

Métabolisme et létalité synthétique : Compréhension grâce au silence

Le sarcome d'Ewing, décrit pour la première fois en 1921 par James Ewing, est la deuxième plus fréquente tumeur osseuse pédiatrique avec une incidence moyenne autour d'un pic à 15 ans^{1,2}. Le sarcome d'Ewing se localise principalement dans les os, en particulier dans le bassin, les régions diaphysaires des os longs et les os de la paroi thoracique, mais une petite partie de tumeurs primaires peuvent se poser dans les tissus mous. Ce sarcome est traité de manière agressive par une combinaison de chirurgie et de chimiothérapie. Le taux de survie globale de ces patients est autour de 70 à 75%, quant au taux de survie pour les cas métastatiques il reste faible (35%)³⁻⁷.

Le sarcome d'Ewing est associé à une translocation chromosomique conduisant à une protéine de fusion entre la protéine de liaison EWS lié à l'ARN et un facteur de transcription ETS. Dans environ 85% des cas, la translocation comprend les gènes EWSR1 et FLI1, conduisant à l'expression d'une protéine EWS-FLI1 chimérique⁸. D'autres translocations conduisant à l'expression de protéines de fusion tels que EWS-ERG, EWS-ETV1, EWS-EIAF et EWS-FEV sont observées dans les cas restant⁹⁻¹¹. EWS-FLI1 est un oncogène transformant avec des propriétés tumorigènes qui ont été observés dans des lignées de cellules NIH 3T3 exprimant EWS-FLI1 et également par knockdown dans les lignées d'Ewing¹²⁻¹⁴. La protéine chimérique agit comme un facteur de transcription aberrant, faisant penser qu'elle pourrait induire une transformation au moins grâce à la régulation de sa croissance cellulaire et à sa différenciation. Cet oncogène est prévu pour réguler de façon aberrante des centaines de gènes, qui peuvent finalement contribuer à la croissance tumorale et / ou métastatique.

La première partie de ma thèse se focalise sur le métabolisme des cellules de ce cancer et plus particulièrement sur le rôle métabolique de EWS-FLI1. Pour démarrer ce projet, il est connu depuis longtemps qu'il existe un lien entre le cancer et des modifications du métabolisme. La prolifération incontrôlée des cellules de cancer est connectée au métabolisme énergétique. L'exemple des altérations métaboliques le plus connu est nommé l'effet Warburg¹⁵. Les cellules normales produisent l'adénosine triphosphate (ATP), qui est leur principale source d'énergie, en utilisant deux voies métaboliques : la glycolyse et de l'oxydation-phosphorylation. Le glucose est converti en pyruvate par la glycolyse, générant deux molécules d'ATP. Si l'oxygène est faible, le pyruvate est converti en lactate. Cependant, si l'oxygène est en quantité suffisante, la phosphorylation oxydative se produit dans la mitochondrie, un procédé beaucoup plus

efficace qui utilise le pyruvate, le convertissant en acétyl-CoA, qui entre dans le cycle de Krebs mitochondrial, générant 36 molécules d'ATP. Cependant les cellules cancéreuses n'utilisent pas la phosphorylation oxydative, même lorsque l'oxygène est suffisamment disponible, décrit par Warburg.

Afin d'évaluer les changements dans le métabolisme global qui met en silence la fusion du gène EWS-FLI1 dans la lignée Ic de cellules d'Ewing. 1c est une ligne cellulaire qui contient des anti Ewing EWS-FLI1 ARN en petites épingles à cheveux qui sont régulées par la tétracycline, ce qui permet une régulation de l'expression d'EWS-FLI1 en présence ou en absence de tétracycline¹⁶.

Dans cette étude, EWS-FLI1 a été inhibé en utilisant la doxycycline (DOX) dans une expérience de séries chronologiques (0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h et 168h), pour identifier des différences métaboliques. Les échantillons ont été traités dans l'ordre inverse, de telle sorte que tous les échantillons ont été prélevés le jour même. Pour chaque point, 5 échantillons ont été recueillis contenant chacun 20 millions de cellules, qui ont été analysés par des plates-formes LC / MS / MS et GC / MS.

L'analyse de ces séries de la lignée Ic avec différents temps d'inhibition EWS-FLI1 a révélé qu'il y avait un total de 253 composés biochimiques connus. Après normalisation, le niveau de chaque composé a été comparé au niveau du point de départ. Pour valider les résultats de cette découverte métabolique, nous avons lancé une deuxième série d'expériences dans lesquelles on a utilisé la ligne A673 (parentale de 1c), dans laquelle nous avons inhibé EWS-FLI1 par siARN. De plus, on a pris une deuxième ligne cellulaire, SKNMC, dans laquelle nous avons aussi inhibé EWS-FLI1 par siARN. Ces deux lignes cellulaires supplémentaires ont été également analysées par LC/ MS/ MS et GC/ MS. Pour ces expériences, 418 composés biochimiques ont été identifiés. Plusieurs métabolites ont révélés être altéré par EWS-FLI1.

Pour déterminer la spécificité de l'inhibition EWS-FLI1, le chevauchement des métabolites qui ont été jusqu'à régulés dans les trois lignées cellulaires a été calculé et jugé significatives. Ensuite, les métabolites ont été comparés aux voies métaboliques. Plusieurs aspects des résultats se sont révélés très intéressants. Ces changements dans le métabolisme de l'énergie se sont porté sur : la voie du glucose et de la n-glycosylation ; la biosynthèse ; les changements du métabolisme des lipides ; des

changements dans les statuts redox, donc spécifiquement des changements dans la voie de kynurénine mais aussi des changements dans la voie glutathionne.

La kynurénine est un métabolite de l'acide aminé essentiel L-tryptophane est un des métabolites le plus exprimé tout au long de nos études. Le tryptophane est métabolisé par trois voies, soit la sérotonine, l'indole, et principalement les voies de kynurénine. 99% du tryptophane est métabolisé par la voie de kynurénine, influençant fortement la voie de la glycolyse, le métabolisme du nicotinamide, et le récepteur du glutamate. Le tryptophane est métabolisé en kynurénine par quatre enzymes, indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO1, IDO2) et dioxygénase tryptophane (de TDO2). Plusieurs cancers ont rapporté avoir une expression élevée de IDO et l'expression de TDO2, ainsi qu'une augmentation de kynurénine cours de la progression du cancer¹⁷⁻²⁰.

IDO1, IDO2, TDO2 et KYNU ont montré des niveaux d'expression très faible dans les tumeurs d'Ewing " alors qu'ils sont exprimés dans d'autres tumeurs. Les changements métaboliques dans la voie de kynurénine quand a l'inhibition EWS-FLI1 vont ensemble avec des changements dans l'expression de IDO2 et TDO2, montrant une régulation sur l'inhibition de EWS-FLI1. En outre, ces changements dans l'expression ont été testés dans les lignées SKNMC et A673, où il a été montré que les deux IDO2 et TDO2 étaient régulées à la hausse sur l'inhibition EWS-FLI1, confirmant que l'effet n'était pas lignée cellulaire spécifique.

La deuxième partie de ma thèse se concentre à essayer de faire usage des faiblesses du cancer pour tuer les cellules cancéreuses mais pas les cellules normales, ainsi que d'essayer de mieux comprendre la croissance cellulaire et la survie dans le sarcome d'Ewing. Au cours des dernières années, la recherche d'une cible thérapeutique pour mieux traiter le sarcome d'Ewing comme pour de nombreux autres cancers, a mis l'accent sur le développement de la thérapie personnalisée, grâce à l'idée qu'elle va augmenter l'efficacité thérapeutique et en réduire la toxicité. Cependant, le développement de médicaments pour ces cibles qui tuent sélectivement les cellules tumorales, sans endommager les cellules normales de l'organisme reste difficile. Dans ces cas, le concept de létalité synthétique a été avancé comme une approche potentiellement prometteuse.

La létalité synthétique a d'abord été décrite dans les études utilisant *Drosophila*

melanogaster, par Bridges en 1922 et Sturtevant en 1956^{21,22}. Depuis, de nombreux chercheurs ont avancé sur cette idée, et recherché des gènes létaux synthétiques dans d'autres organismes modèles. La létalité synthétique se produit lorsque deux mutations individuellement non létales résultent ensemble de la mort cellulaire. Dans le sarcome d'Ewing, le premier événement ou mutation est la translocation EWS-FLI1, alors que nous sommes à la recherche du deuxième événement, qui combiné à la synthèse devient mortelle.

Dans le sarcome d'Ewing, le premier événement est la translocation EWS-FLI1 qui peut être considéré comme une mutation de EWS et FLI1. Quand EWS-FLI1 est absent (dans les cellules souches mésenchymateuses) ou exprimé à un niveau faible (dans les lignées cellulaires Ewing exprimant un shRNA contre EWS-FLI1), l'effet global sur la survie de la cellule est modérée. Quand un gène particulier est réduit au silence dans le même contexte (MSC ou Ewing exprimant shEWS-FLI1), aucun effet particulier n'est observé. Toutefois, lorsque EWS-FLI1 est exprimé et le second gène est réduit au silence, leur combinaison provoque la mort cellulaire spécifique par un effet létal synthétique.

Afin de rechercher systématiquement les gènes de synthèse mortels, il est possible de faire usage de l'interférence ARN (ARNi), de façon systématique. La systématique des bibliothèques shRNA a fourni un outil puissant pour la recherche haut débit génétiques fonctionnels systématiques. La recherche de perte de fonction peut être effectuées à l'aide de cette technologie à la fois un par un par un ou grâce à un pool commun de shRNA. Les études shRNA à l'échelle du génome communs ont été récemment utilisé pour identifier les gènes qui sont essentiels pour la survie des cellules cancéreuses et la prolifération dans différents types de cancer²³⁻²⁵. Ces recherches ont déjà été utilisées pour identifier les gènes essentiels ou des interactions létales synthétiques et en tant que telle, ouvrant la voie à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques²⁶. En plus de la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, nous essayons d'identifier les gènes dont l'inactivation pourrait constituer une mutation létale synthétique avec EWS-FLI1. Schématiquement, cette invalidation ne serait létale que lorsque la cellule exprime EWS-FLI1 et pourrait donc permettre d'envisager un ciblage thérapeutique très précis des cellules tumorales. Pour trouver ces gènes, nous avons envisagé une approche de dépistage du génome regroupé dans le sarcome d'Ewing des lignées cellulaires avec ou sans frapper en bas EWS-FLI1. L'étude a utilisé le model 1c.

Dans cette étude, les cellules Ewing 1c, ont été cultivées pendant 7 jours, avec ou sans

doxycycline. Pour ce dépistage, une bibliothèque contenant 27500 shARNA couvrant 5400 gènes, qui met l'accent sur les voies de la maladie a été choisie. Afin d'obtenir le virus groupé shRNA, des bibliothèques de lentiviraux ont été utilisées avec des cellules HEK293T, et le virus a été récolté à 72h, congelées à -80 °C. Le virus a été utilisé après un cycle.

Pour effectuer les infections nous avons utilisé, 20×10^6 cellules cibles pour huit répétitions pour les deux conditions. Puis elles ont été remises en suspension dans 50 ml de milieu de culture, et étalées dans des plaques de 10 cm. 12 heures après, le milieu a été remplacé pour un milieu frais contenant 1 pg / ml de polybrène. Les deux conditions ont été infectées avec le pool de 27 500 virus avec un facteur d'infection de 0,3. Les cellules ont été laissées en cultures infectées pendant la nuit. Le lendemain, les milieux a été changés et remplacés par des nouveaux contenant 1 pg / ml de puromycine. Deux jours après l'infection, les cellules ont été décollées avec la trypsine, puis répartis dans 5 flacons de T150. Les cellules des trois répétitions de ces deux conditions ont été récoltées par centrifugation, lavées une fois dans du PBS, et conservés à -80 ° C pour une purification ultérieure de l'ADN et seront utilisés en tant que points de référence, les cinq autres répétitions ont continué à être cultivées. Pour des passages ultérieurs, les cellules ont été maintenues jusqu'à confluence, environ deux fois par semaine. Pour chaque passage d'un minimum de 27×10^6 cellules a été laissé dans la culture, représentant chacun shRNA 1000 fois, tandis que les cellules restantes ont été récoltés.

Après 10 doublements, toutes les cellules ont été récoltées ($\pm 1 \times 10^8$ cellules). L'ADN génomique a été isolé et les shRNA ont été amplifiés, suivie du séquençage à haut débit (Illumina) comme méthode de déconvolution.

Dans l'ensemble, les résultats de l'étude ARNi sont de trois ordres : les gènes qui modulent positivement et négativement la croissance cellulaire et la survie dans les deux conditions ; des gènes essentiels qui sont régulés négativement dans la croissance cellulaire dans les deux conditions, et shRNAs létaux synthétiques qui modulent négativement la croissance des cellules dans la lignée 1c, mais pas 1c DOX. Pour déterminer quels gènes constituent un phénotype léthal synthétique, ainsi qu'un phénotype essentiels ou léthal pour des cellules sans EWS-FLI1, tous les shRNA ont été classés en faisant une comparaison T-test, et en calculant un p-value. Plusieurs comparaisons ont été effectuées. 1c fin vs début et la fin de 1c vs fin 1c dox. Les gènes ont été considérés comme létaux synthétique quand les deux comparaisons ont donné

lieu à un score négatif suffisant, et au moins deux épingles à cheveux différents entraînés dans le même phénotype.

768 gènes ont affectés de manière significative la croissance des cellules dans 1c et 1c DOX, et sont donc considéré comme essentiels. Dix gènes ont été identifiés comme létaux envers les cellules 1c Dox. Ensuite, 4 gènes se sont révélés potentiellement létaux synthétique. Pour sélectionner le gène de validation, les gènes ont été évalués pour l'expression des gènes dans le sarcome d'Ewing tumeurs contre les tissus normaux. Par conséquent, il a été vérifié si les gènes ont été modulés par EWS-FLI1. PKD1 a été sélectionné pour validation. Pour valider PKD1, 3 shARNs a été sélectionnée et teste pour la diminution de l'expression de PKD1. Après, pour valider l'effet synthétique létal, des cellules de 3 lignes cellulaires, A673, SKNMC et EW24 ont été transfectés avec un des 3 shARN contre PKD1 et un shControl en combinaison avec un shControl ou un shARN contre EWS-FLI1. 4 jours après infection, la viabilité a été déterminé, et inhibition de PKD1 diminue la viabilité des cellules d'Ewing sarcome significative, mais n'influence pas significativement la viabilité des cellules qui n'exprime pas EWS-FLI1. PKD1 est donc confirmé comme gène candidat pour la létalité synthétique.

Pour résumer, les résultats précédents pourraient conclure que les changements dans le métabolisme de l'énergie sont compatibles avec le profil de métabolisme de l'énergie passant de phénotype du cancer vers plus dépendants du métabolisme oxydatif de cycle de Krebs, comme on le voit dans un type de cellule normale, et que le dépistage a donné plusieurs aspects qui méritent d'instruction et la validation de loin. Un des changements les plus notables est le changement dans kynurénine, un métabolite de la voie tryptophane. Cet a montré pour être d'une importance clinique dans un certain nombre de cancers, est associée à la progression clinique^{27,28}. En Ewing sarcome néanmoins la voie de kynurénine ne s'active sur l'inhibition EWS-FLI1, laissant entendre ainsi un rôle différent pour cette voie dans Ewing sarcome.

En deuxième volet, pour étudier systématiquement les gènes essentiels à la survie cellulaire et la prolifération ainsi que identifier les gènes létaux synthétiques qui sont spécifiques à Ewing nous avons effectué un examen synthétique létale à l'aide d'une approche shRNA groupé code-barres. L'objectif de cette approche fonctionnelle était d'identifier les gènes indispensables à la survie et la prolifération cellulaires, ainsi que d'identifier les gènes qui constituent un phénotype létal synthétique en combinaison avec un gène de fusion EWS-FLI1. Cette étude a abouti à un certain nombre de gènes

positivement et négativement la régulation de la croissance et de la survie dans le phénotype des cellules de sarcome d'Ewing 1c, et les gènes couramment essentiels 1c et 1c dox. En outre, nous avons constaté un certain nombre de gènes qui sont pensés pour être synthétique létale. PKD1 a été validé dans plusieurs lignes cellulaires de sarcome d'Ewing.

Littérature

1. Gurney, J., Swensen, A. & Bulterys, M. in *Cancer Incid. Surviv. Child. Adolesc. United States SEER Program 1975-1995* (eds. Ries, L. A. G. *et al.*) 99–110 (National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub., 1999).
2. Ewing, J. Diffuse endothelioma of bone. *Proc New York Pathol Soc* **21**, 17–24 (1921).
3. Bacci, G. *et al.* Pattern of relapse in 290 patients with nonmetastatic Ewing's sarcoma family tumors treated at a single institution with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy between 1972 and 1999. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* **32**, 974–979 (2006).
4. Esiashvili, N., Goodman, M. & Marcus, R. B., Jr. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **30**, 425–430 (2008).
5. Gupta, A. A. *et al.* Clinical outcome of children and adults with localized Ewing sarcoma: impact of chemotherapy dose and timing of local therapy. *Cancer* **116**, 3189–3194 (2010).

6. Ladenstein, R. *et al.* Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 3284–3291 (2010).
7. Paulussen, M. *et al.* Ewing's tumors with primary lung metastases: survival analysis of 114 (European Intergroup) Cooperative Ewing's Sarcoma Studies patients. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **16**, 3044–3052 (1998).
8. Delattre, O. *et al.* Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* **359**, 162–165 (1992).
9. Sorensen, P. H. *et al.* A second Ewing's sarcoma translocation, t(2122), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet* **6**, 146–51. (1994).
10. Peter, M. *et al.* A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene* **14**, 1159–64. (1997).
11. Jeon, I. S. *et al.* A variant Ewing's sarcoma translocation (722) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* **10**, 1229–34. (1995).
12. Thompson, A. D., Teitell, M. A., Arvand, A. & Denny, C. T. Divergent Ewing's sarcoma EWS/ETS fusions confer a common tumorigenic phenotype on NIH3T3 cells. *Oncogene* **18**, 5506–13. (1999).
13. Prieur, A., Tirode, F., Cohen, P. & Delattre, O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* **24**, 7275–83 (2004).

14. May, W. A. *et al.* The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* **13**, 7393–8 (1993).
15. Warburg, O. H., Posener, K. & Negelein, E. Uber den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem J* **152**, 209–344 (1924).
16. Tirode, F. *et al.* Mesenchymal stem cell features of ewing tumors. *Cancer Cell* **11**, 421–9 (2007).
17. Opitz, C. A. *et al.* An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **478**, 197–203 (2011).
18. Engin, A. B. Dual function of nitric oxide in carcinogenesis, reappraisal. *Curr. Drug Metab.* **12**, 891–899 (2011).
19. De Jong, R. A. *et al.* Serum tryptophan and kynurenine concentrations as parameters for indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with endometrial, ovarian, and vulvar cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **21**, 1320–1327 (2011).
20. Fotopoulou, C. *et al.* Systemic changes of tryptophan catabolites via the indoleamine-2,3-dioxygenase pathway in primary cervical cancer. *Anticancer Res.* **31**, 2629–2635 (2011).
21. Bridges, C. B. & Brehme, K. S. The mutants of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Inst Wash Publ* **552**, (1922).

22. Sturtevant, A. H. A highly specific complementary lethal system in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **41**, 118–123 (1956).
23. Luo, B. *et al.* Highly parallel identification of essential genes in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 20380–20385 (2008).
24. Scholl, C. *et al.* Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells. *Cell* **137**, 821–834 (2009).
25. Barbie, D. A. *et al.* Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* **462**, 108–112 (2009).
26. Luo, J. *et al.* A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell* **137**, 835–848 (2009).
27. Adams, S. *et al.* The kynurenine pathway in brain tumor pathogenesis. *Cancer Res.* **72**, 5649–5657 (2012).
28. Suzuki, Y. *et al.* Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* **67**, 361–365 (2010).