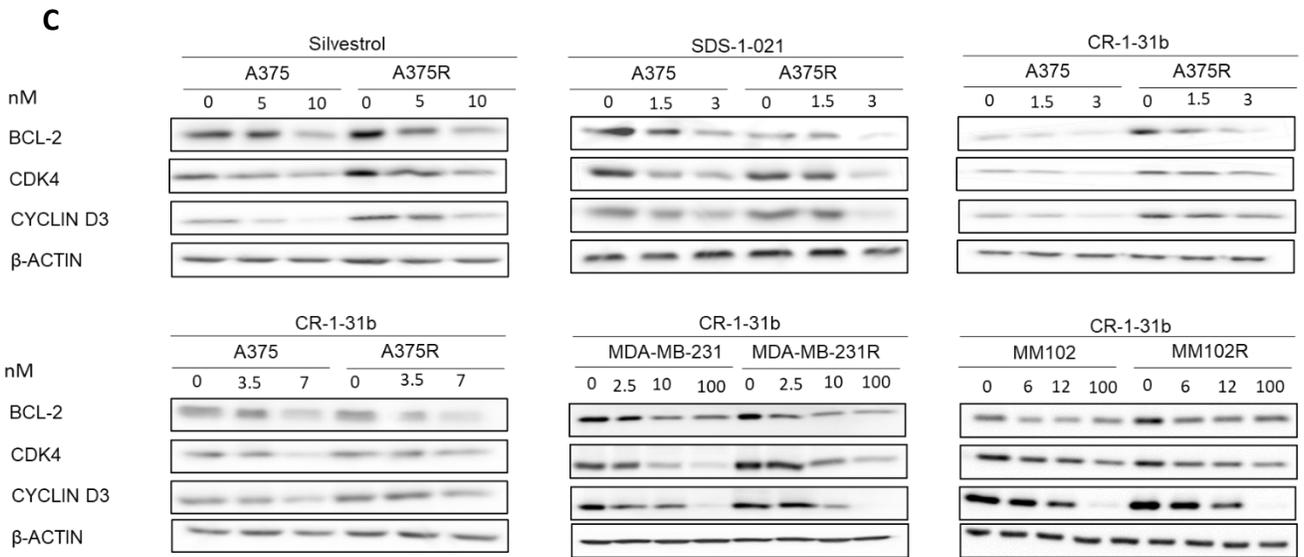
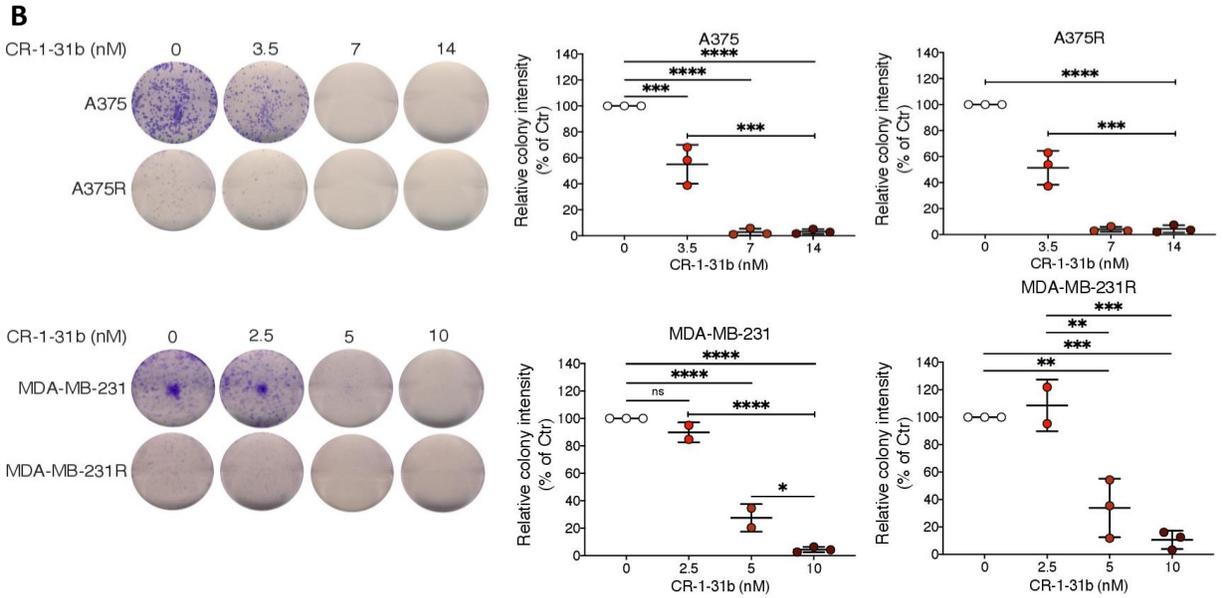
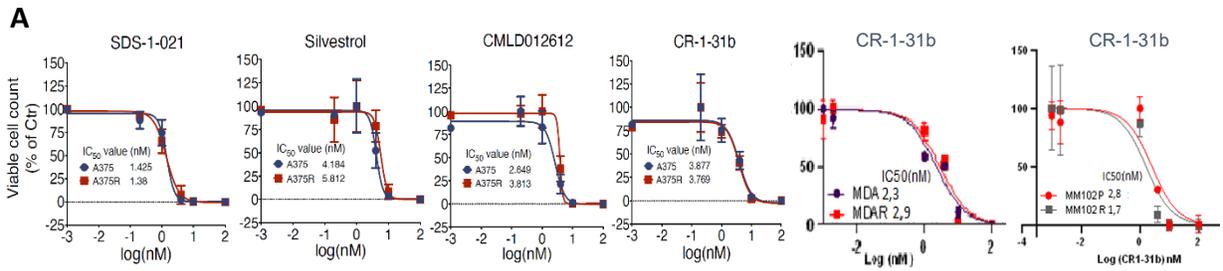
1.2. Les inhibiteurs de eIF4A ralentissent la prolifération cellulaire des paires de lignées sensibles et résistantes aux inhibiteurs de BRAF:

Dans le but d'apprécier l'effet des inhibiteurs de eIF4A sur les paires de cellules cancéreuses sensibles et résistantes aux inhibiteurs de BRAF : A375/A375R, MM102/MM102R et MDA-MB-321/MDA-MB-231R et de déterminer les conditions optimales en termes de concentrations des drogues pour le reste des expériences in vitro, la première paire de lignées cellulaires a été traitée pour une durée de 72h aux inhibiteurs de eIF4A : Silvestrol, SDS-1-021, CMLD et CR-1-31b et les deux autres paires de lignées cellulaires ont été traitées pour la même durée au CR-1-31b. Cet inhibiteur de eIF4A est sélectionné pour le reste des expériences pour des raisons expliqués plus loin dans la discussion. Le nombre des cellules vivantes rapporté par les courbes de croissance cellulaire normalisé aux contrôles (**Figure 3.2.A**), présente une réduction efficace du compte cellulaire des paires de lignées testées. Les courbes de croissance des cellules vivantes traitées à des doses croissantes de l'un ou l'autre des quatre inhibiteurs de eIF4A présentent une réponse similaire des cellules sensibles et résistantes aux différents traitements avec des valeurs basses de IC_{50} , soit de l'ordre du nano molaire. Ces IC_{50} sont de : 3.80nM et 5.62nM pour les cellules A375 et A375R traitées au Silvestrol, 1.46nM et 2.14nM pour les cellules A375 et A375R traitées au SDS-1-021, 3.58nM et 3.65nM pour les cellules A375 et A375R traitées au CMLD, 2.93nM et 4.03nM pour les cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b, 2.70nM et

1.74nM pour les cellules MM102 et MM102R traitées au CR-1-31b et de 2.31nM et 2.95nM pour les cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-231R traitées au CR-1-31b respectivement.

Ces résultats sont corroborés par des essais clonogéniques réalisés pour les paires de cellules A375/A375R et MDA-MB-231/MDA-MB-231R traitées au CR-1-31b aux doses de 1x IC₅₀, 2x IC₅₀ ou 4x IC₅₀ pour une période de 6 jours (**Figure 3.2.B**). Les observations du nombre de colonies marquées au Violet de Crystal montrent une réduction efficace dans les deux lignées des deux paires de cellules. La quantification des colonies cellulaires normalisées par rapport aux contrôles et rapportée par les courbes de la figure 3.2.B, met en évidence la réduction efficace de la capacité des cellules à générer des colonies à la suite de ce traitement et cela de façon similaire pour les cellules sensibles et résistantes aux inhibiteurs de BRAF.

Parallèlement, dans le but de valider la spécificité des inhibiteurs de eIF4A, la protéine anti apoptotique BCL2 et les protéines régulatrices du cycle cellulaire CDK4, CYCLINE D3, connues pour leur dépendance de eIF4A, sont mesurées par western blot dans les paires de lignées cellulaires traitées aux doses de 1x IC₅₀, 2x IC₅₀ ou 4x IC₅₀ des inhibiteurs de eIF4A. Les résultats montrent une réduction du niveau de ces protéines cibles par les quatre inhibiteurs de eIF4A dans les A375 et A375R et par le CR-1-31b dans le reste des lignées cellulaires. Cette réduction est plus marquée à 2x IC₅₀ voir 4x IC₅₀, et ce, tant pour les cellules sensibles que pour les cellules résistantes (**Figure 3.2.C**).



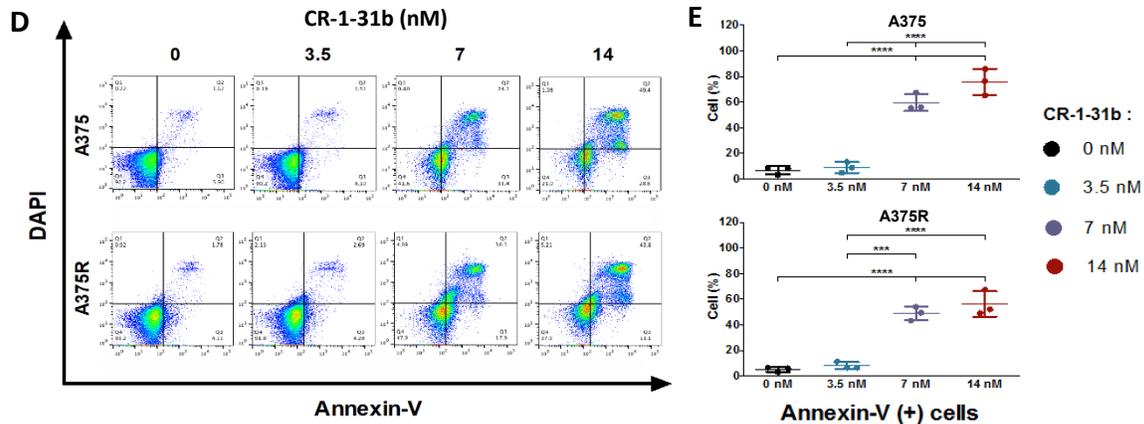


Figure 3.2. Les inhibiteurs de eIF4A ralentissent la prolifération et induisent l'apoptose des paires de cellules sensibles et résistantes aux inhibiteurs de BRAF. (A) La paire des cellules A375/A375R a été traitée, comme indiqué, avec des concentrations croissantes de 0, 0.02, 1, 4, 10 et 100 nM de Silvestrol, SDS-1-021, CMLD et CR-1-31b pendant 72 h. Le nombre de cellules vivantes a été déterminé par l'exclusion au bleu de Trypan et le comptage au Dropcell. Les paires de cellules MM102/MM102R et MDA-MB-231/MDA-MB-231R ont été traitées, comme indiqué, avec des concentrations croissantes de 0, 0.02, 1, 4, 10 et 100 nM de CR-1-31b pendant 72 h. Un comptage des cellules vivantes et des cellules apoptotiques a été réalisé sur les photos prises à l'IncuCyte SX5 pour chaque condition en combinant le contraste de phase et le marquage des cellules apoptotiques par le marqueur de l'annexine V. Les nombres de cellules vivantes ont été représentés en pourcentage relatif au contrôle (DMSO). (B) Les paires de cellules A375/A375R et MDA-MB-231/MDA-MB-231R ont été traitées, comme indiqué, aux concentrations croissantes de CR-1-31b pendant 6 jours puis marquées au Violet de Crystal. Les plaques ont été scannées et les images à gauche sont représentatives des trois répliquas réalisées. Le potentiel de formation de colonies a été évalué par analyse densitométrique illustrée à droite par le pourcentage d'intensité des colonies relatif au contrôle (DMSO). Les valeurs obtenues ont fait l'objet d'une analyse ANOVA à une voie et d'un Tukey-test (* $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; $n = 3$ expériences indépendantes). (C) Les paires de cellules A375/A375R10, MM102/MM102R et MDA-MB-231/MDA-MB-231R ont été traitées, comme indiqué, avec des concentrations croissantes de Silvestrol, SDS-1-021, CMLD ou CR-1-31b pendant 72 h. L'expression des protéines indiquées (cibles connues de ces drogues) a été déterminée par Western blot. La β -ACTINE a été utilisée

comme contrôle de chargement. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. (D) Diagramme de points représentatif de la cytométrie en flux de l'analyse de l'apoptose (Annexine-V/DAPI) des cellules A375 et A375R traitées, comme indiqué, aux concentrations croissantes de CR-1-31b et analysées par FACS. Dans chaque diagramme de dispersion FACS, Q2 (en haut à droite) représente la population de cellules à apoptose tardive, Q3 (en bas à droite) représente la population de cellules à apoptose précoce ; Q4 (en bas à gauche) représente la population de cellules vivantes. (E) La quantification par FACS des cellules apoptotiques (Annexine_V +/ DAPI +) est analysées et présentée par les proportions relatives au contrôle (DMSO) illustrées par les moyennes \pm l'écart type de trois expériences indépendantes. Les valeurs obtenues ont été analysées par ANOVA à une voie et Tukey-test (**p<0.001; ***p<0.0001; n=3 expériences indépendantes).

1.3. L'inhibiteur de eIF4A CR-1-31b ne ralentit pas uniquement la prolifération cellulaire, mais induit aussi l'apoptose:

La survie et la prolifération cellulaire sont modulées par des groupes de protéines telles que les protéines anti apoptotiques de la famille BCL2 et les protéines régulatrices du cycle cellulaire CYCLINE D3 et CDK4. Ces protéines sont encodées par des ARNm caractérisés par des extrémités 5'UTR longues et structurées et qui ont la particularité d'être eIF4A dépendantes (98-101). Dans le but de mettre en évidence l'effet apoptotique de l'inhibiteur du eIF4A CR-1-31b sur les cellules A375 et A375R, celles-ci ont été traitées aux doses croissantes de $1 \times IC_{50}$, $2 \times IC_{50}$ et $4 \times IC_{50}$, soit : 3.5, 7 et 14nM de cette drogue, pendant 72h, puis soumises à une analyse de l'apoptose (Annexine_V/DAPI) par cytométrie en flux. Les résultats montrent que les deux lignées cellulaires entrent en apoptose de façon similaire et relativement proportionnelle aux concentrations croissantes de CR-1-31b. En effet, les cellules A375 et A375R montrent des taux d'apoptose d'environ 60% et 50% pour un traitement à $2 \times IC_{50}$ et d'environ 80% et 60% pour un traitement à $4 \times IC_{50}$ respectivement (**Figure 3.2.D**). Cette augmentation des taux de cellules apoptotiques est très significative comparativement aux échantillons contrôles et aux échantillons traités à $1 \times IC_{50}$, où les taux des cellules apoptotiques ne sont que d'environ 5 à 10%

(Figure 3.2.D, 3.2.E). Démontrant ainsi que le taux de l'apoptose induite par cette drogue est dose dépendant.

1.4. L'inhibiteur de BRAF régule à la baisse l'activité de mTORC1 dans les cellules sensibles, sans affecter autant les cellules résistantes:

Les besoins accrus des protéines oncogéniques en énergie donnent aux cellules cancéreuses un caractère très énergivore (102), c'est pourquoi ces cellules adaptent leur production d'ATP au processus de la traduction (103) qui est cependant régulé par le complexe mTORC1 (102). Dans le but de déterminer l'effet de CR-1-31b (7 nM), de PLX4032 (2000 nM) et de leur combinaison sur la cascade de signalisation mTORC1 des cellules A375 et A375R, nous avons mesuré la phosphorylation des protéines cibles en amont et en aval de ce complexe mTORC1 par une analyse western blot à 1h, 6h et 24h de traitement. Les cellules sensibles traitées au PLX4032 (2000 nM), présentent une réduction de la phosphorylation de ERK1 / 2 par rapport au contrôle ERK1 / 2 totaux, après 1h de traitement. Cette réduction n'est cependant pas aussi notable dans les cellules de la lignée résistante, où la phosphorylation n'a pas été autant affecté (Figure 3.3). La variation de ce statut de phosphorylation témoigne de l'abolition de la signalisation MAPK/ERK menant ainsi à une régulation à la baisse du complexe mTORC1 dans les cellules sensibles uniquement. En concordance, ces échantillons présentent une diminution de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 (RPS6) ainsi que de la phosphorylation du facteur 4E-binding protein 1 (4E-BP1) après 6 à 24h de traitement par rapport aux niveaux des protéines RPS6 et 4E-BP1 totaux (Figure 3.3) en aval de la signalisation mTORC1. Ceci illustre ainsi la suppression de la signalisation mTORC1 dans les cellules sensibles comparativement aux cellules résistantes, ce qui indique que les cellules A375R sont effectivement résistantes aux inhibiteurs de kinase et ne répondent pas au PLX4032 comme le font les cellules A375. Les échantillons des deux lignées traitées au CR-1-31b (7nM) présentent, quant à eux, un effet marqué par la réduction des protéines BCL2, CYCLIN D3 et CDK4, notable plus tardivement, à partir de 24h de traitement, témoignant ainsi de l'efficacité de cet inhibiteur de eIF4A (Figure 3.3). La combinaison des deux drogues aux mêmes concentrations précédentes présente un effet plus au moins similaire à celui causé par chaque drogue séparément dans chacune des deux lignées (Figure 3.3).

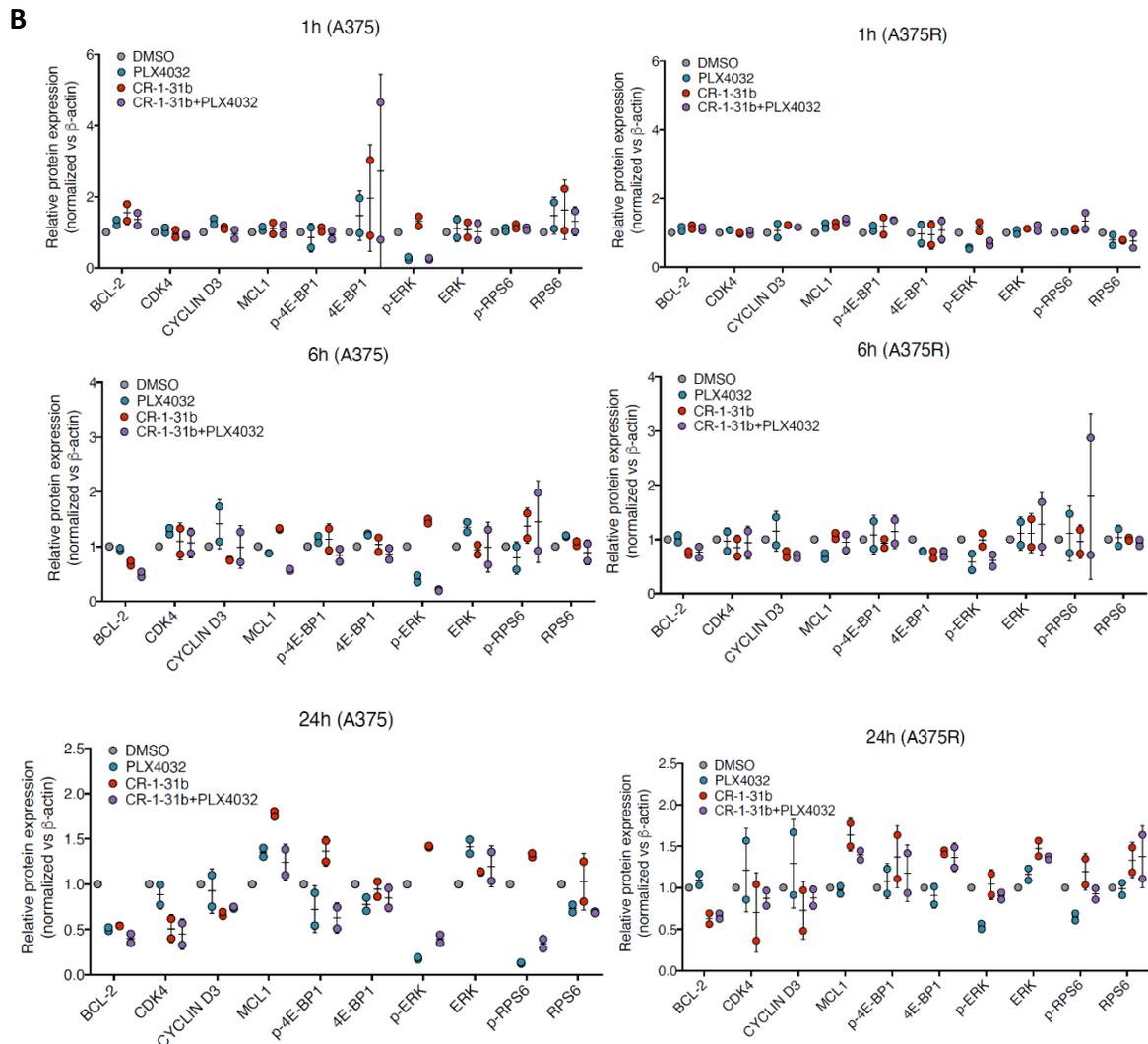
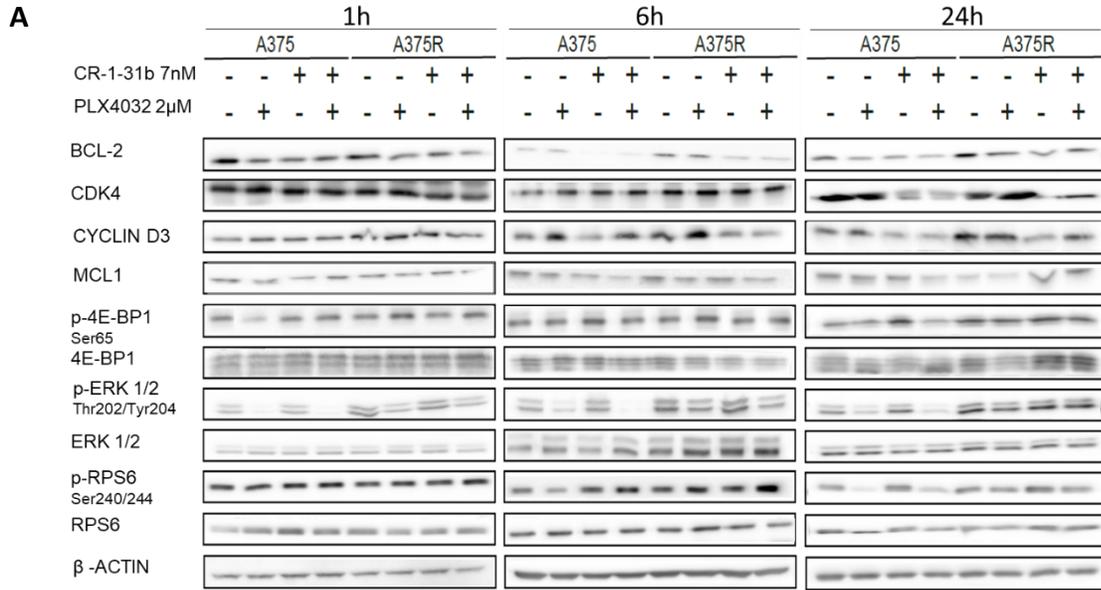


Figure 3.3. PLX4032 inhibe l'activité de mTORC1 uniquement dans les cellules sensibles alors que CR-1-31b réduit les niveaux des protéines cibles dans les deux lignées cellulaires. Les cellules A375 et A375R ont été traitées, comme indiqué : DMSO, PLX4032 (2000 nM), CR-1-31b (7 nM) ou la combinaison de PLX4032 + CR-1-31b pendant 1 h, 6 h et 24 h. (A) L'expression et le statut de phosphorylation des protéines indiquées ont été quantifiés par Western blot. La β -ACTINE a été utilisée comme contrôle de chargement. Les données sont représentatives de deux répliquas indépendants. (B) Quantification par densitométrie des bandes de l'expression et du statut de phosphorylation des protéines indiquées et présentées par Western blot en A. Les données sont représentatives de deux répliquas indépendants normalisées à la β -ACTINE et au DMSO de chaque Western-blot.

2.L'inhibiteur de eIF4A CR-1-31b ralentit le processus traductionnel actif et réduit la synthèse protéique :

Dans le but d'apprécier les changements du traductome, nous avons généré des extraits cellulaires contenant l'ARNm cytosolique total des échantillons de A375 et A375R traités aux DMSO (contrôle), PLX4032 (2000 nM), CR-1-31b (7 nM) ou PLX4032 (2000 nM) + CR-1-31b (7 nM). Les traitements des cellules sensibles au CR-1-31b + PLX4032 et des cellules résistantes au CR-1-31b seul n'ont pas été testés à cause d'un problème technique vu que le rotor de l'ultracentrifugeuse dont nous disposons ne supporte pas plus que six tubes de gradient. Le choix des six conditions testées est justifié par les faits que : 1) les cellules sensibles sont affectées autant par PLX4032 que par CR-1-31b, ainsi la condition des deux traitements combinés devrait montrer un effet similaire voir cumulatif de chaque drogue utilisée séparément, 2) les cellules résistantes à l'inhibiteur de BRAF sont affectées uniquement par l'inhibiteur de eIF4A CR-1-31b et ne présentent aucune variation lors du traitement au PLX4032 seul, ainsi les variations présentent lors de la combinaison PLX4032 + CR-1-31b reflètent l'effet de CR-1-31b seul. Pour contrer ce problème, des immunobuvardages de contrôles ont été réalisés parallèlement à chacune des expériences qui suivront, vérifiant ainsi la sensibilité et la résistance des paires de cellules ainsi que l'efficacité des drogues utilisés. Les ARNm extraits des cellules traitées ont été fractionnés, pour chacune des six conditions présentées dans la figure 3.4.A, par le fractionateur

Triax, après avoir été séparés par ultracentrifugation sur gradient de sucrose (5%-50%). Les fractions obtenues contiennent soit des ARNm attachés à plusieurs ribosomes formant des polysomes lourds, activement traduits, qui vont dans les parties les plus profondes du gradient, soit des ARNm dont la traduction n'est pas efficace (des monosomes ou des ARNm liés à deux ribosomes) et qui seraient plus légers restant donc dans les parties les plus hautes du gradient. La quantité d'ARNm à travers le gradient est estimée par la mesure continue de l'absorbance à 254nm dans le fractionateur Triax et rapportée par la courbe du profil polysomique des ARN (absorbance en fonction de la sedimentation) dans chaque condition (**Figure 3.4.A**). Les profils polysomiques des ARNm provenant des cellules traitées au CR-1-31b ou PLX4032 + CR-1-31b montrent une augmentation de l'absorbance des premières fractions correspondantes aux monosomes (80S) et une réduction de l'absorbance des fractions contenant les polysomes lourds associés à quatre complexes ribosomiaux ou plus, correspondants aux ARNm activement traduits, comparativement aux contrôles et aux échantillons traités au PLX4032 (**Figure 3.4.A**). Ceci indique que les cellules traitées aux CR-1-31b seul ou combiné au PLX4032 ralentissent leur processus traductionnel actif. Les fractions des polysomes lourds (ARNm activement traduits) obtenues de ces expériences seront analysées prochainement par séquençage (ARNseq) et la comparaison de leurs séquences à celles de l'ARNm total permettra de mettre en évidence les gènes caractérisés par une régulation traductionnelle dans chacune de ses conditions et codant pour des protéines cibles potentielles qui seront validées par des approches génétiques afin de décrypter de façon plus robuste les mécanismes sous-jacents à l'efficacité de CR-1-31b.

Le ralentissement du processus traductionnel actif est corroboré par une réduction de la production protéique totale. En effet les cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b (10nM) ou CR-1-31b(10nM) + PLX4032(2000nM) pour une période de 24h, montrent une réduction significative de l'incorporation de la puromycine dans les deux lignées cellulaires par rapport aux contrôles DMSO (**Figure 3.4.B**). Le traitement au PLX4032 (2000nM) seul entraîne une réduction de l'incorporation de la puromycine qui est plus marquée dans les cellules A375 sensibles que dans les cellules A375R résistantes (**Figure 3.4.B**). Cette réduction reflète une diminution de la synthèse protéique. Celle-ci est induite par l'inhibition directe du eIF4A par CR-1-31b, ou indirecte de la kinase BRAF par PLX4032, particulièrement dans les cellules sensibles, menant à l'abolition

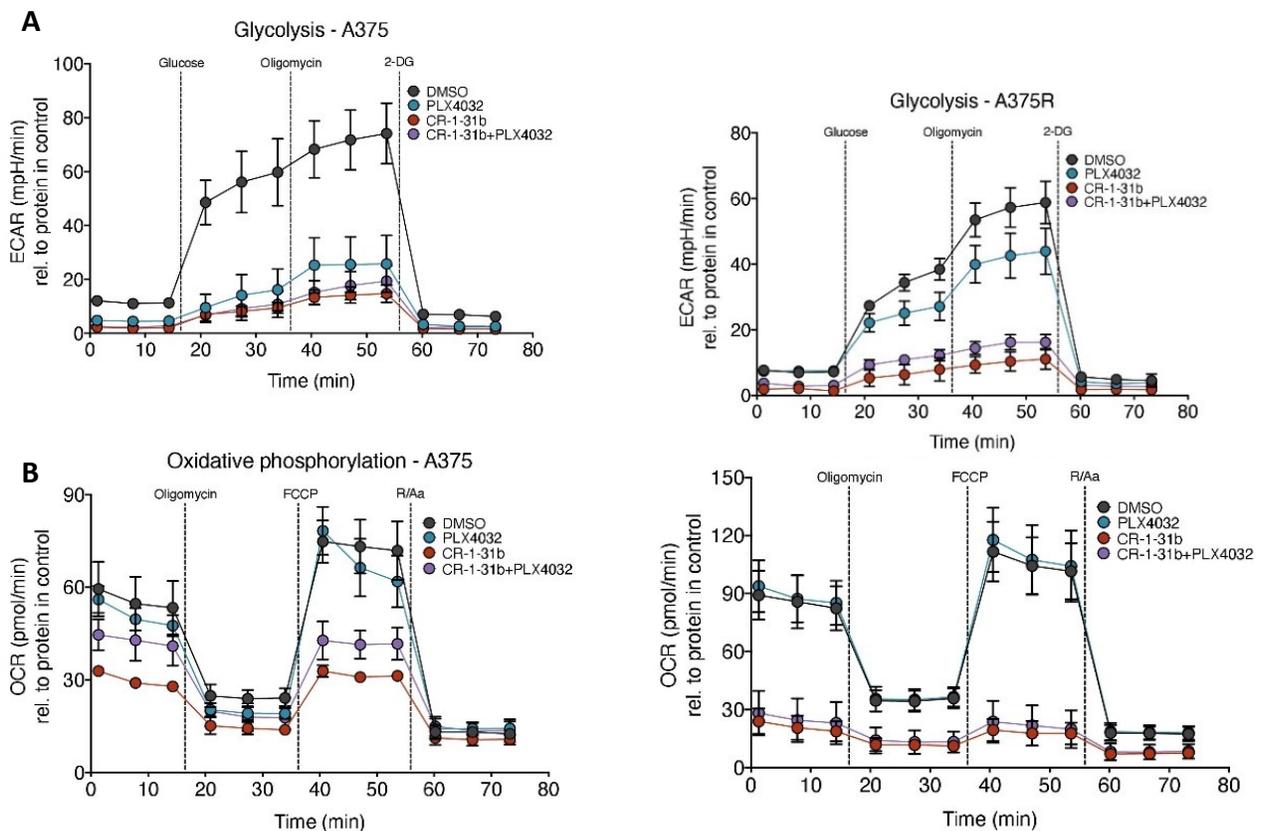
par ultracentrifugation des extraits cellulaires chargés sur des gradients de sucrose de 5% à 50%. L'absorbance à 254 nm a été mesurée en continu au cours du fractionnement afin d'obtenir les tracés d'absorbance. La position des sous-unités ribosomales 40S et 60S, du monosome (80S) et des polysomes (lourds et léger) est indiquée. (B) Les cellules A375 et A375R ont été traitées, comme indiqué, au DMSO, PLX4032 (2000 nM), CR-1-31b (7 nM) ou PLX4032 (2000 nM) + CR-1-31b (7 nM) pendant 1 heure, l'incorporation de la Puromycine a été quantifiée par Western blot. La β -ACTINE a été utilisée comme contrôle de chargement. Les données ont fait l'objet d'une analyse densitométrique évaluant l'intensité d'incorporation de la Puromycine illustrée par les moyennes \pm l'écart type des pourcentages de réduction de la Puromycine relatifs au contrôle (DMSO) de trois expériences indépendantes. Les valeurs ont été analysées par ANOVA à une voie et Tukey- test (* $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; $n = 3$ expériences indépendantes). (C) Les cellules A375 et A375R ont été traitées, comme indiqué, au DMSO, CR-1-31b (7 nM), PLX4032 (2000 nM) ou CR-1-31b + PLX4032 pendant 6 h et 24 h. L'expression des cibles protéiques ainsi que le statut de phosphorylation des protéines indiquées ont été quantifiés par Western blot. La β -ACTINE a été utilisée comme contrôle de chargement. Les données sont représentatives de quatre répliquas indépendants.

3.Effet de l'inhibiteur du eIF4A CR-1-31b sur le métabolisme cellulaire :

3.1. Le CR-1-31b réduit la production mitochondriale d'ATP et induit les cellules du mélanome en crise bioénergétique:

La traduction d'ARNm constitue un processus très énergivore (11), ainsi les cellules cancéreuses doivent adapter leur production d'ATP afin de répondre aux besoins énergétiques en matière de traduction (103). Une estimation des taux de la production d'ATP par glycolyse et par respiration mitochondriale a été réalisée par Seahorse XFe96 dans les cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b et/ou au PLX4032 pendant 24h comme indiqué dans la figure 3.5. La quantification des taux protéiques des cellules des différentes conditions présentées dans la figure 3.5 en utilisant le kit de dosage de protéines BCA a permis de vérifier la viabilité cellulaire. Ces taux ont été utilisés pour normaliser les données des taux d'acidification extracellulaire et des taux de consommation d'oxygène estimés par Seahorse et présentés dans la figure 3.5.

L'estimation des taux d'acidification extracellulaire (ECAR) montre une réduction significative de la glycolyse et de la capacité glycolytique maximale des cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b seul ou combiné au PLX4032 par rapport au contrôle DMSO. Le traitement au PLX4032 seul réduit lui aussi la glycolyse et la capacité glycolytique maximale. Cette réduction est cependant très marquée dans les cellules A375 sensibles à l'inhibiteur de BRAF et très peu notable dans les cellules A375R résistantes à cet inhibiteur de BRAF (**Figure 3.5**). Parallèlement, l'estimation des taux de consommation d'oxygène (OCR) montre, elle aussi, une réduction significative de la respiration basale ainsi que de la capacité respiratoire maximale dans les cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b seul ou combiné au PLX4032 par rapport au contrôle DMSO (**Figure 3.5**). Cette réduction est plus marquée dans les cellules A375R indiquant ainsi que ces dernières dépendent davantage de la phosphorylation oxydative que les cellules sensibles. Ces réductions reflètent une inhibition de la production mitochondriale d'ATP par glycolyse et par phosphorylation oxydative dans les deux lignées cellulaires traitées à l'inhibiteur de eIF4A CR-1-31b, ce qui les induit en crise bioénergétique.



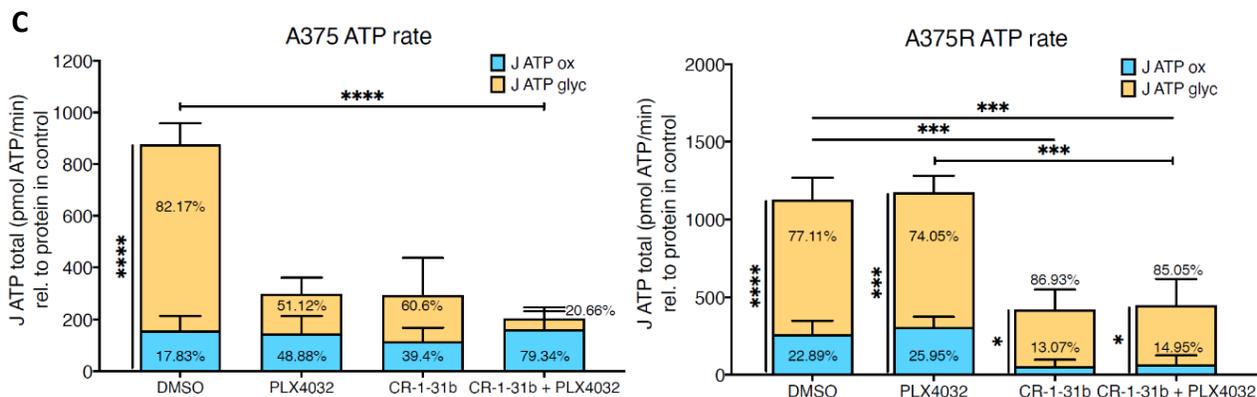


Figure 3.5. Le CR-1-31b induit les cellules A375 et A375R en crise bioénergétique par réduction de la production d'ATP. Les cellules A375 et A375R ont été traitées, comme indiqué, au DMSO, PLX4032 (2000 nM), CR-1-31b (7 nM) ou PLX4032 (2000 nM) + CR-1-31b (7 nM) pendant 24 heures. (A) Les fonctions glycolytiques (Glycolyse et capacité glycolytique maximale) des deux lignées cellulaires ont été évaluées pour chaque condition par l'estimation au Seahorse des taux d'acidification extracellulaire (ECAR) après des injections de Glucose (10mM), d'Oligomycin (1uM) et du 2-deoxy-glucose (2-DG) (50mM). (B) Les fonctions de la respiration mitochondriale (respiration basale, respiration liée à l'ATP et capacité respiratoire maximale) des deux lignées cellulaires ont été évaluées pour chaque condition par l'estimation au Seahorse des taux de consommation d'oxygène (OCR) après des injections d'Oligomycine (1uM), FCCP (1uM) et Roténone + Antimycine A (0.5uM). Les données sont rapportées sur les courbes par les moyennes \pm l'écart type de trois expériences indépendantes réalisées en trois répliquas techniques chacune. (C) Les niveaux d'ATP produites par la glycolyse versus la phosphorylation oxydative des deux lignées cellulaires ont été mesurées pour chaque condition. Les valeurs ont été analysées par ANOVA à une voie et Tukey- test (* $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; $n = 3$ expériences indépendantes). Les données représentées dans les trois panels (A, B et C) sont normalisées par rapport au taux des protéines totales de chaque condition dans les deux lignées cellulaires.

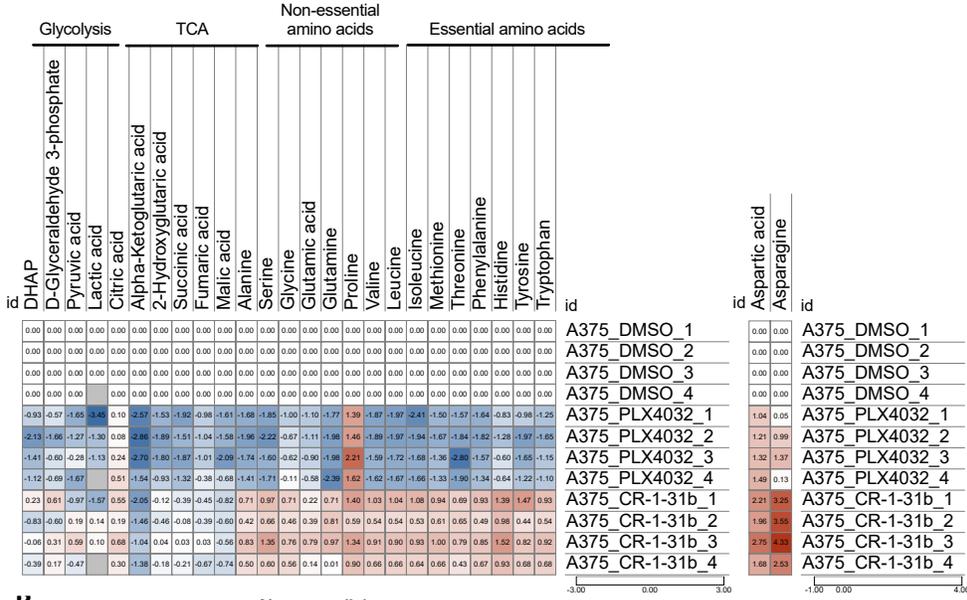
3.2. Le CR-1-31b réduit les métabolites de la glycolyse et du cycle TCA et entraîne une accumulation des acides aminés :

Dans le but d'apprécier les changements des intermédiaires des principales voies métaboliques, une analyse des métabolites de la glycolyse, du cycle TCA et des acides aminés quantifiés par GCMS des lysats de cellules A375 et A375R traitées pendant 24h aux DMSO, CR-1-31b (7nM), PLX4032 (2000 nM) ou CR-1-31b (7nM) + PLX4032 (2000 nM) a été réalisée (**Figure 3.6.A, 3.6.B**). Des contrôles de la viabilité cellulaire et de l'efficacité des traitements ont été réalisés parallèlement par le comptage des cellules vivantes marquées au bleu de trypan (**Figure 3.6.D**) et la quantification des protéines eIF4A dépendantes ainsi que du statut de phosphorylation des cibles protéiques en amont et en aval de mTORC1 par western blots (**Figure 3.6.C**). Cette analyse montre une variation particulièrement marquée dans les cellules sensibles traitées au PLX4032 dans les trois voies métaboliques (**Figure 3.6.A, 3.6.B**). En effet, une grande partie des métabolites de la glycolyse et du cycle de l'aide citrique ainsi que la majorité des acides aminés quantifiés sont significativement réduits dans cette condition comparativement au contrôle DMSO (**Figure 3.6.A**). En revanche, aucune de ces voies métaboliques n'est significativement affectée par ce traitement dans les cellules résistantes A375R comparativement au contrôle DMSO, rajoutant ainsi une autre preuve de résistance (**Figure 3.6.B**).

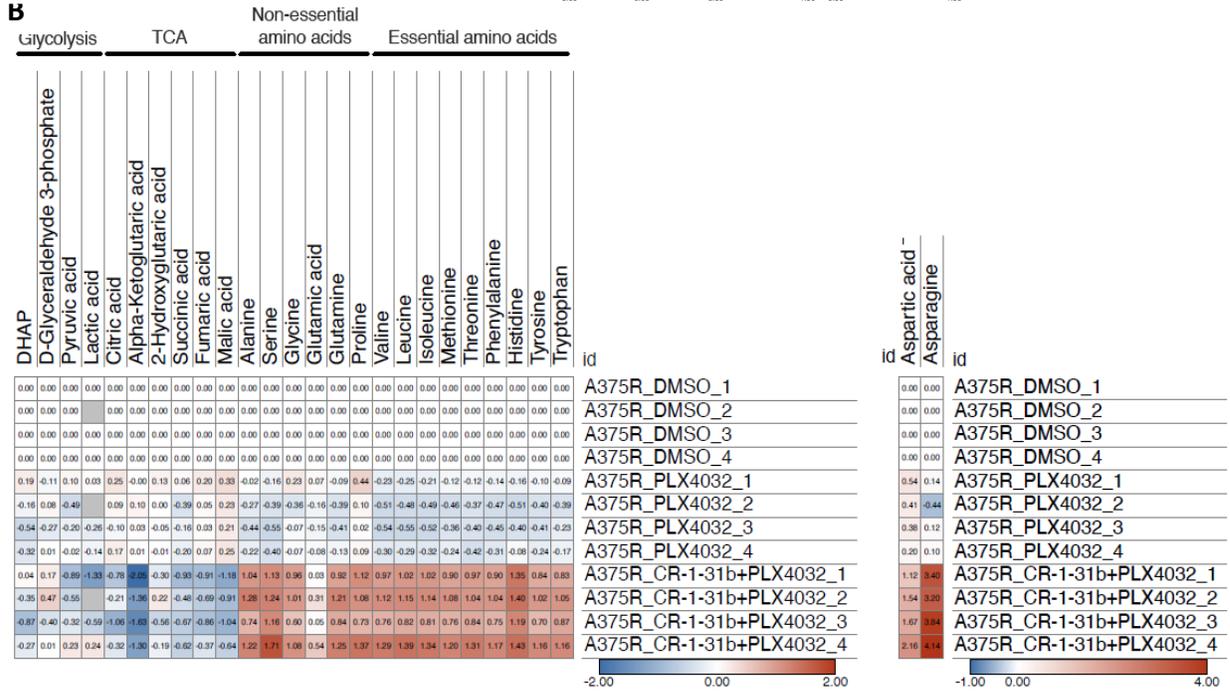
Le traitement au CR-1-31b montre quant à lui, un effet sur les trois voies métaboliques et dans les cellules des deux lignées testées. Qu'il soit seul (dans les A375) ou combiné au PLX4032 (dans les A375R), le CR-1-31b entraîne une diminution dans la plupart des métabolites issu de la glycolyse, une réduction plus notable dans la majorité des métabolites du cycle de l'acide citrique, notamment l'acide lactique, l' α -cétoglutarate, le fumarate et le malate ainsi qu'une importante accumulation des acides aminés essentiels et non essentiels causé par l'inhibition de la synthèse protéique.

Finalement, afin d'apprécier l'effet du CR-1-31b sur les deux lignées cellulaires, la comparaison des métabolites quantifiés dans les cellules A375R traitées au CR-1-31b + PLX4032 aux cellules A375 traitées au CR-1-31b montre, quant à elle, une grande similitude dans toutes les voies métaboliques analysées. En effet, tous les métabolites quantifiés sont semblablement présents dans les deux lignées cellulaires traitées au CR-1-31b.

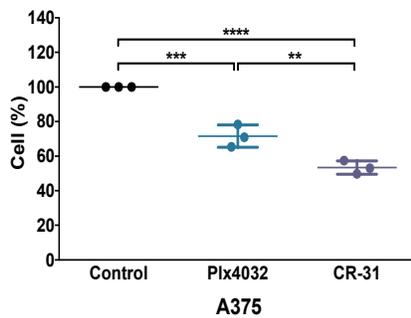
A



B



C



D

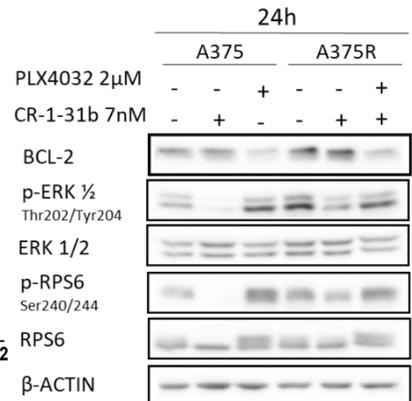


Figure 3.6. CR-1-31b inhibe la glycolyse, le cycle de l'acide citrique et la synthèse protéique dans les cellules sensibles et résistantes au PLX4032. (A) Carte thermique des métabolites de la glycolyse, du cycle de l'acide citrique et des acides aminés quantifiés par GCMS des cellules A375 traitées pendant 24h comme indiqué (DMSO, PLX4032 (2000 nM), CR-1-31b (7 nM) ou PLX4032 (2000 nM) + CR-1-31b (7 nM)). (B) Carte thermique des métabolites de la glycolyse, du cycle de l'acide citrique et des acides aminés quantifiés par GCMS des cellules A375R traitées pendant 24h comme indiqué (DMSO, PLX4032 (2000 nM), CR-1-31b (7 nM) ou PLX4032 (2000 nM) + CR-1-31b (7 nM)).(C) Le nombre des cellules A375 et A375R vivantes déterminé par l'exclusion au bleu de Trypan et le comptage au Dropcell après un traitement de 24h aux DMSO, PLX4032 (2000 nM), CR-1-31b (7 nM) ou PLX4032 (2000 nM) + CR-1-31b (7 nM) validant la viabilité des cellules pour la GCMS. Le nombre des cellules vivantes a également été utilisé pour la normalisation des valeurs obtenues par la GCMS. Les valeurs ont été analysées par ANOVA à une voie et Tukey-test (* $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; $n = 3$ expériences indépendantes). (D) Les cellules A375 et A375R ont été traitées comme indiqué aux DMSO, PLX4032 (2000 nM), CR-1-31b (7 nM) ou PLX4032 (2000 nM) + CR-1-31b (7 nM) pendant 24h. L'expression des cibles protéiques ainsi que le statut de phosphorylation des protéines indiquées ont été quantifiés par Western blot pour valider l'efficacité des drogues ainsi que la sensibilité des A375 et la résistance des A375R à l'inhibiteur de BRAF. La β -ACTINE a été utilisée comme contrôle de chargement. Les données sont représentatives de trois répliquas indépendants.

4. La dépendance des cellules du mélanome à la glutamine:

La majorité des cellules cancéreuses présentent des dépendances métaboliques qui les distinguent des cellules normales (104). Parmi ces dépendances, il y a l'utilisation accrue de l'acide aminé glutamine pour alimenter les processus anaboliques (105). En effet, cet acide aminé soutient le métabolisme néoplasique d'un grand éventail de cellules tumorales. Cependant les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas encore pleinement élucidés. Dans le but de vérifier la dépendance des cellules du mélanome à la glutamine et afin de consolider d'avantage les résultats de la GCMS par rapport à la forte réduction du α -cétoglutarate, un métabolite du cycle de l'acide citrique qui a comme principale source le glutamate dérivé de la glutamine par la glutamate déshydrogénase (GDH/GLUD1) (48), l'aspect prolifératif des cellules A375 et A375R en

présence d'un gradient de glutamine combiné ou non à l'inhibiteur de eIF4A CR-1-31b, ou à l'inhibiteur de BRAF PLX4032, a été évalué. Les cellules A375 et A375R ont été mises en culture dans des milieux à concentrations variables de Glutamine (4, 1, 0.25, 0.1, 0 mM) pour une durée de 72h comme indiqué à la figure 3.7.A. Le nombre des cellules vivantes rapporté par les courbes de croissance cellulaire des deux lignées mises en culture dans un gradient de Glutamine normalisé par rapport aux contrôles (4mM de Glutamine) (**Figure 3.7.A**), présente une réduction significative du compte cellulaire relativement proportionnelle à la concentration de la Glutamine (**Courbe en noire, Figure 3.7.A**). Ceci témoigne de la haute dépendance des deux lignées cellulaires à la Glutamine.

Dans le but d'évaluer l'effet de l'inhibiteur de eIF4A CR-1-31b et de l'inhibiteur de BRAF PLX4032 aux faibles concentrations ou en absence de glutamine, les cellules A375 et A375R ont été mises en culture dans des milieux à concentrations variables de glutamine (4, 1, 0.25, 0.1, 0mM) en présence et en absence du CR-1-31b (3.5nM) ou du PLX4032 (100nM pour les A375 ou 2000nM pour les A375R) pour une durée de 72h comme indiqué dans la figure 3.7.A. Les courbes de croissance cellulaire des deux lignées mises en culture dans un gradient de glutamine combiné au CR-1-31b ou au PLX4032 (**Courbes rouges, Figure 3.7.A**) comparées aux courbes de croissance cellulaire des deux lignées mises en culture dans un gradient de glutamine en absence du CR-1-31b et du PLX4032 (**courbes noires, Figure 3.7.A**) montrent une réduction significative de la prolifération cellulaire à 4 et 1mM de Glutamine dans les A375 traitées aux deux drogues ainsi que les A375R traitées au CR-1-31b. Cependant, avec un taux de viabilité variant de 40 à 60% dans les deux lignée cellulaire mises en culture à 0.25mM de glutamine (**courbes noires, Figure 3.7.A**), la prolifération cellulaire ne varie pas en présence de CR-1-31b ou de PLX4032 (**Courbes rouge, Figure 3.7.A**) par rapport à leur absence (**courbes noires, Figure 3.7.A**). Le ralentissement de la prolifération cellulaire dans ces conditions est donc relié à la déprivation à la glutamine et non pas à l'inhibiteur de eIF4A ou à l'inhibiteur de BRAF qui semblent perdre leur efficacité à faibles concentrations de glutamine. Ceci est également vérifié par la quantification des protéines eIF4A dépendantes (BCL2 et CDK4) dans les cellules A375 et A375R mises en culture dans des milieux à faible concentration ou en absence de glutamine et traitées ou non au CR-1-31b (10nM) (**Figure 3.7.B**) qui ne montre aucune variation significative des taux de la protéine anti-apoptotique BCL2

mais présente une petite réduction peu significative des taux de la protéine du cycle cellulaire CDK4 dans les deux lignées traitées ou non au CR-1-31b. Ces constatations permettent donc de valider l'impact de la déprivation à la glutamine qui réduit particulièrement la prolifération cellulaire sans affecter la viabilité cellulaire.

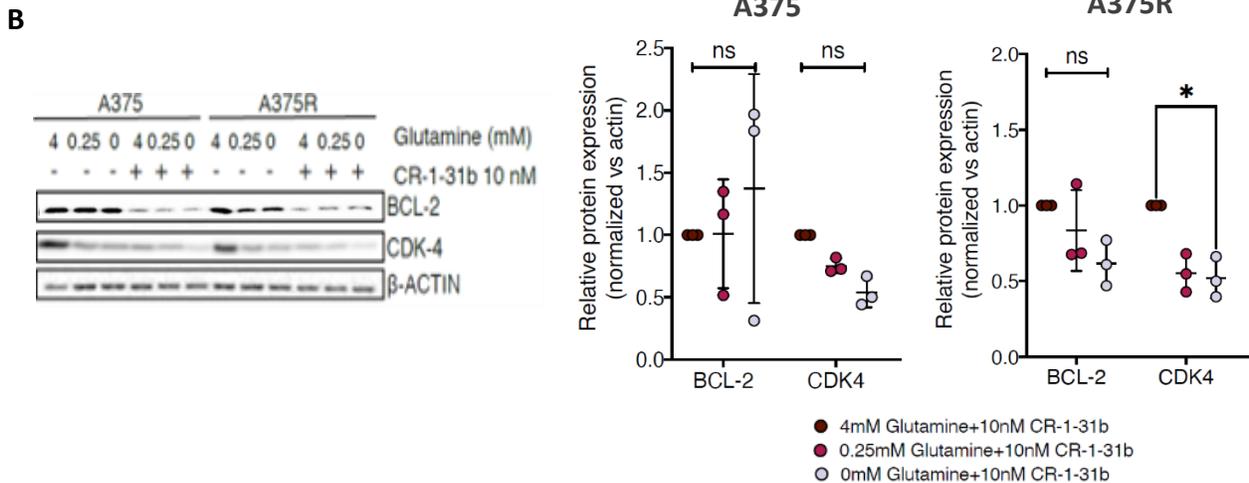
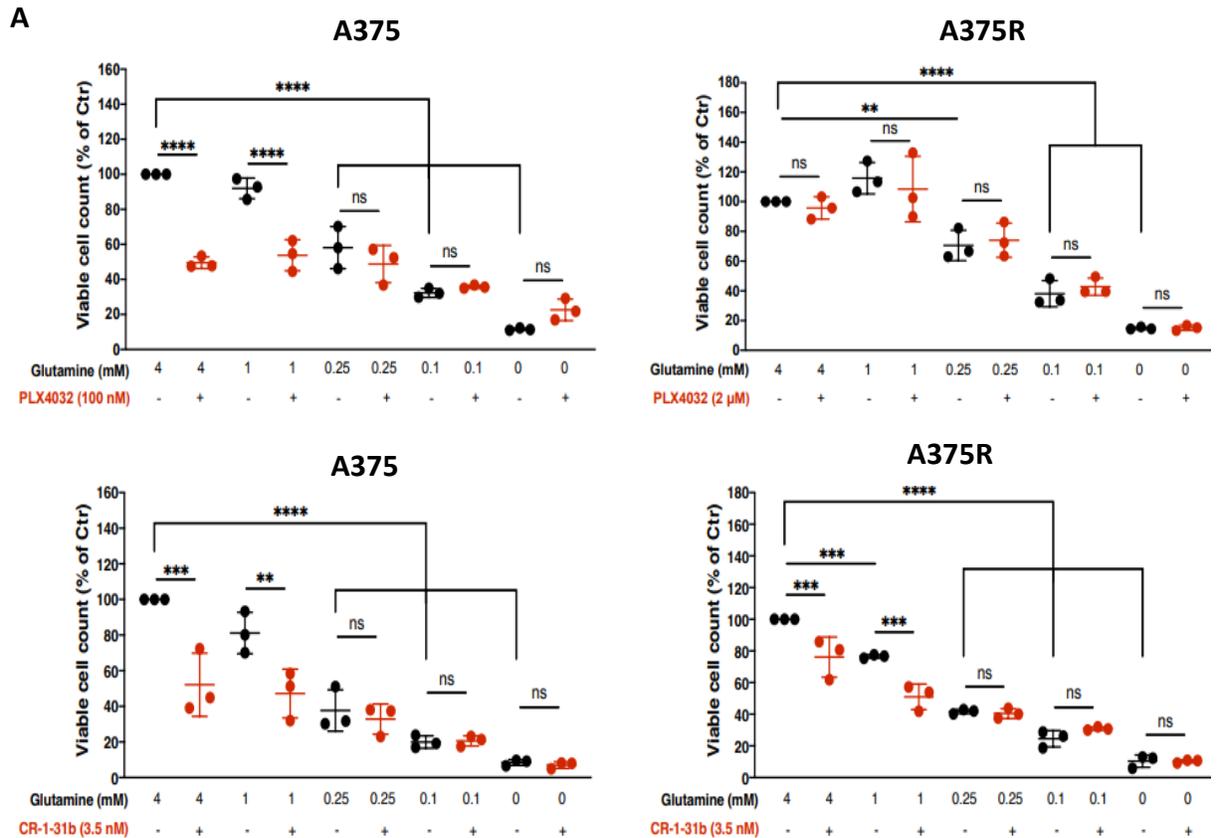


Figure 3.7. Les cellules A375 et A375R sont hautement dépendantes à la glutamine et réduisent leur potentiel prolifératif à basse concentration ou en absence de cet acide aminé.

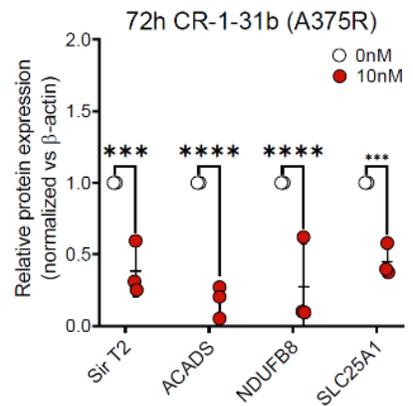
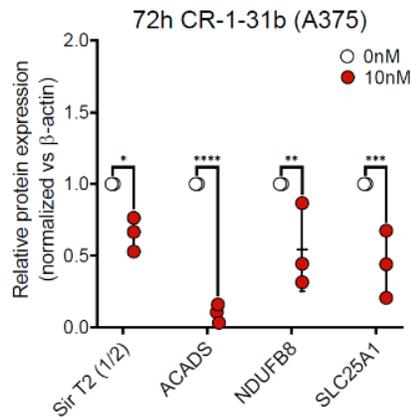
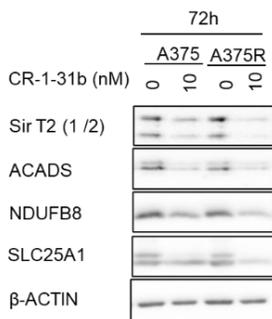
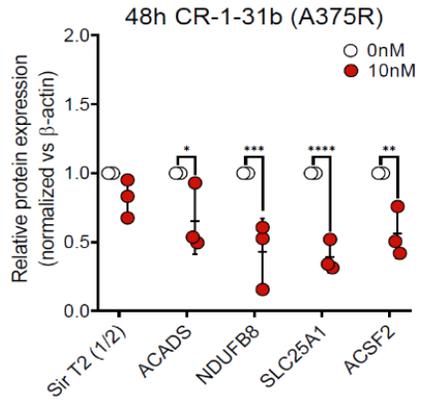
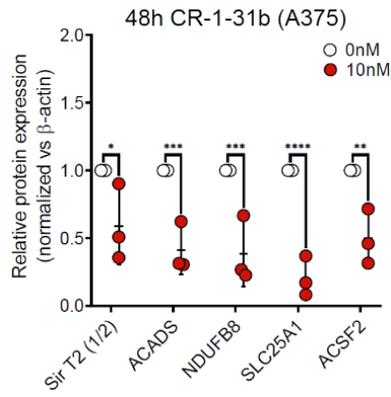
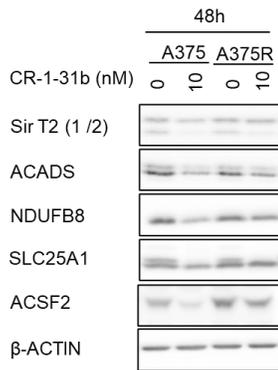
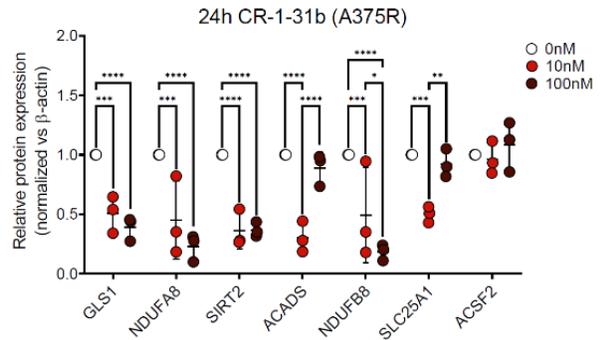
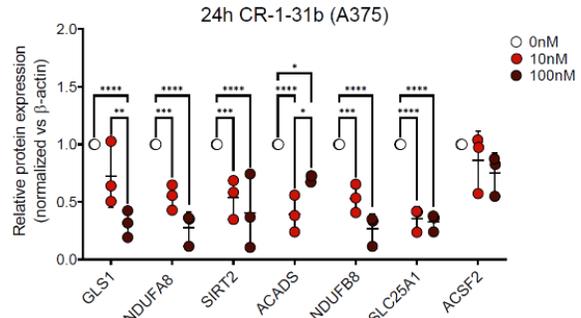
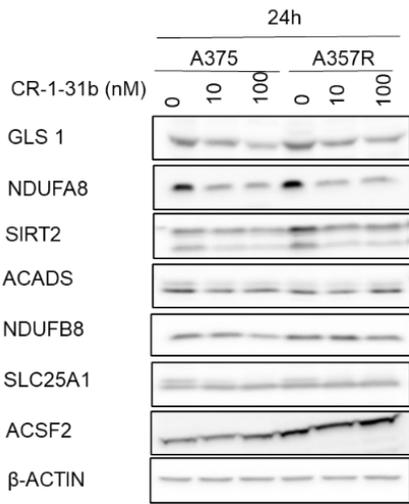
A) Les cellules A375 et A375R ont été mises en culture pour une durée de 72h dans des milieux à concentrations variables de glutamine (4, 1, 0.25, 0.1, 0mM) en absence et en présence du PLX4032(100nM pour les A375 ou 2000nM pour les A375R) pour les courbes illustrées en haut ou en présence et en absence du CR-1-31b (3.5nM) pour les courbes illustrées en bas. Le nombre de cellules vivantes a été déterminé par l'exclusion au bleu de Trypan et le comptage au Dropcell. Les résultats sont présentés par les courbes de croissance, rapportant les moyennes \pm l'écart type des pourcentages de cellules viables normalisés par rapport au contrôle (4mM de Glutamine) de trois expériences indépendantes réalisées en trois répliquas techniques chacune. Ces valeurs ont été analysées par ANOVA à une voie et Tukey-test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). B) Les cellules A375 et A375R ont été mises en culture dans des milieux à concentrations variables de glutamine (4, 0.25, 0mM) en absence et en présence du CR-1-31b (10 nM) pendant 24h. L'expression des cibles protéiques indiquées a été quantifiés par Western-blots à gauche et par densitométrie à droite pour valider l'efficacité de CR-1-31b à faible concentration ou en absence de glutamine. La β -ACTINE a été utilisée comme contrôle de chargement. Les données sont représentatives de trois répliquas indépendants. Les valeurs de la densitométrie des bandes obtenues ont été analysées par ANOVA à une voie et Tukey-test (* $p < 0.1$).

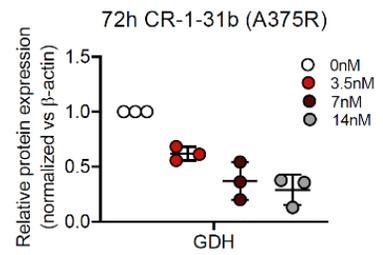
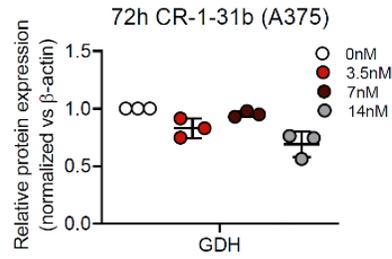
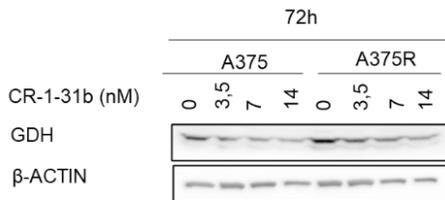
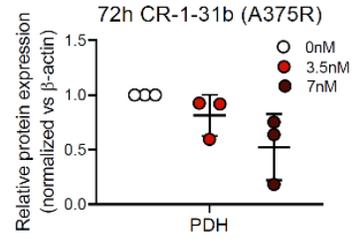
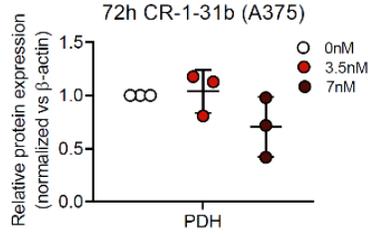
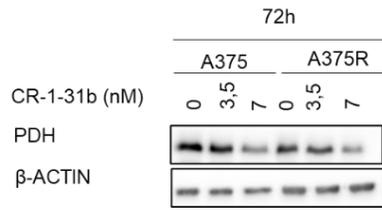
5. Le CR-1-31b réduit plusieurs cibles potentielles impliquées dans différentes voies métaboliques:

Basé sur les résultats retrouvés lors de l'investigation du métabolome des cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b et dans le but de décrypter les mécanismes moléculaires de cet inhibiteur de eIF4A, des cibles potentielles impliquées dans différentes voies métaboliques ont été évaluées par Western-blots des protéines et q-PCR des ARNm extraits des cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b comme indiqué dans les figures 3.8.A et 3.8.B. Des traitements de courte durée (24h) à faible et forte concentrations (10 et 100nM) de CR-1-31b ainsi que des traitements de moyenne durée (48h et 72h) à plus faibles concentrations (1 XIC_{50} à 4 XIC_{50}) de CR-1-31b ont été réalisés afin de vérifier la réduction des cibles potentielles de CR-1-31b associée à

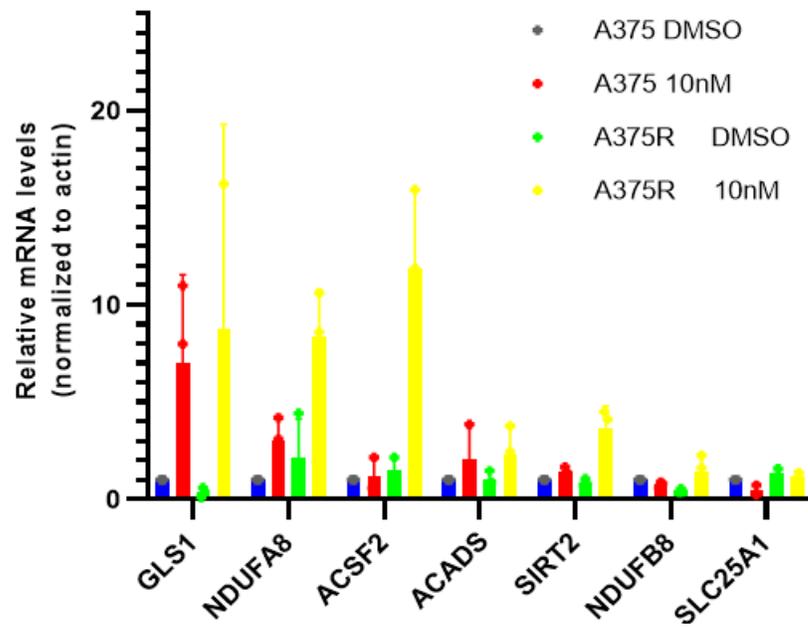
une bonne viabilité cellulaire (appréciée par la confluence cellulaire au microscope optique au moment de la collecte cellulaire). La quantification de certaines enzymes appartenant à différentes voies métaboliques (**Figure 3.8.A**), notamment la GLS qui catalyse la transformation de la glutamine en glutamate; la NDUFA8 et la NDUF8 qui constituent des sous unités de la chaîne respiratoire; l'ACADS et l'ACSF2, des enzymes qui catalysent la β -oxydation des acides gras ainsi que la GDH, la PDH et la SLC25A1 qui alimentent le cycle de l'acide citrique par la transformation de la glutamate en α -cétoglutarate et de la pyruvate en acétyl-CoA ainsi que le transport transmembranaire de citrate et de malate respectivement; montre une réduction dans les deux lignées cellulaires traitées au CR-1-31b. Les niveaux d'ARNm de ces cibles quantifiées par q-PCR dans les cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b (10nM) et normalisées au contrôle DMSO comme indiqué dans la figure 3.8.B, montrent une augmentation significative dans certaines cibles, soit, la GLS, NDUFA8 et ACSF2 témoignant d'une compensation transcriptionnelle secondaire à la régulation traductionnelle pour ces molécules. La quantification des niveaux d'ARNm du reste des cibles ne montre pas de variation notable. Ceci permet de déduire que le CR-1-31b agit à différents niveaux de plusieurs voies métaboliques via des mécanismes moléculaires qui restent à disséquer.

A





B



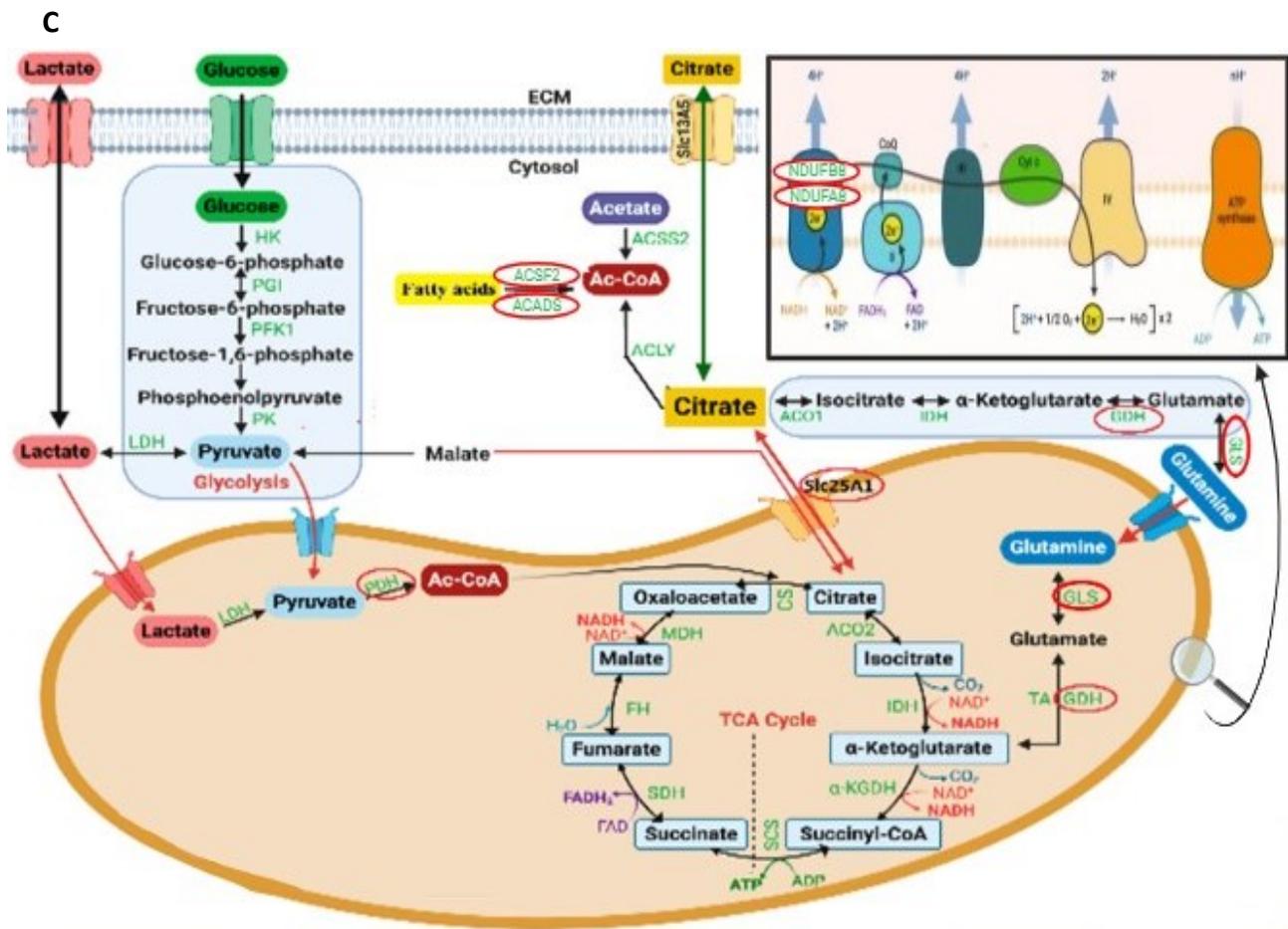


Figure 3.8. Les cibles potentielles de CR-1-31b. (A) Les cellules A375 et A375R ont été traitées au CR-1-31b comme indiqué. L'expression des cibles potentielles indiquées a été quantifiée par Western blot (à droite) et densitométrie des bandes (à gauche). La β -ACTINE a été utilisée comme contrôle de chargement. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Ces valeurs ont été analysées par ANOVA à une voie et Tukey-test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). (B) Les cellules A375 et A375R ont été traitées au CR-1-31b pendant 48h comme indiqué. Les niveaux d'ARNm relatifs des cibles potentielles indiquées ont été quantifiés par RT-qPCR et normalisés à la β -ACTINE et au contrôle (DMSO). Les données sont rapportées sur les courbes par les moyennes \pm l'écart type de trois expériences indépendantes réalisées en trois répliquas techniques chacune. (C) Schéma représentatif des principales voies métaboliques (Glycolyse, Cycle TCA, β -oxydation des Acides gras et métabolisme de quelques acides aminés) et de quelques cibles moléculaires potentielles du CR-1-31b dans les cellules A375 et A375R (GDH, PDH, SLC25A1, ACADS, ACSF2, NDUFA8, NDUFB8 et GLS) marquées par des cercles rouges.

Chapitre 4 : Discussion

La résistance des cellules cancéreuses aux thérapies ciblées est soutenue par la réactivation des voies métaboliques et le remodelage des programmes traductionnels. Ceci est le cas des cellules du mélanome BRAF^{V600E} résistantes aux inhibiteurs de kinases. En fait, la réactivation de ces processus permet à ces cellules de s'adapter à ces drogues, et de continuer à croître et à proliférer (106). Ainsi, il a été proposé que l'inhibition de la machinerie traductionnelle puisse surmonter cette résistance (89, 107, 108). En effet, des études antérieures suggèrent que les molécules ciblant l'assemblage du complexe eIF4F (ciblage du eIF4G par la molécule SBI-756) (88) ou sa fonction (ciblage du eIF4A par les Rocaglates) améliorent l'activité des inhibiteurs de BRAF, dont le Vemurafenib et l'Encorafenib (107, 108). Néanmoins, les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'efficacité de ces molécules ne sont pas entièrement compris.

En effet, de nombreuses études ont démontré que la réactivation de la voie PI3K-AKT-mTORC1 constitue un mécanisme soutenant les récurrences et la résistance aux thérapies ciblées des cancers malins (83, 84, 109) notamment le mélanome résistant aux inhibiteurs de la kinase BRAF. Dans notre étude nous avons montré que l'inhibiteur de BRAF Vemurafenib (PLX4032) régule à la baisse l'activité du complexe mTORC1 dans les cellules A375, des cellules de mélanome BRAF^{V600E} sensibles au PLX4032, sans affecter autant celle-ci dans les cellules résistantes A375R. En effet, l'analyse de l'expression et du statut de phosphorylation de quelques cibles directes et indirectes de la kinase oncogénique BRAF en amont et en aval du complexe mTORC1 dans des cellules A375 et A375R traitées au PLX4032, montre que cette drogue entraîne une réduction du statut de phosphorylation de ERK 1/2 (cible directe de BRAF) particulièrement notable dans les cellules A375, ainsi qu'une perturbation traductionnelle médiée par l'inhibition du complexe mTORC1. Celle-ci est marquée par la réduction du statut de phosphorylation de 4E-BP1 et de RPS6 après 24h de traitement de façon plus significative dans ces cellules sensibles A375 comparativement aux cellules A375R. En revanche, les taux des protéines BCL-2, CYCLIN D3 et CDK4, des cibles connues des inhibiteurs de eIF4A (8), sont quant à eux réduits de façon significative lors d'un traitement à l'inhibiteur du facteur eIF4A CR-1-31b seul ou combiné au PLX4032. Cette réduction est bien claire après 24h de traitement autant dans les cellules sensibles que dans les cellules résistantes. Nos résultats appuient plusieurs autres études déjà publiées qui

suggèrent que la traduction régulée par la voie PI3K-AKT-mTORC1 soutenant la récurrence et la résistance aux thérapies ciblées peut être efficacement ciblée par les inhibiteurs de eIF4A dans plusieurs pathologies néoplasiques dont la leucémie myéloïde aiguë (110).

Le facteur eIF4A constitue une cible essentielle en aval de mTORC1 qui contrôle l'initiation de la traduction de l'ensemble des ARNm pro-oncogéniques (106). Dans cette étude, nous avons testé plusieurs inhibiteurs de eIF4A sur différentes lignées cellulaires de mélanome sensibles et résistantes aux inhibiteurs de kinases et nous avons observé un effet antiprolifératif notable lors des traitements *in vitro*. En effet, les quatre inhibiteurs de eIF4A Silvestrol, SDS-1-021, CMLD et CR-1-31b testés, réduisent la croissance cellulaire des lignées A375 et A375R, des cellules de mélanome BRAF^{V600E} sensibles et résistantes à l'inhibiteur de BRAF Vemurafenib, à des doses nanomolaires. Ceci est comparable à l'effet de ces drogues sur les cellules leucémiques FLT3-wt et FLT3-ITD (111) et les cellules du cancer du sein NIC et NICR sensibles et résistantes aux inhibiteurs de kinases respectivement (résultats préliminaires de Dre Hulea non publiés). Le traitement au CR-1-31b à faibles concentrations nanomolaires réduit également la croissance des paires de lignées MM102 / MM102R et MDA-MB-231 / MDA-MB-231R, des cellules de mélanome et de cancer du sein qui porte des mutations BRAF autre que la BRAF^{V600E}, et qui constituent des lignées sensibles et résistantes à l'inhibiteur de kinases Encorafenib respectivement. Ceci est corroboré avec l'effet de ce rocaglate sur la réduction de la capacité des paires de lignées cellulaires A375 / A375R et MDA-MB-232 / MDA-MB-231R à régénérer des colonies après un traitement de courte durée et témoigne de l'efficacité de cette stratégie thérapeutique qui ne se limite pas uniquement au mélanome BRAF^{V600E} mais englobe aussi d'autre type de cancer.

Les cellules LU1205 et LU1205R sensibles et résistantes à l'inhibiteur de BRAF PLX4032 constituent un autre modèle de lignées cellulaires de mélanome malin. Cette paire de cellules a aussi été utilisée au cours de la validation de la plupart des effets observés dans les autres paires de modèles cellulaires *in vitro* (résultats préliminaires de Dre Hulea non publiés). Les différents traitements aux CR-1-31b réalisés sur cette paire de lignées cellulaires démontrent eux aussi une large activité antitumorale, provoquant une inhibition de la prolifération cellulaire combinée à l'induction d'une crise bioénergétique et donc à l'apoptose cellulaire. Il y a également la paire de cellules du cancer du sein HER2+ (isolée des souris MMTV-Neu-IRES-CRE) (112) comprise des

cellules NIC et NICR sensibles et résistantes à l'inhibiteur du récepteur à tyrosine kinas lapatinib qui pourrait être testée. De plus, il est possible de générer d'autres modèles cellulaires formé de paires de lignées cancéreuses sensibles et résistantes aux thérapies ciblées par l'exposition prolongé des lignées parentales aux concentrations croissantes de l'inhibiteur de kinase pour une longue durée.

Dans notre étude, nous avons également démontré que cette stratégie thérapeutique basé sur l'inhibition de la traduction en ciblant le facteur eIF4A ne ralentit pas uniquement la prolifération cellulaire mais induit aussi l'apoptose des cellules cancéreuses à plus de 50% après 72h de traitement à faibles concentrations (2X ou 4X IC₅₀) ce qui est très prometteur pour un meilleur pronostique par rapport au manifestations cliniques de ce cancer. Cette apoptose des cellules cancéreuses s'accompagne d'une réduction significative des protéines de survie et du cycle cellulaire BCL2, CYCLIN D3 et CDK4 quantifiées par western blot dans les trois paires de lignées cellulaires testées : A375 / A375R, MM102 / MM102R et MDA-MB-232 / MDA-MB-231R. Cette même classe d'inhibiteurs de eIF4A (rocaglates) a déjà été montré pour affecter l'expression des protéines de la famille BCL2, MYC, NRAS et des protéines du cycle cellulaire tels que CDK1 (113, 114). Ainsi, le choix de l'inhibiteur du eIF4A CR-1-31b et des concentrations optimales pour le reste des expériences sont motivés par plusieurs éléments : 1) C'est la drogue la plus caractérisée et qui a montré un effet bénéfique tant *in vitro* que *in vivo* dans la littérature (110, 115). 2) C'est une drogue synthétique qui est facilement obtenue comparativement au Silvestrol, qui est naturelle et donc plus dispendieuse et plus difficile à isoler. 3) C'est une molécule qui est actuellement commercialisée, disponible et à la portée de la recherche donnant ainsi au laboratoire une certaine indépendance concernant l'obtention des drogues.

Le profil polysomique des fractions d'ARNm montre une réduction des polysomes lourds dans les cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b. Ceci met en évidence un ralentissement du processus traductionnel actif, justifié par le mécanisme d'action de cette drogue au niveau de la synthèse protéique. En effet, la réduction de l'activité du complexe eIF4F via l'inhibition de l'hélicase eIF4A empêche l'ouverture des longues extrémités structurées 5'UTR, ce qui prévient l'accès du complexe d'initiation de la traduction au codon de départ et bloque ainsi l'initiation du processus traductionnel (14). Ceci impacte, par conséquent, la production protéique totale. Ce

ralentissement du processus traductionnel actif est corroboré par la réduction des taux d'incorporation de la Puromycine dans les cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b ainsi que les cellules A375 traitées au PLX4032. Cette réduction reflète une baisse des niveaux protéiques (116) expliquée d'une part par l'inhibition directe de la synthèse protéique par le CR-1-31b qui bloque l'hélicase eIF4A du complexe d'initiation de la traduction autant dans les cellules sensibles que dans les cellules résistantes, ou par le PLX4032 qui bloque la kinase BRAF de la voie MAPK notamment dans les cellules sensibles et module ainsi à la baisse l'activité de mTORC1 et donc la traduction des ARNm eIF4A dépendants, et de l'autre part par la dégradation des réserves protéiques stockées dans ces cellules (117).

Basé sur les données de la littérature qui propose que la résistance aux thérapies ciblées est soutenue en partie par la reprogrammation métabolique (118), nous avons exploré différentes voies métaboliques par Seahorse et GCMS. L'analyse Seahorse de la glycolyse et du métabolisme oxydatif par estimation des taux d'acidification extracellulaire (ECAR) et des taux de consommation d'oxygène (OCR) montre une réduction significative de la glycolyse et de la respiration mitochondriale dans les cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b seul ou combiné au PLX4032. Ceci est comparable aux résultats d'une étude antérieure qui révèle que l'inhibition des programmes traductionnels lors d'un traitement des cellules de l'adénocarcinome canalaire pancréatique (119) et de la leucémie myéloïde aiguë au CR-1-31b (110), réduit à la fois la glycolyse et la phosphorylation oxydative et induit ainsi une véritable crise bio-énergétique et la mort cellulaire subséquente. Ces constatations peuvent être expliquées par l'inhibition traductionnelle des ARNm codant pour des protéines essentielles au métabolisme glycolytique et à la respiration mitochondriale dans les cellules du mélanome sensibles et résistantes aux inhibiteurs de kinase traitées au CR-1-31b (inhibition traductionnelle directe en ciblant le facteur eIF4A) seul ou combiné à l'inhibiteur de kinase PLX4032 (inhibition traductionnelle indirecte en ciblant l'activité de mTORC1). Le knockdown via des siARN des ARNm codant des protéines essentielles au métabolisme glycolytique et à la respiration mitochondriale dont les transporteurs des métabolites et les enzymes impliquées dans l'alimentation du cycle TCA et de la chaîne respiratoire et la comparaison de son effet à celui observée lors des traitements testés serait une bonne approche pour prouver que l'inhibition traductionnelle de ces ARNm est bien la cause de

la réduction significative de la glycolyse et de la respiration mitochondriale constatée dans les cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b seul ou combiné au PLX4032. L'inhibition des protéines essentielles à l'alimentation de la respiration mitochondriale via des composés chimiques est également une bonne stratégie qui permet de soutenir d'avantage le lien de l'inhibition traductionnelle des protéines essentielles au métabolisme avec les effets observés lors du traitement au CR-1-31b. Ainsi, le blocage du transporteur du pyruvate dans la mitochondrie MPC (Mitochondrial Pyruvate carrier) par le UK5099 (120) et l'inhibition de la glutaminase 1 (GLS) par le BPTES (121) affirment ces conclusions. En effet, les contrôles des deux lignées cellulaires traitées aux DMSO ainsi que les cellules A375R traitées au PLX4032 ont répondues positivement à l'inhibition du MPC en réduisant leur taux de consommation d'oxygène lors de l'injection du UK5099, tandis que les cellules des deux lignées traitées au CR-1-31b n'ont présentées aucune variation lors de l'injection de cet inhibiteur du MPC, témoignant ainsi que le CR-1-31b affecte efficacement l'activité mitochondriale par l'inhibition traductionnelle des ARNm codant le MPC, l'une des protéines essentielles à l'alimentation du cycle de l'acide citrique (Figure supplémentaire 1). L'inhibition de la GLS au BPTES n'a toutefois pas montré de variation des taux de consommation d'oxygène dans toutes les conditions testées (Figure supplémentaire 2). Ceci suggère que si ces cellules sont dépendantes à la glutamine, ce n'est pas en rapport avec leur production d'ATP mais plutôt avec l'utilisation de cet acide aminé à titre de précurseur essentiel à la synthèse d'autres métabolites intermédiaires. Parallèlement, la quantification par GCMS des métabolites issus de la glycolyse, du cycle de l'acide citrique ainsi que du métabolisme des acides aminés des cellules A375 et A375R traitées au CR-1-31b et/ou au PLX4032, met en évidence l'effet significatif de ces drogues. Les métabolites de la glycolyse et du cycle TCA sont majoritairement réduits dans les cellules sensibles A375 traitées au PLX4032, et ne varient que très peu dans la lignée résistante avec ce même traitement. Pour ce qui est des acides aminés, ils sont également réduits lors de ce traitement, particulièrement dans les cellules sensibles à l'exception de l'alanine et de la proline. En effet, tenant compte du caractère très énergivore des voies métaboliques et de la synthèse protéique (122), en plus du fait que les perturbations métaboliques et l'adaptation de la traduction atténuent l'efficacité des inhibiteurs de kinases (118), les cellules résistantes échappent à la crise énergétique et ne répondent pas efficacement aux inhibiteurs de kinase.

Ainsi, la combinaison des inhibiteurs de eIF4A aux inhibiteurs de kinase, dans les cellules A375R, régule en partie, certaines voies métaboliques. Cette combinaison induit un ralentissement de la glycolyse et du cycle de l'acide citrique, marqué par une baisse des métabolites issus de ces deux voies de façon similaire dans les deux lignées cellulaires. Ceci est comparable à la réponse de ces lignées cellulaires au traitement combiné des inhibiteurs de kinases aux biguanides (118). Cela dit, une analyse plus approfondie du métabolome permettrait de mieux comprendre le mécanisme qui soutient cette réadaptation métabolique aux thérapies, notamment celle de la sérine et de l'asparagine qui sont remarquablement élevées lors de la combinaison des deux traitements comparativement au PLX4032 seul et sachant que l'asparagine est synthétisée à partir de l'aspartate qui est lui aussi en hausse lors du traitement combiné et qui est particulièrement requis pour la croissance néoplasique (123).

La réduction très marquée du α -cétoglutarate quantifié à la GCMS des deux lignées cellulaires A375 et A375R traitées au CR-1-31b a été exploré plus en détails. En fait, sachant que le α -cétoglutarate a comme principale source le glutamate issu du métabolisme de la glutamine (124), nous avons évalué l'impact de la déprivation à la glutamine sur les cellules A375 et A375R traitées ou non au CR-1-31b ou au PLX4032. L'analyse des courbes de croissance de ces deux lignées mises en culture dans des milieux à concentrations variables de glutamine montre une réduction de la prolifération cellulaire qui est de plus en plus significative aux basses concentrations de glutamine. Ceci témoigne de la haute dépendance à la glutamine de ces cellules tout comme les cellules leucémiques (125), les cellules du cancer du sein (126) et du cancer de la prostate (127) pour n'en citer que ceux-là. En effet, en plus de leur dépendance au glucose, les cellules cancéreuses sont souvent hautement dépendantes à la glutamine et ne peuvent proliférer in vitro en absence de cette acide aminé. Cette dépendance à la glutamine n'affecte pas le rendement de la production énergétique mitochondriale via le cycle de l'acide citrique puisque ces cellules ne présentent aucune variation de leur capacité respiratoire après l'inhibition de la GLS comme déjà discuté plus haut. Elle n'affecte non plus la survie cellulaire puisque le taux de la protéine anti-apoptotique BCL2 ne présente pas de variations significatives ni à faible dose ni en absence de glutamine. Cependant, une réduction marquée du taux de la protéine du cycle cellulaire CDK4 proportionnelle à la réduction de la glutamine témoigne d'une baisse de la division

et de la prolifération cellulaire. Ces résultats appuient ainsi l'importance de la glutamine non pas pour alimenter le cycle TCA ou pour survivre mais plutôt pour soutenir la croissance et la prolifération tumorale via la génération des sous-produits vitaux tels que les précurseurs des acides aminés et des acides nucléiques (105, 128). Contrairement aux expériences in vitro, cette dépendance ne serait probablement pas aussi appréciable in vivo. Le stress provoqué par la déprivation à la glutamine dans les cellules tumorales in vivo pourrait être compensé par la synthèse de novo dans les cellules tumorales elles-mêmes ou celles de leur environnement tumoral comme c'est le cas de certains modèles de cancer de l'ovaire ou du cancer de la prostate (129). La combinaison de la déprivation à la glutamine au CR-1-31b ou au PLX4032 in vitro, montre une réduction de la prolifération cellulaire qui est secondaire uniquement au déficit en glutamine pour les deux lignées cellulaires mises en culture dans des milieux à 0.25mM de glutamine. Au-dessous de ce seuil, la viabilité cellulaire est très faible et ne permet pas d'apprécier l'effet des drogues testées dans ces conditions.

Dans le but de disséquer les cibles potentielles du CR-1-31b et de décrypter les mécanismes moléculaires sous-jacents à son efficacité dans le mélanome sensible et résistant aux inhibiteurs de BRAF, plusieurs voies métaboliques ont été analysés par la quantification aux western blots des extraits protéiques des cellules A375 et A375R traitées, pour de courtes durées, au CR-1-31b. Cette analyse a permis de mettre en évidence la réduction, dans les deux lignées cellulaires, des niveaux de nombreuses cibles potentielles appartenant à différentes voies, notamment la GLS une protéine de la voie du métabolisme de la glutamine qui constitue une cible importante pour le processus de carcinogenèse (130) et dont l'inhibition pourrait faire objet d'une stratégie thérapeutique efficace pour la pathologie cancéreuse (130). La NDUFA8 et la NDUFB8 des sous unités cruciales de la chaîne respiratoire constituent d'autres cibles potentielles de CR-1-31b. Cette chaîne est le moteur de la mitochondrie, l'organelle cellulaire majeur en matière de production d'énergie nécessaire à la survie des cellules cancéreuses. L'importance de cette organelle est démontrée par de nombreuses études (131) puisqu'il a un rôle essentiel à la fois dans la survie (production d'énergie par la chaîne respiratoire) et dans la mort cellulaire (apoptose), et constitue ainsi une nouvelle cible thérapeutique, notamment dans l'adénocarcinome du pancréas, l'un des cancers associés à un très sombre pronostic (131).

L'ACADS et l'ACSF2, des enzymes de la β -oxydation des acides gras, sont aussi des cibles potentielles réduites par le CR-1-31b. En plus de leur dépendance en glucose et en glutamine, les cellules cancéreuses possèdent d'autres propriétés métaboliques telles que la synthèse des acides gras pour fournir les lipides nécessaires à la biogenèse membranaire cruciale lors d'une prolifération rapide (132). Ainsi, la réduction de ces enzymes induit une inhibition de cette voie entraînant un ralentissement de la prolifération cellulaire et donne une autre fenêtre sur les mécanismes moléculaires du CR-1-31b qui doit être exploré plus en détails.

En plus de ces cibles, il y a la GDH et la PDH qui transforment la glutamate et la pyruvate en α -cétoglutarate et en acétyl-CoA afin d'alimenter le cycle de l'acide citrique ainsi que la SLC25A1, le transporteur transmembranaire de citrate et de malate qui sont également réduites par le CR-1-31b. Ceci témoigne de la diversité des mécanismes moléculaires de cette drogue qui affecte plusieurs voies métaboliques dont l'exploration plus approfondie est en cours. La réduction des niveaux protéiques de certaines de ces cibles potentielles fait l'objet d'une compensation transcriptionnelle marquée par une augmentation des niveaux d'ARNm quantifiés par RT-q-PCR. Toutefois, le séquençage prochain des fractions d'ARNm nous permettra d'identifier plus précisément ces protéines et un Knockout des gènes codant pour ces protéines nous confirmera leur implication dans l'adaptation aux inhibiteurs de kinases et nous orientera vers les mécanismes moléculaires afin de valider nos données.

Dans de nombreuses études antérieures, l'inhibiteur de eIF4A CR-1-31b a démontré une réduction significative de la croissance tumorale et une resensibilisation thérapeutique de plusieurs modèles de xénogreffes, notamment des cellules leucémiques myéloïdes(110), des cellules cancéreuses de la vésicule biliaire (115) et des cellules B du lymphome malin (133). Dans notre étude, cet inhibiteur de eIF4A a démontré une large activité antitumorale sur les paires de lignées cellulaires de mélanome et de cancer du sein sensibles et résistantes aux inhibiteurs de kinase, provoquant à la fois une inhibition de la prolifération et une induction de l'apoptose des cellules tumorales in vitro. Des essais in vivo seraient pertinent à réaliser par l'étude de xénogreffes sous-cutanées de souris implantées avec un nombre déterminé de cellules de mélanome sensibles et résistantes à l'inhibiteur de BRAF PLX4032. Lorsque la taille des tumeurs atteindra la grandeur requise pour l'essai in vivo, les souris seront randomisées et réparties en

groupes de traitements qui recevront le CR-1-31b et / ou le PLX4032 et en groupe de contrôle. La taille de la tumeur ainsi que le poids de chaque souris seront mesurés après différentes périodes de traitement et les valeurs obtenues seront analysées et rapportées sur des courbes. Des effets similaires à ce que ces drogues ont démontré in vitro seraient attendus aux essais in vivo et la persistance de la résistance thérapeutique reste très peu probable.

Finalement, l'évaluation de l'innocuité et de l'efficacité de cet inhibiteur de eIF4A par des essais cliniques devrait faire suite à la validation de son efficacité in vivo. En fait, l'inhibition sélective de la traduction des ARNm codant les oncoprotéines par le ciblage spécifique de l'un des facteurs de la machinerie traductionnelle constitue une bonne stratégie thérapeutique. C'est le cas d'une étude clinique du rocaglate Zotatifine qui est actuellement à la phase 1/2 d'une étude clinique chez les patients atteints d'un cancer du sein avancé ou d'un cancer du poumon non à petites cellules réfractaire ou en rechute. Cette étude est développée par Effector suivant le protocole numéro 21-323 du Centre de cancérologie Memorial Sloan Kettering. Les patientes atteintes du cancer du sein reçoivent de la zotatifine en combinaison avec l'une des thérapies standards contre le cancer du sein (trastuzumab ou du fulvestrant) tandis que les patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules ne reçoivent que de la zotatifine seule. Toutes les drogues sont administrées par voie intraveineuse. Cette stratégie thérapeutique combinée aux thérapies ciblées utilisées actuellement en cliniques donnerait une nouvelle ouverture à la médecine moléculaire et permettraient aux patients atteints de cancer résistants aux inhibiteurs de kinases d'avoir une nouvelle option thérapeutique.

Chapitre 5 : Conclusion et perspectives

En conclusion, cette étude a mis en évidence l'efficacité des inhibiteurs de eIF4A pour surmonter la résistance aux inhibiteurs de BRAF dans le mélanome. En effet, les quatre inhibiteurs de eIF4A testés ont un effet antiprolifératif et induisent l'apoptose de certains types de mélanome et de cancer du sein, sensibles et résistants aux inhibiteurs de BRAF, de façon similaire. Cet effet est validé *in vitro* avec des IC_{50} de l'ordre du nano molaire. L'inhibiteur de eIF4A CR-1-31b limite considérablement la traduction active, la synthèse protéique et la production d'énergie (glycolyse, cycle de l'acide citrique et phosphorylation oxydative). Cette drogue réduit plusieurs cibles moléculaires potentielles appartenant à différentes voies métaboliques (le métabolisme des acides aminés, la phosphorylation oxydative et la bêta oxydation des acides gras) et constitue une bonne stratégie thérapeutique qui semble être efficace dans le traitement du mélanome et de certains sous-types du cancer du sein, du moins *in vitro*. Néanmoins, le séquençage des fractions d'ARNm ciblés par cette drogue serait nécessaire pour mieux comprendre et mettre en évidence les mécanismes moléculaires derrière cet effet. Nous prévoyons donc analyser prochainement les résultats du séquençage des polysomes lourds qui seront également validés par RT-q-PCR et comparés au métabolome via des programmes bio-informatiques afin de décrypter de manière plus robuste les altérations métaboliques et les mécanismes sous-jacents à l'efficacité de ce traitement. De plus, des études *in vivo* seraient pertinentes et nécessaires pour fournir plus de crédibilité clinique. Finalement, des essais cliniques futurs seraient probablement très prometteurs pour les patients récidivant aux thérapies ciblées à base d'inhibiteurs de kinases.

Références bibliographiques

1. J. W. Hershey, N. Sonenberg, M. B. Mathews, Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).
2. A. Danchin, *L'œuf et la poule : histoires du code génétique*. Le Temps des sciences (Fayard, Paris, 1983), pp. 282 p.
3. X. Fu, Z. Chang, Biogenesis, quality control, and structural dynamics of proteins as explored in living cells via site-directed photocrosslinking. *Protein Sci* **28**, 1194-1209 (2019).
4. N. Sonenberg, A. G. Hinnebusch, Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**, 731-745 (2009).
5. K. A. Spriggs, M. Bushell, A. E. Willis, Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell* **40**, 228-237 (2010).
6. L. Hulea *et al.*, Translational and HIF-1 α -Dependent Metabolic Reprogramming Underpin Metabolic Plasticity and Responses to Kinase Inhibitors and Biguanides. *Cell Metab* **28**, 817-832.e818 (2018).
7. H. Malka-Mahieu, M. Newman, L. Désaubry, C. Robert, S. Vagner, Molecular Pathways: The eIF4F Translation Initiation Complex—New Opportunities for Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research* **23**, 21-25 (2017).
8. M. Bhat *et al.*, Targeting the translation machinery in cancer. *Nature reviews Drug discovery* **14**, 261-278 (2015).
9. A. C. Gingras, B. Raught, N. Sonenberg, eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68**, 913-963 (1999).
10. W. P. Tate *et al.*, Translational termination efficiency in both bacteria and mammals is regulated by the base following the stop codon. *Biochemistry and Cell Biology* **73**, 1095-1103 (1995).
11. F. Buttgereit, M. D. Brand, A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J* **312 (Pt 1)**, 163-167 (1995).
12. N. Oulhen, P. Cormier, eIF4E et étapes décisionnelles du développement embryonnaire. *Med Sci (Paris)* **22**, 507-513 (2006).
13. A. Marintchev, Roles of helicases in translation initiation: a mechanistic view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **1829**, 799-809 (2013).
14. V. Gandin *et al.*, nanoCAGE reveals 5' UTR features that define specific modes of translation of functionally related MTOR-sensitive mRNAs. *Genome Res* **26**, 636-648 (2016).
15. M. Kozak, An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research* **15**, 8125-8148 (1987).
16. A. De Benedetti, J. R. Graff, eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* **23**, 3189-3199 (2004).
17. D. Silvera, S. C. Formenti, R. J. Schneider, Translational control in cancer. *Nature Reviews Cancer* **10**, 254-266 (2010).
18. A. E. Koromilas, A. Lazaris-Karatzas, N. Sonenberg, mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *The EMBO journal* **11**, 4153-4158 (1992).

19. Z. Zou, T. Tao, H. Li, X. Zhu, mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell & Bioscience* **10**, 31 (2020).
20. S. Mirabilli *et al.*, Biological aspects of mTOR in leukemia. *International journal of molecular sciences* **19**, 2396 (2018).
21. A. C. Hsieh *et al.*, The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* **485**, 55-61 (2012).
22. C. C. Thoreen *et al.*, A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **485**, 109-113 (2012).
23. B. Lant, K. B. Storey, An overview of stress response and hypometabolic strategies in *Caenorhabditis elegans*: conserved and contrasting signals with the mammalian system. *International journal of biological sciences* **6**, 9 (2010).
24. O. Uchenunu, M. Pollak, I. Topisirovic, L. Hulea, Oncogenic kinases and perturbations in protein synthesis machinery and energetics in neoplasia. *J Mol Endocrinol* **62**, R83-r103 (2019).
25. A. Szwed, E. Kim, E. Jacinto, Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. *Physiol Rev* **101**, 1371-1426 (2021).
26. W. J. Oh, E. Jacinto, mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell cycle* **10**, 2305-2316 (2011).
27. H. Pópulo, J. M. Lopes, P. Soares, The mTOR signalling pathway in human cancer. *International journal of molecular sciences* **13**, 1886-1918 (2012).
28. J. Yuan, X. Dong, J. Yap, J. Hu, The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy. *Journal of hematology & oncology* **13**, 1-19 (2020).
29. S. E. Egan *et al.*, Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* **363**, 45-51 (1993).
30. R. R. Bhatt, J. E. Ferrell, Jr., The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytosolic factor activity. *Science* **286**, 1362-1365 (1999).
31. J. Steinberger, J. Chu, R. I. Maïga, K. Sleiman, J. Pelletier, Developing anti-neoplastic biotherapeutics against eIF4F. *Cellular and Molecular Life Sciences* **74**, 1681-1692 (2017).
32. P. Ferré, Métabolisme : la renaissance ! *Med Sci (Paris)* **38**, 123-124 (2022).
33. R. Hallez, Métabolisme et cycle cellulaire, deux processus interconnectés chez les bactéries. *Med Sci (Paris)* **32**, 843-848 (2016).
34. R. Chaudhry, M. Varacallo, Biochemistry, glycolysis. (2018).
35. D. Alramadhani, A. S. Aljahdali, O. Abdulmalik, B. D. Pierce, M. K. Safo, Metabolic Reprogramming in Sickle Cell Diseases: Pathophysiology and Drug Discovery Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 7448 (2022).
36. P. A. Mayes, 18 Cycle de l'acide citrique. *Biochimie de Harper*, 182 (2002).
37. D. Bender, Nitrogen metabolism. *Amino acid metabolism*. Wiley, New York, 1-65 (2012).
38. C. Lei *et al.*, Role of the mitochondrial citrate-malate shuttle in Hras12V-induced hepatocarcinogenesis: a metabolomics-based analysis. *Metabolites* **10**, 193 (2020).
39. L. Sainero-Alcolado, J. Liaño-Pons, M. V. Ruiz-Pérez, M. Arsenian-Henriksson, Targeting mitochondrial metabolism for precision medicine in cancer. *Cell Death & Differentiation* **29**, 1304-1317 (2022).
40. O. A. Deshpande, S. S. Mohiuddin, in *StatPearls [Internet]*. (StatPearls Publishing, 2022).

41. S. Nath, Integration of demand and supply sides in the ATP energy economics of cells. *Biophys Chem* **252**, 106208 (2019).
42. A. D. Vinogradov, New Perspective on the Reversibility of ATP Synthesis and Hydrolysis by F(o)×F(1)-ATP Synthase (Hydrolase). *Biochemistry (Mosc)* **84**, 1247-1255 (2019).
43. F. Tort *et al.*, Biallelic mutations in NDUFA8 cause complex I deficiency in two siblings with favorable clinical evolution. *Mol Genet Metab* **131**, 349-357 (2020).
44. T. Emahazion, A. J. Brookes, Mapping of the NDUFA2, NDUFA6, NDUFA7, NDUF8, and NDUF8 electron transport chain genes by intron based radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* **82**, 114 (1998).
45. M. C. Walker, W. A. van der Donk, The many roles of glutamate in metabolism. *J Ind Microbiol Biotechnol* **43**, 419-430 (2016).
46. W. P. Katt, M. J. Lukey, R. A. Cerione, A tale of two glutaminases: homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis. *Future Med Chem* **9**, 223-243 (2017).
47. P. Robinson, K. Neelon, H. J. Schreier, M. F. Roberts, beta-Glutamate as a substrate for glutamine synthetase. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4458-4463 (2001).
48. A. Csibi *et al.*, The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell* **153**, 840-854 (2013).
49. G. Öz, D. A. Okar, P.-G. Henry, Glutamate-glutamine cycle and anaplerosis. *Neural metabolism in vivo*, 921-946 (2012).
50. M. M. Adeva-Andany, N. Carneiro-Freire, M. Seco-Filgueira, C. Fernández-Fernández, D. Mouriño-Bayolo, Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion* **46**, 73-90 (2019).
51. J. Bastin, F. Djouadi, Anomalies de la β -oxydation mitochondriale des acides gras. *Med Sci (Paris)* **35**, 779-786 (2019).
52. C. M. Roche, H. W. Blanch, D. S. Clark, N. L. Glass, Physiological role of acyl coenzyme A synthetase homologs in lipid metabolism in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **12**, 1244-1257 (2013).
53. D. Maignel, M. Morita, Z. Pei, Z. Jia, P. A. Watkins, ACSF2: A MEDIUM-CHAIN ACYL-CoA SYNTHETASE WITH A POTENTIAL ROLE IN NEURONAL DIFFERENTIATION. *bioRxiv*, 2022.2003.2028.486105 (2022).
54. J. L. Harwood, Fatty acid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 101-138 (1988).
55. J. J. P. Kim, R. Miura, Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases: Structural basis for mechanistic similarities and differences. *European Journal of Biochemistry* **271**, 483-493 (2004).
56. Q. Wu *et al.*, Integrated Analysis of Expression and Prognostic Values of Acyl-CoA Dehydrogenase short-chain in Colorectal Cancer. *Int J Med Sci* **18**, 3631-3643 (2021).
57. A. Ravindranath, M. S. Sarma, Mitochondrial hepatopathy: Anticipated difficulties in management of fatty acid oxidation defects and urea cycle defects. *World J Hepatol* **14**, 180-194 (2022).
58. K. Inoki, T. Zhu, K.-L. Guan, TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577-590 (2003).
59. D. M. Gwinn *et al.*, AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* **30**, 214-226 (2008).

60. R. Zoncu *et al.*, mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H⁺-ATPase. *Science* **334**, 678-683 (2011).
61. C. C. Dibble *et al.*, TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Molecular cell* **47**, 535-546 (2012).
62. K. Düvel *et al.*, Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular cell* **39**, 171-183 (2010).
63. I. Ben-Sahra, J. J. Howell, J. M. Asara, B. D. Manning, Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science* **339**, 1323-1328 (2013).
64. J. D. Gordan, C. B. Thompson, M. C. Simon, HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer cell* **12**, 108-113 (2007).
65. G. L. Semenza, HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of applied physiology*, (2000).
66. H. Shim *et al.*, c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 6658-6663 (1997).
67. R. C. Osthus *et al.*, Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 21797-21800 (2000).
68. L. J. Reitzer, W. BM, Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. (1979).
69. D. R. Wise *et al.*, Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 18782-18787 (2008).
70. J. L. Yecies, B. D. Manning, mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. *Journal of molecular medicine* **89**, 221-228 (2011).
71. I. Topisirovic, N. Sonenberg, Translational control by the eukaryotic ribosome. *Cell* **145**, 333-334 (2011).
72. P. S. Ward, C. B. Thompson, Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer cell* **21**, 297-308 (2012).
73. D. Ruggero, Translational control in cancer etiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, a012336 (2013).
74. M. Pollak, Targeting oxidative phosphorylation: why, when, and how. *Cancer cell* **23**, 263-264 (2013).
75. M. Morita *et al.*, mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell metabolism* **18**, 698-711 (2013).
76. P. P. Roux, I. Topisirovic, Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, a012252 (2012).
77. M. Morita *et al.*, mTOR controls mitochondrial dynamics and cell survival via MTFP1. *Molecular cell* **67**, 922-935. e925 (2017).
78. C. Castanier, D. Arnoult, La dynamique mitochondriale au cours de l'apoptose. *Med Sci (Paris)* **26**, 830-835 (2010).
79. R. Haq *et al.*, Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer cell* **23**, 302-315 (2013).
80. I. A. Cree, P. Charlton, Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer* **17**, 10 (2017).

81. M. Winder, A. Virós, Mechanisms of Drug Resistance in Melanoma. *Handb Exp Pharmacol* **249**, 91-108 (2018).
82. C. M. Lovly, A. T. Shaw, Molecular pathways: resistance to kinase inhibitors and implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res* **20**, 2249-2256 (2014).
83. J. Charles *et al.*, in *Annales de Dermatologie et de Venereologie*. (2014), vol. 141, pp. 671-681.
84. S. A. Luebker, S. A. Koepsell, Diverse Mechanisms of BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma Identified in Clinical and Preclinical Studies. *Frontiers in Oncology* **9**, (2019).
85. S. Mourah, C. Lebbé, Molecular alterations in melanoma and targeted therapies. *Bulletin du Cancer* **101**, S5-S11 (2014).
86. R. Akbani *et al.*, Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* **161**, 1681-1696 (2015).
87. M. Khaliq, M. Fallahi-Sichani, Epigenetic mechanisms of escape from BRAF oncogene dependency. *Cancers* **11**, 1480 (2019).
88. Y. Feng *et al.*, SBI-0640756 Attenuates the Growth of Clinically Unresponsive Melanomas by Disrupting the eIF4F Translation Initiation Complex. *Cancer Res* **75**, 5211-5218 (2015).
89. Y. Feng *et al.*, SBI-0640756 Attenuates the Growth of Clinically Unresponsive Melanomas by Disrupting the eIF4F Translation Initiation Complex/eIF4G1 Targeting in BRAF-Resistant and BRAF WT Melanoma. *Cancer research* **75**, 5211-5218 (2015).
90. J. Chu *et al.*, Amidino-rocaglates: a potent class of eIF4A inhibitors. *Cell chemical biology* **26**, 1586-1593. e1583 (2019).
91. L. Shen, J. Pelletier, Selective targeting of the DEAD-box RNA helicase eukaryotic initiation factor (eIF) 4A by natural products. *Natural product reports* **37**, 609-616 (2020).
92. U. V. Saradhi *et al.*, Characterization of silvestrol pharmacokinetics in mice using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *The AAPS journal* **13**, 347-356 (2011).
93. K. P. Callahan *et al.*, Flavaglines target primitive leukemia cells and enhance anti-leukemia drug activity. *Leukemia* **28**, 1960-1968 (2014).
94. S. V. Gupta *et al.*, Resistance to the translation initiation inhibitor silvestrol is mediated by ABCB1/P-glycoprotein overexpression in acute lymphoblastic leukemia cells. *The AAPS journal* **13**, 357-364 (2011).
95. J. Chu *et al.*, Rocaglates induce gain-of-function alterations to eIF4A and eIF4F. *Cell reports* **30**, 2481-2488. e2485 (2020).
96. N. J. Moerke *et al.*, Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. *Cell* **128**, 257-267 (2007).
97. L. A. Raedler, Braftovi (Encorafenib) plus Mektovi (Binimetinib) Third BRAF/MEK Inhibition Combination Approved for Metastatic Melanoma with BRAF Mutation.
98. A. E. Koromilas, A. Lazaris-Karatzas, N. Sonenberg, mRNAs containing extensive secondary structure in their 5' non-coding region translate efficiently in cells overexpressing initiation factor eIF-4E. *Embo j* **11**, 4153-4158 (1992).
99. J. R. Graff, B. W. Konicek, J. H. Carter, E. G. Marcusson, Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Res* **68**, 631-634 (2008).
100. P. P. Roux, I. Topisirovic, Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).

101. J. Pelletier, J. Graff, D. Ruggero, N. Sonenberg, Targeting the eIF4F translation initiation complex: a critical nexus for cancer development. *Cancer Res* **75**, 250-263 (2015).
102. M. Bhat *et al.*, Targeting the translation machinery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 261-278 (2015).
103. M. Morita *et al.*, mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab* **18**, 698-711 (2013).
104. M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson, Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **324**, 1029-1033 (2009).
105. D. R. Wise, C. B. Thompson, Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in biochemical sciences* **35**, 427-433 (2010).
106. J. Charles *et al.*, [Mechanisms of resistance to anti-BRAF treatments]. *Ann Dermatol Venereol* **141**, 671-681 (2014).
107. L. Boussemart *et al.*, eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature* **513**, 105-109 (2014).
108. N. Ilic, T. Utermark, H. R. Widlund, T. M. Roberts, PI3K-targeted therapy can be evaded by gene amplification along the MYC-eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E699-708 (2011).
109. Q. Xu, J. E. Thompson, M. Carroll, mTOR regulates cell survival after etoposide treatment in primary AML cells. *Blood* **106**, 4261-4268 (2005).
110. K. Fooks *et al.*, EIF4A inhibition targets bioenergetic homeostasis in AML MOLM-14 cells in vitro and in vivo and synergizes with cytarabine and venetoclax. *J Exp Clin Cancer Res* **41**, 340 (2022).
111. H. Alachkar *et al.*, Silvestrol exhibits significant in vivo and in vitro antileukemic activities and inhibits FLT3 and miR-155 expressions in acute myeloid leukemia. *Journal of hematology & oncology* **6**, 21-21 (2013).
112. J. Ursini-Siegel *et al.*, ShcA signalling is essential for tumour progression in mouse models of human breast cancer. *Embo j* **27**, 910-920 (2008).
113. R. Cencic *et al.*, Antitumor activity and mechanism of action of the cyclopenta [b] benzofuran, silvestrol. *PloS one* **4**, e5223 (2009).
114. S. Wilmore *et al.*, Targeted inhibition of eIF4A suppresses B-cell receptor-induced translation and expression of MYC and MCL1 in chronic lymphocytic leukemia cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* **78**, 6337-6349 (2021).
115. Y. Cao, Y. He, L. Yang, Z. Luan, Targeting eIF4A using rocaglate CR-1-31B sensitizes gallbladder cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis through the translational downregulation of c-FLIP. *Oncol Rep* **45**, 230-238 (2021).
116. J. Bergeman, M. Huot, Quantitative Immunofluorescence to Measure Global Localized Translation. *J Vis Exp*, (2017).
117. A. B. Au - Alber, D. M. Au - Suter, Single-Cell Quantification of Protein Degradation Rates by Time-Lapse Fluorescence Microscopy in Adherent Cell Culture. *JoVE*, e56604 (2018).
118. L. Hulea *et al.*, Translational and HIF-1 α -Dependent Metabolic Reprogramming Underpin Metabolic Plasticity and Responses to Kinase Inhibitors and Biguanides. *Cell Metab* **28**, 817-832 e818 (2018).
119. K. Chan *et al.*, eIF4A supports an oncogenic translation program in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature communications* **10**, 5151 (2019).

120. Y. Zhong *et al.*, Application of mitochondrial pyruvate carrier blocker UK5099 creates metabolic reprogram and greater stem-like properties in LnCap prostate cancer cells in vitro. *Oncotarget* **6**, 37758-37769 (2015).
121. A. Le *et al.*, Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab* **15**, 110-121 (2012).
122. F. Buttgerit, M. D. Brand, A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J* **312 (Pt 1)**, 163-167 (1995).
123. M. G. Vander Heiden, R. J. DeBerardinis, Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell* **168**, 657-669 (2017).
124. M. Nikulin, V. Drobot, V. Švedas, B. F. Krasnikov, Preparative biocatalytic synthesis of α -ketoglutarate. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 12748 (2021).
125. P. G. Petronini, S. Urbani, R. Alfieri, A. F. Borghetti, G. G. Guidotti, Cell susceptibility to apoptosis by glutamine deprivation and rescue: Survival and apoptotic death in cultured lymphoma-leukemia cell lines. *Journal of cellular physiology* **169**, 175-185 (1996).
126. M. V. Gwangwa, A. M. Joubert, M. H. Visagie, Effects of glutamine deprivation on oxidative stress and cell survival in breast cell lines. *Biological Research* **52**, 15 (2019).
127. Y. Li *et al.*, PDHA1 gene knockout in prostate cancer cells results in metabolic reprogramming towards greater glutamine dependence. *Oncotarget* **7**, 53837 (2016).
128. J. W. Erickson, R. A. Cerione, Glutaminase: a hot spot for regulation of cancer cell metabolism? *Oncotarget* **1**, 734 (2010).
129. J. Jiang, S. Srivastava, J. Zhang, Starve Cancer Cells of Glutamine: Break the Spell or Make a Hungry Monster? *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
130. W. Yu *et al.*, Targeting GLS1 to cancer therapy through glutamine metabolism. *Clinical and Translational Oncology* **23**, 2253-2268 (2021).
131. R. Masoud *et al.*, Targeting mitochondrial complex I overcomes chemoresistance in high OXPHOS pancreatic cancer. *Cell Reports Medicine* **1**, 100143 (2020).
132. P. R. Pandey, W. Liu, F. Xing, K. Fukuda, K. Watabe, Anti-cancer drugs targeting fatty acid synthase (FAS). *Recent patents on anti-cancer drug discovery* **7**, 185-197 (2012).
133. V. R. Sanghvi *et al.*, NRF2 Activation Confers Resistance to eIF4A Inhibitors in Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* **13**, (2021).

Annexes

Tableau 1. Liste des amorces utilisées pour la q-PCR

Gene ID	Primer name	Séquence (5'-3')
NM_001101.5	hB-ACTIN F	ACCACACCTTCTACAATGAGC
NM_001101.5	hB-A+CTIN R	GATAGCACAGCCTGGATAGC
NM_005984.5	hSLC25A1-681F	CAACTGGTACCGAGGGGACA
NM_005984.5	hSLC25A1-840R	CGTGTTCCGGTATTTGTGCG
NM_000017.4	hACADS-593F	TTCTGAATGGAACCAAAGCCTG
NM_000017.4	hACADS-698R	AAGGCACTGATGCCCTTGTTTT
NM_005004.4	hNDUFB8-240F	GACTACCCGAAGCTCCCTGA
NM_005004.4	hNDUFB8-347R	TAGGTGCCAGTGCATCGGTT
NM_030593.3	hSIR T2-147F	GGTGGAGAAGCAGACATGGA
NM_030593.3	hSIR T2-293R	ACAGATGACTCTGCGACAGC
NM_025149.6	hACSF2-1246F	TGAAGGACCTGGTGGTTGCT
NM_025149.6	hACSF2-1489R	GCTTCCTCTGTCTTCTGAGGC
NM_014222.3	hNDUFA8-469F	GGAGAACTGTCAAAGGTCACC
NM_014222.3	hNDUFA8-577R	GCAGATCTCCCTCGATCTCA
NM_014905.5	hGLS1-757F	TCTACAGGATTGCGAACGTCT
NM_014905.5	hGLS1-856R	CTTTGTCTAGCATGACACCATCT

Tableau 2. Liste des anticorps utilisés en Western blot

Nom de l'anticorps	Cat #	Compagnie	Dilution
β-ACTIN	A5441-100UL	Sigma	1/5000
BCL2	4223S	NEB	1/1000
CDK4	ab137675	Abcam	1/1000
CYCLIN D3	2936S	NEB	1/1000
MCL1	5453S	NEB	1/1000
4EBP1	9644S	NEB	1/1000
p-4EBP1 en Ser 65	9451S	NEB	1/1000
ERK	9102S	NEB	1/1000
p-ERK en Thr 202/204	9101S	NEB	1/1000
RPS6	sc-74459	Santacruz	1/1000
p-RPS6 en Ser 240/244	2215S	NEB	1/1000
GLS1	56750S	NEB	1/1000
NDUFA8	ab184952	Abcam	1/2000
NDUFB8	ab110242	Abcam	1/1000
ACADS	ab154823	Abcam	1/1000
ACSF2	NBP2-47558-25UL	Novus Biologicals Canada/Cedarlane	1/2000
SLC25A1	15235-1-AP	Proteintech/Cedarlane	1/2000
PDH	2784	NEB	1/500
GDH 1/2	12793	NEB	1/500
Sirt2 1/2	12650S	NEB	1/500

Figure Supplémentaire 1 : Le blocage du MPC via le UK5099 affecte la capacité respiration mitochondriale maximale spécifiquement dans les cellules A375 sensibles. Les fonctions de la respiration mitochondriale (Consommation d'oxygène non mitochondriale, respiration basale, capacité respiratoire maximale et la production d'ATP) des cellules A375 (en haut) et A375R (en bas) ont été évaluées pour chaque condition de traitement (DMSO, PLX4032, CR-1-31b et PLX4032+CR-1-31b) par l'estimation au Seahorse des taux de consommation d'oxygène (OCR) en présence et en absence de l'inhibiteur de MPC UK5099 (10 μ M) injecté ou non en amont de l'Oligomycine (1 μ M), FCCP (1 μ M) et Roténone + Antimycine A (0.5 μ M). Les données sont rapportées sur les courbes par les moyennes \pm l'écart type de trois expériences indépendantes réalisées en trois répliquas techniques chacune. Ces valeurs ont été analysées par ANOVA à une voie et Tukey-test (ns (variation non significative); * p <0.1; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001).

Figure Supplémentaire 1 : Le blocage de la glutaminase (GLS) via le BPTES n'affecte aucune fonction de la respiration mitochondriale ni dans les cellules A375 ni les A375R. Les fonctions de la respiration mitochondriale (Consommation d'oxygène non mitochondriale, respiration basale, capacité respiratoire maximale et la production d'ATP) des cellules A375 (en haut) et A375R (en bas) ont été évaluées pour chaque condition de traitement (DMSO, PLX4032, CR-1-31b et PLX4032+CR-1-31b) par l'estimation au Seahorse des taux de consommation d'oxygène (OCR) en présence et en absence de l'inhibiteur de GLS BPTES (10 μ M) injecté ou non en amont de l'Oligomycine (1 μ M), FCCP (1 μ M) et Roténone + Antimycine A (0.5 μ M). Les données sont rapportées sur les courbes par les moyennes \pm l'écart type de trois expériences indépendantes réalisées en trois répliquas techniques chacune. Ces valeurs ont été analysées par ANOVA à une voie et Tukey-test (ns (variation non significative); * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).