



HAL
open science

Dérégulations de la mort cellulaire dans les rhabdomyosarcomes : étude du rôle du transporteur mitochondrial ANT1

Jonathan Vial

► **To cite this version:**

Jonathan Vial. Dérégulations de la mort cellulaire dans les rhabdomyosarcomes : étude du rôle du transporteur mitochondrial ANT1. Médecine humaine et pathologie. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLEP016 . tel-04368896

HAL Id: tel-04368896

<https://theses.hal.science/tel-04368896>

Submitted on 2 Jan 2024

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée à l'École Pratique des Hautes Études

Dérégulations de la mort cellulaire dans les rhabdomyosarcomes : étude du rôle du transporteur mitochondrial ANT1

École doctorale de l'EPHE – ED 472

Spécialité : Systèmes intégrés, environnement et biodiversité (SIEB)

Soutenue par :

Jonathan VIAL

Le 17 avril 2019

Dirigée par :

Dr Marie Castets

COMPOSITION DU JURY :

Mme Caroline MOYRET-LALLE
Professeur des universités
Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon
Présidente du jury

Mme Françoise REDINI
Directrice de recherches
Université de Nantes
Rapporteur

M. Vincent GACHE
Chargé de recherches
Institut NeuroMyogène
Rapporteur

M. Jean-Yves BLAY
Professeur des universités Praticien hospitalier
Centre Léon Bérard
Examineur

M. Laurent BARTHOLIN
Chargé de recherches
Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon
Examineur

Mme Fanny BOUQUET
Directrice scientifique internationale imCORE
F.Hoffmann-La Roche
Invitée

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse pour le temps que vous m'avez consacré dans vos emplois du temps surchargés.

Merci aux docteurs Françoise Redini et Vincent Gache qui ont accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également la professeur Caroline Moyret-Lalle d'avoir accepté d'être la présidente de mon jury, un grand merci aussi au docteur Laurent Bartholin et au professeur Jean-Yves Blay d'avoir examiné mes travaux de recherche.

Mme Marie Castets, ces remerciements n'auraient pas dû exister, seulement voilà tu es arrivée dans mon parcours professionnel et tout a changé. Moi le technicien, qui voulait reprendre ses études pour valider un master, je me suis retrouvé sous ta supervision. Une première rencontre qu'on qualifiera d'étrange dans le Bureau de Patrick, et nous voilà partis pour une association qui dure depuis 6 ans (t'as presque pas vieilli ;-))! Cette histoire se conclue par la présentation de cette thèse. Alors comment j'ai pu partir sur la volonté de réussir un master avec à l'arrivé la rédaction d'un manuscrit de thèse ??? De façon assez simple en fait, tu as su cerner très vite les motivations qui m'ont poussées à reprendre mes études, tu m'as donné la confiance, l'autonomie, la réflexion scientifique que je recherchais. Et puis surtout, il y'a eu ce côté humain, un lien que j'aurais du mal à décrire, il m'a poussé à te faire confiance pour entamer une thèse, pour faire la Saintélyon (74 km). Une vraie affection qui nous a menés à avoir des moments de rigolade ponctués aussi parfois par de franches discussions, mais qui nous ont permis d'avancer, toujours. Alors voilà ces remerciement n'auraient pas dû exister mais ils existent et c'est en grande partie grâce à toi, Alors merci !

Des remerciements aussi pour une autre personne qui a eu son importance dans le déroulement de cette thèse, Fanny ! Au début évidemment effrayé par toi, alors pas totalement par toi mais plus par l'institution que tu représentes (Roche Pharma). Mais dès nos premières réunions tu m'as rassuré, tu as fait preuve d'une gentillesse et d'une bienveillance remarquables. Tu m'as donné de précieux conseils scientifiques et humains au cours de ma thèse qui m'ont été grandement bénéfiques.

Merci aussi à Aurélie Dutour, je t'ai vu manager ton groupe avec brio, j'ai beaucoup apprécié ta personnalité franche, ton rire, tes étournements et les moments que tu as passés dans le bureau à discuter avec moi qui était pourtant en marge de ton groupe. Il n'est pas interdit qu'on se retrouve très vite...

Une nouvelle arrivante qui n'est pourtant pas si nouvelle que ça, Laura. Tu auras fait le pont entre mon arrivé sous la direction de Marie et mon départ, je te re-confie Marie. Je t'ai connue brillante thésarde dans l'équipe de Patrick et je t'ai retrouvée brillante CR dans l'équipe de Marie. On n'a pas eu le temps de partager beaucoup de moments extra-laboratoire (même si les quelques soirées faites ensemble restent de très bons souvenirs, du moins celles

dont je me souviens ;-)). L'écho que j'ai de tes étudiants me fait dire que tu seras aussi extrêmement brillante dans ta nouvelle carrière!

Un grand merci à ma stagiaire qui n'est d'ailleurs plus stagiaire, Séverine dit Sésé. Tu as été la bouffée d'oxygène quand un pauvre thésard semblait perdre pied, ne comprenant plus le rationnel de ses manips. Tu m'as permis de reprendre en main le côté théorique du sujet en assumant le côté pratique. Une fierté de t'avoir formée et bien formée vu que tu t'es vu offrir un poste de technicienne dans le laboratoire. Un coté têtue parfois mais au final toujours de la bonne volonté pour réussir un maximum de manips.

Fannoche, noche, brioche, notre ingénieure, notre couteau suisse au labo, tu as grandement contribué à l'avancée du projet ANT1, j'ai apprécié tes compétences et ta gentillesse. Les discussions autour du projet étaient vraiment très agréables, tu vas toi aussi bientôt voguer vers d'autres aventures dans lesquelles je suis sûr que tu réussiras!

Comment ne pas remercier mes deux alcoolites, Nanasse et Zeuzeu deux phénomènes aussi bien scientifiquement que socialement.

Zeuzeu tu as été mon double de thèse, arrivée quelques mois après mon début de thèse, on a partagé beaucoup de moments drôles, un peu moins de sérieux mais ça nous est arrivé aussi ! Une vraie complicité malgré nos univers assez différents (RCS<ASSE). Ils ont bien essayé de nous séparer géographiquement dans le bureau mais on a résisté! On ne serait pas arrivé à travailler trop loin l'un de l'autre.

Nanasse, évidemment comment ne pas évoquer ce statut de mauvaise joueuse, le summum de la mauvaise foi, mais c'est tellement mignon chez toi. Comme Zeuzeu, tu es une personne qui donne envie de venir au labo, en plus d'être une énorme bosseuse, tu es incroyablement drôle, j'ai eu d'énormes fous rires avec toi. Tu es aussi une personne avec qui on peut avoir de vraies discussions, tu es toujours à l'écoute, ne change rien.

Nous n'étions pas un trio à la base mais plus un quatuor, mais comme un boy's band en fin de vie un membre nous a lâché avant, mais ce n'est pas une raison pour l'oublier.

Paulo, mon gars sûr, mon copain du labo une vraie complicité et une confiance mutuelle. On pouvait se parler de tout. De nombreux points communs, un vrai vide quand tu es parti pour de nouvelles expériences, et comme pour Fannoche je suis sûr que peu importe ce que tu entreprendras, tu le réussiras... Ah oui si tu pouvais changer d'équipe de foot ça serait un vrai plus.

Joseph, le petit dernier (600 grammes), si jeune et déjà presque plus de cheveux. Un début de thèse un peu difficile mais accroche toi ça va payer !

Karam, Alejandro bonne chance pour votre fin de thèse.

Un merci aussi aux stagiaires, dont ma chouchoute Lhorra.

Enfin une pensée aussi pour une ancienne du laboratoire Morgane dit Momo, on a quasiment mis en place les locaux ensemble, on était les deux pionniers, mais tu m'as quittée assez vite,

thèse en poche ! Tu à l'air de te régaler dans ta nouvelle vie et ça fait plaisir de te voir comme ça.

Il y'a aussi mes copains de toujours du CLB, Nini et Benj, deux personnes rencontrées dans l'équipe de Patrick à mes débuts, même si nos routes ce sont séparées au sein du CLB on est toujours restés en contact, pour un petit badminton, une course à pied voir même un apéro!

Comment ne pas remercier la famille et les amis

Merci à ma maman pour son soutien et tout ce qu'elle a pu faire pour moi dans ma vie. Il est évident que cette thèse est quelque part aussi la tienne, jamais je n'aurais pu réussir dans ma vie professionnelle et personnelle, si je n'avais pas eu tes bons conseils. Tu t'es toujours démené pour moi et j'espère te rendre fière notamment avec cette thèse. On a vécu et affronté des moments tragiques, mais on les a surmontés en gardant des traces dans nos têtes et dans nos cœurs. Une énorme pensée d'ailleurs à ma sœur et à mon père deux personnes pour lesquelles je me bats chaque jour pour les rendre fières, pour les représenter au mieux. Je sais que vous veiller sur moi de là ou vous êtes! On vit sans vous mais on vit aussi pour vous !

Un merci à mes cousins et cousines, pour les repas de familles ou pour les soirées match avec toi mon Nouillo.

Un grand merci aussi à mes « beaux-parents » Dominique et Serge, toujours là pour nous, une bienveillance, des fournisseurs de café hors pair ! Toujours un plaisir de passer un moment avec vous (Apéro, restaurants)

Les amis, bien sûr le groupe des Clermontois, Alix et José toujours là dans les bons comme dans les mauvais moments! Des amis que je souhaite à tout le monde d'avoir. Des soutiens infaillibles. Et évidemment vous m'avez accordé ma première responsabilité en me donnant un petit filleul, Léon avec qui je compte bien partager de nombreuses choses.

Chloé, Fred, Lolo, Pauline, Titi, Nanou, J.A., Janot j'aurais envie de dire un mot à chacun mais mes remerciements seraient un peu trop longs... Je vais donc vous englober dans un même remerciement (ne m'en voulez pas je vous aime vraiment). Juste que c'est bon pour moi de vous voir à chaque soirée, chaque week-end, des moments que l'on voudrait interminables. On a de belles choses à vivre, de nouveaux rebondissements, de nouveaux arrivants (il va s'appeler comment ce petit Chloé et Fred ?)...

Les amis lyonnais, D'abord les Wachtel (Mel, Noah et Flo) tout fraîchement trois, des soirées de jeux endiablées à lire les règles du jeu et l'autre soirée à jouer ;-p, des vrais moments privilégiés, des bons moments de bonne humeur et d'entraide !

La Blabla family (Elisa, Naïnaï, Johnny) des gros fous rires, des grosses sessions travaux et là aussi de bonnes soirées jeux où vous aussi vous avez subi LA règle du jeu (Flo mon idole).

Gardounette and friend's (Alice, Tibo, Audrey, Will, Manon et Rémi) les rois de la course à pied, des enfants mais des enfants drôles !

Comment ne pas finir par MA famille,

Ma copine, ma meilleure amie, mon premier soutien, ma première critique, la mère de ma fille, mon *alter-ego*. Marion, tu es la personne qui me pousse chaque jour à être meilleur, à relativiser les choses qui me semblent dures ! Plein de projets déjà réalisés ensemble : une petite fille, une maison, des super voyages (Japon, Canada, New-york pour ne citer qu'eux). Encore tout plein à réaliser (ranger... ça va je rigole ;-)), On s'est connus au laboratoire, je t'ai vu devenir un docteur, malgré les difficultés qui se sont présentées à toi. Inconsciemment je pense que ça m'a aidé aussi à réussir cette thèse. Je suis et je serai toujours fier de toi, et puis tu m'as donnée mon plus beau cadeau : Emmy, notre petite merveille.

Du coup la dernière petite partie t'es dédiée ma Mymy, tu as attendu que ton papa rende son mémoire, pour pointer le bout de ton nez, un premier bon point pour toi ;-). Tu viens de changer radicalement notre vie avec ta maman, tu la rends encore plus belle. Inconsciemment tu as été d'une grande aide pour moi dans le finalisation de cette thèse, en me montrant que la thèse est une chose, mais que devenir le repère de quelqu'un est une chose encore bien plus grande. Tu m'as permis de relativiser cette épreuve, merci ma fille !

Tu me rajoutes une pression supplémentaire, je n'ai pas le droit de te décevoir, je veux que tu sois fière de ton papa. Hâte de te voir grandir ma puce.

Résumé

Dérégulations de la mort cellulaire dans les rhabdomyosarcomes : étude du rôle du transporteur mitochondrial ANT1

Le rhabdomyosarcome (RMS) est la forme la plus fréquente de sarcome des tissus mous chez l'enfant. On distingue 2 sous-types principaux: ERMS (embryonnaire) et ARMS (alvéolaire). Les traitements actuels sont basés sur la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie. Le taux de survie à 5 ans reste de 70% depuis 2000, malgré plusieurs essais cliniques. Il est donc essentiel de pouvoir mieux comprendre leurs bases moléculaires pour pouvoir dans l'avenir mieux les soigner. Mon projet de thèse s'est inscrit dans cette perspective, en cherchant à mieux définir les mécanismes à l'origine de la résistance à la mort cellulaire dans ces cancers.

Les cellules tumorales de RMS proviennent de précurseurs du lignage musculaire. Au cours de la myogenèse, la différenciation des myoblastes primitifs en myotubes nécessite un « switch » métabolique pour répondre à la demande énergétique accrue associée à la contraction musculaire. Ce processus est notamment soutenu par l'expression de gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative, tels que SLC25A4.

Ce gène code pour une protéine mitochondriale nommée ANT1, qui présente une dualité fonctionnelle. En effet, elle intervient à la fois dans la régulation du métabolisme énergétique en régulant l'export d'ATP de la mitochondrie vers le cytosol, mais également dans l'induction de la mort cellulaire en participant à l'ouverture du pore de transition de perméabilité (mPTP) conduisant à la libération du cytochrome c en conditions de stress. Par analyse bioinformatique de bases de données transcriptomiques, nous avons observé que l'expression de SLC25A4 est diminuée dans les RMS. Afin d'étudier le rôle causal de cette altération dans la survenue de RMS, des modèles cellulaires de RMS génétiquement modifiés permettant la surexpression ou l'inactivation d'ANT1 de manière inductible ont été établis. A l'aide de ces modèles, nous avons montré que la perte d'ANT1 favorise un « switch » métabolique dans les cellules tumorales de RMS et/ou diminue la sensibilité à des stress de type chimiothérapie, selon le contexte cellulaire. Réciproquement, sa réexpression sensibilise les cellules à ces traitements *in vitro*, et suffit à freiner la croissance tumorale *in vivo*. Ces résultats indiquent que la perte d'ANT1 peut constituer un nouveau mécanisme oncogénique dans les cellules tumorales, et favoriser notamment la résistance aux chimiothérapies.

Summary

Deregulation of cell death in rhabdomyosarcoma: analysis of the role of the mitochondrial transporter ANT1

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most frequent form of pediatric soft-tissue sarcoma. It is divided into 2 main subtypes: ERMS (embryonal) and ARMS (alveolar). Current treatments are based on chemotherapy, surgery and radiotherapy. 5-year survival rate remains of 70% since 2000, despite several clinical trials. There is then an urgent need to improve the understanding of their molecular etiology to improve their therapeutic management. My PhD project forms part of this perspective, by seeking to better define mechanisms triggering resistance to cell death in these cancers.

RMS cells derive from muscle lineage precursors. During myogenesis, primitive myoblasts differentiation into myotubes requires a metabolic switch to support the increased energetic demand of contractile muscle. This process is notably supported by expression of genes involved in oxydative phosphorylation, such as SLC25A4.

This gene encodes a mitochondrial protein named ANT1, which has a functional duality as it is involved both in metabolism via regulation of ATP release from mitochondria to cytosol, but also in apoptosis as part as the mPTP (mitochondria Permeability Transition Pore) leading to the release of cytochrome c under stress. By bioinformatic analysis of transcriptomic databases, we observed that SLC25A4 expression is downregulated in RMS. To deal with this result in depth, we designed modified RMS cells inactivated for ANT1 using CRISPR/CAS9 technology or overexpressing this protein, using a Tet-On system. Using these models, we have shown that loss of ANT1 favors a metabolic switch in RMS tumor cells and/or promotes resistance to death notably upon chemotherapeutic treatments, according to the cell context. Reciprocally, its reexpression sensitizes cells to these treatments in vitro and brakes tumor growth in vivo. These results indicate that ANT1 loss may constitute a new oncogenic mechanism in tumor cells, and may notably favor resistance to chemotherapies.

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	1
Summary	2
Table des matières	3
LISTE DES ABREVIATIONS	6
Listes des figures et des tableaux	8
Chapitre 1 : Introduction	9
I. Les rhabdomyosarcomes : un défi médical en oncopédiatrie	10
1. Les cancers pédiatriques	10
a. Définition et caractéristiques	10
b. Epidémiologie	11
c. Prise en charge et traitements des cancers pédiatriques	11
2. Les sarcomes: des cancers à forte prévalence chez l'enfant et l'adolescent	13
a. Les sarcomes : définition	13
b. Les RMS, des cancers du lignage musculaire	14
i. Généralités	14
ii. Les différents sous types de RMS	16
iii. Traitements	17
II. Les mécanismes de la tumorigénèse	19
1. Le modèle d' Hanahan et Weinberg	19
a. Les mécanismes de l'échappement tumoral	20
b. Les caractéristiques acquises par les cellules tumorales	22
2. Tumorigénèse et résistance à la mort cellulaire	23
a. Historique	23
b. Les différents types de mort cellulaire programmée : manifestations et mécanistique	25
i. Généralités	25
ii. Apoptose : Rôle et mécanismes	27
iii. L'autophagie	32
iv. La nécrose	34
c. Rôles physiologiques et pathologiques de la mort cellulaire	37
i. Les rôles physiologiques de la mort cellulaire	37
ii. Les rôles pathologiques de la mort cellulaire	38
3. Tumorigénèse et changements métaboliques	57
a. Introduction et définition	57
b. La glycolyse	57
c. La phosphorylation oxydative	59
d. Altérations du métabolisme et tumorigénèse : zoom sur l'effet Warburg	61
i. Dérégulation des transporteurs du glucose	62
ii. Dérégulation des enzymes du métabolisme du glucose	63
iii. Stimulation de la glycolyse par des oncogènes	64
4. La mitochondrie, clé de voute de la balance vie/mort	65

a.	Généralités _____	65
b.	Production d'espèces oxygénées réactives (ROS) par la mitochondrie _____	66
c.	Régulation de la perméabilité membranaire mitochondriale : enjeux et rôle clé du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) _____	67
d.	Composition du mPTP _____	68
i.	La cyclophiline D (CypD) _____	68
ii.	VDAC _____	68
iii.	ANT _____	69
iv.	Les protéines de la famille Bcl-2 _____	70
III.	Etiologie moléculaire des RMS : état des connaissances et enjeux _____	70
1.	D'une classification histologique à une classification moléculaire des RMS _____	70
2.	Déséquilibre de la balance vie/mort dans les RMS _____	71
3.	RMS et myogenèse: Dr Jekyll et Mr Hyde du muscle squelettique _____	72
	Hypothèse du projet de thèse _____	74
	Chapitre 2 : Résultats _____	75
I.	Cartographie de l'état de fonctionnement des signaux internes de mort cellulaire dans les RMS. _____	75
1.	Analyse fonctionnelle de type « puces de cellules » _____	75
a.	Matériel et Méthodes _____	75
b.	Résultats _____	76
c.	Analyses _____	77
2.	Analyse bioinformatique des données transcriptomiques des bases de données publiques _____	78
a.	Choix des gènes d'intérêt _____	78
b.	Analyse des données _____	79
II.	Etude du rôle du transporteur mitochondrial ANT1 dans la résistance à la mort cellulaire dans les RMS _____	83
1.	Intégration des études large échelle et choix du gène candidat SLC25A4 _____	83
i.	Introduction : présentation du transporteur mitochondrial ANT1 _____	83
ii.	Choix du transporteur ANT1 _____	83
2.	Caractérisation et impact d'altérations du profil d'expression du gène SLC25A4 dans la survenue de RMS. _____	84
a.	Analyse du profil d'expression de SLC25A4 dans les RMS _____	84
b.	Impact du niveau d'expression d'ANT1 sur la prolifération cellulaire. _____	86
i.	Etablissement de modèles cellulaires _____	86
ii.	Modulation de l'expression de ANT1 et prolifération cellulaire _____	87
iii.	Impact du niveau d'expression d'ANT1 sur le métabolisme cellulaire _____	87
c.	Impact du niveau d'expression d'ANT1 sur la mort cellulaire _____	87
i.	Impact du niveau de l'expression d'ANT1 en conditions basales sur la survie cellulaire _____	87
ii.	Niveau d'expression d'ANT1 et résistance au stress oxydatif _____	87
iii.	Impact du niveau d'expression d'ANT1 sur la résistance aux traitements _____	88
d.	Impact de la réexpression d'ANT1 in vivo sur la croissance tumorale _____	88
	Chapitre 3: Discussion _____	112
I.	Etude du rôle d'ANT1 dans la tumorigenèse des RMS : enjeux et perspectives _____	112
1.	Altérations de l'expression d'ANT1 dans les RMS : limites et enjeux _____	112

a.	Utilisation du muscle squelettique comme référence non tumorale : est-ce le plus pertinent des modèles? _____	112
b.	D'une diminution d'expression à l'échelle de l'ARN à un différentiel d'expression au niveau protéique : peut-on extrapoler ? _____	113
c.	Altérations quantitatives du profil d'expression de la protéine ANT1 : existe-t-il des anomalies qualitatives? _____	113
d.	Perte d'ANT1 : un mécanisme impliqué dans d'autres sarcomes ? _____	114
2.	ANT1 : un acteur de la tumorigénèse dans les RMS _____	116
a.	Modèles d'étude et limites _____	116
b.	ANT1 et résistance à la mort cellulaire _____	117
c.	ANT1 et modulation du métabolisme cellulaire _____	119
3.	ANT1 : un candidat pour une thérapie génique anticancéreuse ? _____	120
II.	Cartographie des voies de mort cellulaire : intérêts et perspectives _____	121
	ANNEXE _____	124
	Bibliographie _____	125

LISTE DES ABREVIATIONS

$\Delta\Psi_m$: Potentiel de la membrane mitochondriale
ADN: Acide Désoxyribonucléique
ADNmt: Acide Désoxyribonucléique mitochondrial
ADP: Adénosine di-phosphate
AIF: Apoptosis-inducing factor
Akt: PKB, Protéine kinase B
ANT: Adénosine nucleotide transférase
APAF-1 : Apoptotic Protease Activating Factor 1
ARMS: Rhabdomyosarcome alvéolaire
ATG: Gènes relatifs à l'autophagie
ATP: Adénosine tri-phosphate
BAK: Bcl-2 Antagonist or Killer
BAX: Bcl-2 Associated X protein
BCL-2: B-Cell Lymphoma 2
BCL-XL: B-Cell Lymphoma extra-large
BID: BH3 Interacting Domain Death Agonist
BNIP: BCL2/Adenovirus E1B 19kDa Interacting Protein
Ca²⁺: Ion calcium
CAD: Caspase Activated DNase
CARD: CAspase Recruitment Domain
CAR-T: Chimeric antigen receptor T cell
Cas9: CRISPR associated protein 9
C-FLIP: Cellular FLICE-like inhibitory protein
CoQ: Ubiquinole
CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CXCL: Chemokine (C-X-C motif) ligand
CypD: Cyclophiline D
DED: Death Effector Domain
DGC: Complexe-dystrophine-glycoprotéines
DIPG: Diffuse Intrinsic Pontine Glioma
DISC: Death-Inducing Signaling Complex
DM : Dystrophie Musculaire
DOX: Doxycycline
DR: Death Receptor
EDAR: Ectodysplasin A Receptor
ERMS: Rhabomyosarcome Embryonnaire
ERK: Extracellular signal - Regulated Kinase
FADD: FAS-associated death domain
FADH₂: Flavine Adénine Dinucléotide
FLIP : Flice-Like Inhibitory Protein
FOXO: Forkhead Box O
FSHD: Dystrophie facio-scapulo-humérale
GLUT: Glucose Transporter
GBM: Glioblastome
GFP: Green fluorescent Protein

GPx4: Gluthation peroxidase 4
GSH: Glutathion réduit
GSSG: Glutathione oxydé
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
HIF: Hypoxia-inducible factor
HK: Hexokinase
IAPs: Inhibitor of Apoptosis Proteins
IGF2: Insulin-like growth factor 2
KRAS: Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LDHA: Lactate dehydrogenase A
LFS: Syndrome de Li-Fraumeni
MAPK : Mitogen Associated Protein Kinase
MCL-1: Myeloid Cell Leukemia 1
MEC: Matrice extracellulaire
Mg²⁺: Ion Magnesium
MnSOD: Manganese-dependent superoxide dismutase
mPTP: Pore de transition de perméabilité mitochondriale
mTORC1: Mechanistic target of rapamycin complex 1
NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OXPHOS: Phosphorylation oxydative
PAX: Paired box
PDH : Pyruvate Deshydrogénase
PDK : Pyruvate Deshydrogénase Kinase
PFK : Phosphofructokinase
PKM: Pyruvate kinase
Pi: Phosphate inorganique
Pi3k: Phosphatidylinositol-3-Kinase
PUMA: P53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RIPk: Receptor Interacting Protein Kinase
RMS: Rhabdomyosarcome
ROS: Reactive Oxygen Species
RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction
SLC: Solute Carrier Family
SNC: Système Nerveux Central
SOD: Superoxide Dismutase
TCA : Tricarboxylic acid cycle
TCR : T-Cell Receptor
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TIGAR: TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator
TLR: Toll-Like Receptor
TNF: Tumor Necrosis Factor
TRAIL: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
ULK: Unc-51-Like Kinase
VAC: Vincristine, Actinomycine et Cyclophosphamide
VDAC: Voltage Dependant Anion Channel
VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine
ZnSOD: Copper- and zinc-containing superoxide dismutase

Listes des figures et des tableaux

Figure 1: Evolution de la survie à 10 ans pour plusieurs cancers pédiatriques de 1975-2004.....	11
Figure 2: Aspect histologique de a) ARMS et b) ERMS, (hematoxyline-eosine, objectif: 100X).....	15
Figure 3: Traitement des RMS en fonction du grade, de la taille et de la localisation de la tumeur	18
Figure 4: Modèle de Hanahan et Weinberg présentant les six caractéristiques majeures acquises par les cellules cancéreuses au cours de l'échappement	20
Figure 5: Nouveau modèle de Hanahan et Weinberg, présentant les 4 caractéristiques supplémentaires nécessaires à l'échappement tumoral	23
Figure 6: Caractérisation morphologique de l'apoptose, extraite de l'article de Kerr, Wyllie et Currie (1972). ...	25
Figure 7 : Les trois principaux types de mort cellulaire : apoptose, autophagie et nécrose.....	27
Figure 8: Schéma des deux principales voies d'apoptose (voie intrinsèque et voie extrinsèque).....	28
Figure 9: Schéma représentatif des caspases humaines et de leurs fonctions	30
Figure 10: La signalisation apoptotique de TRAIL-R1 ET TRAIL-R2.	31
Figure 11: La voie de signalisation autophagique, sous stress métabolique.....	34
Figure 12: La voie de signalisation de la ferroptose avec ses activateurs et inhibiteurs.....	36
Figure 13: Schéma de la glycolyse, aboutissant à la transformation du glucose en pyruvate, avec production de 2 molécules d'ATP	59
Figure 14: Représentation schématique des différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie (effet Warburg).....	62
Figure 15: Régulations métaboliques induites par l'hypoxie via HIF-1.....	64
Figure 16 : Schéma en ruban de la structure d'ANT	69
Figure 17 : Schéma des fonctions mitochondriales des protéines ANT	70
Figure 18: Schéma simplifié du rationnel de la comparaison entre RMS et DM.....	73
Figure 19 : Présentation des gènes dont l'inactivation induit la plus forte augmentation de l'apoptose.....	77
Figure 20: Analyse Heatmap avec transformation Log2 des gènes de mort cellulaire entre RMS et muscles non-tumoraux.	80
Figure 21 : Résultats de l'analyse en ACP.....	81
Figure 22 : Discrimination par analyse ACP des échantillons de RMS en fonction de critères cliniques.	82
Figure 23: Comparaison de l'expression des gènes du complexe ANT1 entre échantillons tumoraux et sains. ...	85
Figure 24 : Comparaison de l'expression des gènes du complexe ANT1 dans les RMS fusion négatif vs RMS fusion positif à partir de la base de données E-TABM-1202.....	86
Figure 25: Valeurs du niveau d'expression de SLC25A4 sur la survie sans métastase des patients atteints de sarcomes à génomiques complexes.....	114
Figure 26: Valeurs du niveau d'expression de SLC25A4 sur la survie sans métastase des patients atteints de GIST.	115
Figure 27: Valeurs du niveau d'expression de SLC25A4 sur la survie sans métastase des patients atteints de liposarcomes myxoides.....	115
Figure 28: Cycle rédox du glutathion.	118
Figure 29: <i>La mort cellulaire induite par surexpression d'ANT1 est bloquée par la ferrostatine-1</i>	118
Figure 30: Voies métaboliques alternatives potentiellement utilisées par les cellules tumorales pour produire de l'ATP lors de la modulation de l'expression d'ANT1.....	120

Chapitre 1 : Introduction

Avant-propos

Si la mort est perçue dans nos sociétés modernes comme une fatalité tragique, elle est à considérer avec un tout autre regard à l'échelle d'un organisme. Chaque jour, un adulte perd par exemple entre 50 et 70 milliards de cellules avec, comme enjeu ultime et paradoxal, le maintien de l'intégrité physique de l'individu. La mise en place et l'homéostasie des tissus reposent en réalité sur un équilibre très fin entre vie et mort cellulaire, dès les premiers instants de vie. Un défaut de cet équilibre, une absence ou un excès de mort cellulaire, peuvent conduire à différentes pathologies.

Même si cette maladie touche majoritairement les adultes, le cancer peut aussi se développer chez des patients âgés de moins de 19 ans : on parle alors de cancers pédiatriques. Le cas des cancers pédiatriques est toujours un sujet délicat à aborder d'un point de vue sociétal. L'émouvant livre de John Green « *Nos Étoiles Contraires* » (*The Fault in Our Stars*) adapté récemment au cinéma, avait illustré l'angoisse, l'impuissance, la souffrance et les contraintes des patients et de leurs familles face à ces pathologies.

Actuellement, la survie à 5 ans des enfants atteints de cancer est de 80% : un enfant sur cinq atteint de cancer décède encore. Une meilleure connaissance des bases moléculaires de ces cancers pourrait ouvrir la voie à de nouvelles thérapies plus efficaces.

Mon travail de thèse s'inscrit dans cette problématique, avec pour objectif de mieux comprendre les points de blocage de la mort cellulaire dans un cancer pédiatrique : le rhabdomyosarcome.

I. Les rhabdomyosarcomes : un défi médical en oncopédiatrie

1. Les cancers pédiatriques

a. Définition et caractéristiques

Les cancers résultent de la transformation progressive d'une cellule normale en cellules tumorales. Ce processus est la conséquence d'une série d'altérations génétiques et épigénétiques, chronologiques et séquentielles, de l'expression de gènes sous l'effet de facteurs :

- endogènes : chaque individu possède en effet un patrimoine génétique unique lui conférant une susceptibilité propre à développer un cancer. On estime d'ailleurs que 10% des cancers sont héréditaires.
- exogènes, correspondant à l'exposition environnementale à des cancérogènes physiques (UV, radiations), biologiques (virus, bactéries, parasites) ou chimiques (tabac, aflatoxine, alcool, mais aussi amiante, hydrocarbures etc...).

L'interaction entre les caractéristiques génétiques de l'individu et l'exposition à des agents extérieurs cancérogènes conduira ou non à la survenue d'un cancer.

Les cancers pédiatriques sont des cancers touchant la population âgée de 0 à 19 ans. Chaque année, près de 2 500 nouveaux cas de cancers sont recensés en France dans cette tranche d'âge. Contrairement à de nombreux cancers chez les adultes, comme les mélanomes, les cancers du poumon ou du colon par exemple, les cancers chez les enfants ne seraient pas fortement associés à des facteurs de risque liés au mode de vie. Seul un petit nombre de cancers pédiatriques sont héréditaires, et associés à la transmission germinale de mutations. Les causes de ces cancers sont donc à l'heure actuelle mal comprises.

Alors que les adultes développent principalement des cancers du poumon, du sein ou de la prostate, ces types de cancer sont très peu fréquents chez les enfants. Chez les moins de 15 ans, les principales formes de cancers sont les leucémies (29 % des cas, dont 80 % de leucémies aiguës lymphoblastiques), les tumeurs du système nerveux central (SNC : 24 %) et les lymphomes (11 %). Chez les 15-19 ans, les principales localisations sont les lymphomes (27 % des cas, dont 85 % de maladie de Hodgkin), les tumeurs du SNC (17 %) et les leucémies (16 % dont 53 % de leucémies aiguës lymphoblastiques). Les cancers pédiatriques sont donc également différents de ceux de l'adulte dans leur nature. Certains cancers pédiatriques sont dits blastiques c'est à dire qu'ils dérivent de tissus embryonnaires, c'est le cas par exemple du neuroblastome, de l'hépatoblastome et du néphroblastome.

Les cancers pédiatriques sont aussi caractérisés par la rapidité souvent extrême de leur croissance, mais aussi à l'inverse par la régression spontanée de certaines tumeurs, comme certains types de neuroblastomes du très jeune nourrisson par exemple [1].

b. Epidémiologie

Comme le rapporte l'Institut National du Cancer, on estime à 399 500 le nombre de nouveaux cas de cancers diagnostiqués en 2017 en France métropolitaine (214 000 hommes et 185 500 femmes). Les taux d'incidence sont estimés à 353,2 pour 100 000 hommes et 284,5 pour 100 000 femmes. L'âge médian au diagnostic était de 68 ans chez l'homme et de 67 ans chez la femme en 2015.

Les cancers sont donc essentiellement une maladie du sujet adulte (environ 99.5% des cas de cancers). Pourtant, comme vu précédemment, 2500 enfants déclarent un cancer en France chaque année. En France, le nombre de nouveaux cas de cancer chez l'enfant de moins de 15 ans est estimé à environ 1700 par an et à environ 700 par an chez les adolescents entre 15 et 19 ans. L'ensemble de ces cas représente donc moins de 1% de l'ensemble des cancers. Cette incidence est stable depuis le début des années 2000 avec, actuellement, un taux de survie à 5 ans de 80% pour l'ensemble des cancers pédiatriques. Afin de rassembler toutes ces données médicales et de les analyser, deux registres nationaux ont été créés en France : en 1990, le registre national des hémopathies malignes (RNHE) et en 2000, le registre national des tumeurs solides de l'enfant (RNTSE) pour les enfants âgés de moins de 17 ans. La surveillance des cancers de l'adolescent et du jeune adulte, âgés de 15 à 24 ans, est assurée par les registres généraux et spécialisés du cancer du réseau Francim [2].

c. Prise en charge et traitements des cancers pédiatriques

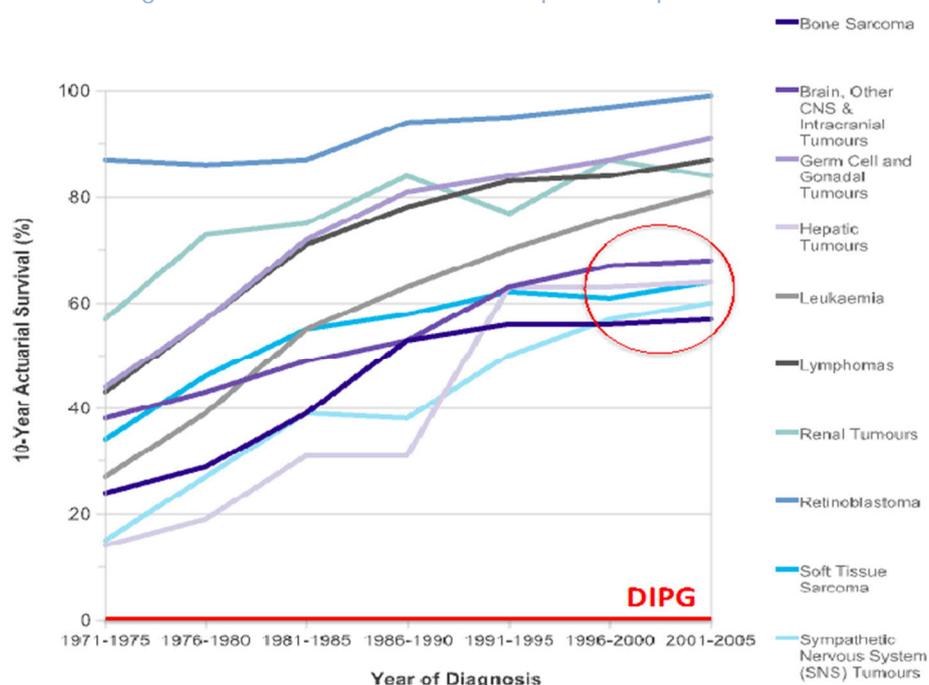


Figure 1: Evolution de la survie à 10 ans pour plusieurs cancers pédiatriques de 1975-2004[3].

A partir des années 70, on observe une évolution positive du taux de survie dans la plupart des cancers pédiatriques, avec une tendance à la stagnation vers les années 2000 (cercle rouge). Certains cancers, comme le DIPG, restent des impasses absolues. D'après <http://www.cancerresearchuk.org>.

Le nombre de décès par cancer est passé de 360 en 1999 à 250 en 2012. Les cancers restent la principale cause de mortalité chez les enfants/adolescents de plus de un an. Chez les 15-19 ans, 117 décès par cancer ont été observés en France en 2009. Les leucémies et les tumeurs du SNC représentent 45 % des décès [4].

Jusque dans les années 60, les soins palliatifs étaient les seuls disponibles pour les enfants atteints de cancer. La conduite d'essais cliniques sur des enfants était considérée comme immorale, et la directive était de faire en sorte « de garder ces enfants à l'aise » [5].

Dans les années 60-70, le développement de chimiothérapies a permis d'acquérir une nouvelle arme contre les cancers chez les enfants. Le docteur Sidney Farber, pathologiste en pédiatrie, a découvert que ces drogues pouvaient être utiles pour faire régresser leurs tumeurs.

A partir de cette date-là jusqu'au début des années 90, les cancers pédiatriques ont été pris en charge de la même manière que les cancers adultes avec une association de chimiothérapie, de radiothérapie et/ou de la chirurgie. Cet arsenal thérapeutique a donné des résultats probants et une amélioration nette de la survie (**Figure 1**). Les enfants étaient alors considérés comme de petits adultes, et la posologie était simplement adaptée en conséquence à la taille de leur organisme. Les médecins sont ensuite partis du postulat que les cellules ayant une vitesse de prolifération plus élevée chez un enfant, l'augmentation des doses de chimiothérapies pourraient être bénéfiques. Cependant, des effets secondaires souvent dramatiques ont été observés en utilisant cette stratégie, qui ne s'est pas accompagnée d'une hausse d'efficacité.

A partir des années 90, des programmes de recherche plus spécifiques des cancers pédiatriques ont commencé à se développer afin de tendre vers une médecine plus personnalisée, notamment à partir d'approches transcriptomiques focalisées uniquement sur les cancers de l'enfant. Cette approche s'inscrit dans la volonté de soigner « plus », c'est à dire d'augmenter les taux de survie, mais également de soigner « mieux ». En effet, les thérapies actuelles ne sont pas dénuées d'effets secondaires sur des organismes si jeunes. On estime que près de 2/3 des enfants auront des séquelles plus ou moins lourdes associées aux traitements, avec notamment :

- Des troubles reproducteurs et sexuels. Les chimiothérapies peuvent réduire la production d'hormones par les ovaires ou les testicules, ce qui peut retarder la puberté. À cause de certains agents (agents alkylants et intercalants de l'ADN), une étude a montré que les hommes ayant subi une chimiothérapie dans leur enfance sont beaucoup moins fertiles (50 % contre 80 %) [6]. Les radiothérapies localisées sont également associées à un risque de stérilité.
- Des dommages au cœur: le cœur peut être affecté par certains agents chimiothérapeutiques en particulier les anthracyclines, comme la daunorubicine chez un petit nombre d'enfants. Quand cela se produit, c'est habituellement permanent. Les cas d'insuffisance cardiaque clinique semblent se situer entre 1% et 5%. La toxicité peut survenir tôt (dans l'année) ou être tardive dans 2/3 des cas.

Les anthracyclines peuvent également induire une cardiotoxicité chronique progressive à l'apparition précoce entraînant une cardiomyopathie. Il s'agit d'un des types de cardiotoxicité la plus courante. La cardiomyopathie induite par les anthracyclines chroniques se manifeste habituellement au cours de l'année suivant le traitement. Elle peut persister ou progresser même après l'arrêt du traitement et peut évoluer en une cardiomyopathie dilatée chronique chez l'adulte et en une cardiomyopathie restrictive chez l'enfant [7].

- Le développement de cancers secondaires. Le risque de deuxième cancer lié aux agents utilisés, à leurs combinaisons, à leurs doses cumulatives et aux éventuels terrains prédisposant est maintenant mieux connu. Les médicaments plus particulièrement associés à une augmentation de ce risque sont les agents alkylants, les dérivés du platine et l'étoposide. Le risque de développer un cancer secondaire après un traitement d'un rhabdomyosarcome primaire est largement augmenté [8]. En revanche, les autres cancers secondaires surviennent pour la plupart en territoire irradié et le risque de leur survenue est sans doute potentialisé par les chimiothérapies associées.

2. Les sarcomes: des cancers à forte prévalence chez l'enfant et l'adolescent

a. Les sarcomes : définition

Les sarcomes, du mot grec "sarkôma" qui signifie littéralement "excroissance de chair", sont des tumeurs rares [9]. Ils représentent 1% des cancers chez l'adulte, mais il n'en est pas de même pour la population pédiatrique, où leur incidence atteint les 20% [10]. Ils se développent à partir des tissus de soutien d'origine mésenchymateuse comme les os, la graisse, les muscles, les vaisseaux sanguins, les tissus profonds de la peau, les nerfs et le cartilage [11].

Les sarcomes regroupent un ensemble complexe et hétérogène de tumeurs malignes, différentes sur le plan de leur étiologie moléculaire mais également histologiquement. Ils peuvent être classés en 2 grandes catégories:

- les sarcomes des tissus mous. Les sarcomes des tissus mous constituent 90% des sarcomes et sont représentés notamment par les rhabdomyosarcomes (tissus musculaires), les liposarcomes (tissus graisseux), les fibrosarcomes (tissus fibreux), les angiosarcomes (tissus de soutien des vaisseaux sanguins), les GIST (tumeurs stromales gastro-intestinales). Les rhabdomyosarcomes (RMS) sont les sarcomes des tissus mous les plus fréquents chez l'enfant. Ils représentent 5 à 8% des tumeurs malignes solides de l'enfant. Les RMS ont fait l'objet de mon travail de thèse et sont présentés ci-après.
- les sarcomes osseux constituent une plus faible partie de ces cancers (10%), l'ostéosarcome étant le plus fréquent. Cette tumeur osseuse primitive affecte

essentiellement les enfants et adolescents. Le second sarcome osseux en terme de fréquence est le chondrosarcome, qui lui concerne une population adulte [9].

La classification des principaux sous-types de sarcomes ainsi que leur fréquence sont présentées dans le **Tableau 1**.

Sarcomes des tissus mous 90%		Sarcomes osseux 10%	
Type	Pourcentage	Type	Pourcentage
Liposarcome	16.8%	Ostéosarcome	28%
Fibrosarcome	7.6%	Chondrosarcome	40%
Leiomyosarcome	13.3%	Chordome	10%
Angiosarcome	3.9%	Sarcome d'Ewing	8%
Rhabdomyosarcome	2.9%		
GIST	10%		

Tableau 1: Répartition histologique des principaux types de sarcomes [12],[13].

Le liposarcome est le sarcome des tissus mous le plus répandu, représentant 16.8% des cas. Dans les sarcomes osseux, le chondrosarcome représente à lui seul 40% des cas.

Les sarcomes des tissus mous et les sarcomes osseux sont respectivement les troisième et quatrième principales causes de décès dans les cancers pédiatriques.

b. Les RMS, des cancers du lignage musculaire

i. Généralités

Les RMS sont des tumeurs malignes d'origine mésenchymateuse. Les RMS constituent la troisième tumeur solide maligne extra crânienne la plus répandue chez les enfants et les adolescents, et représente 65% des cas de sarcomes des tissus mous. Cependant, chez l'adulte, les RMS représentent moins de 1% de toutes les tumeurs malignes tumorales solides.

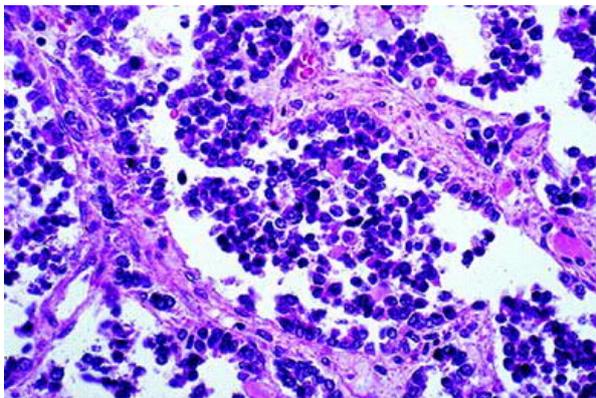
Les signes et les symptômes de RMS sont variables et dépendent de multiples facteurs, notamment le site d'origine, l'âge du patient et la présence ou non de métastases à distance. Lorsque la tumeur apparaît dans la région de la tête et du cou, le patient peut présenter une masse localisée, indolore et grossissante. Les patients atteints de RMS du tractus génito-urinaire peuvent présenter une hématurie et une obstruction des voies urinaires. Les RMS des

extrémités se présentent généralement comme une masse douloureuse, avec ou sans érythème associé de la peau sous-jacente.

De manière générale, ces tumeurs forment des masses infiltrantes mal définies, blanches, molles ou fermes. La tumeur mesure généralement plus de 5 centimètres au moment du diagnostic. Il existe plusieurs sous-types histologiques de RMS, et la classification de ces entités est importante en matière de traitement et de pronostic.

La classification de l'OMS pour les tumeurs myogéniques publiée en 2013 répartit les RMS en quatre sous-catégories: embryonnaire, alvéolaire, pléomorphe et fuseau/sclérosant.

a)



b)

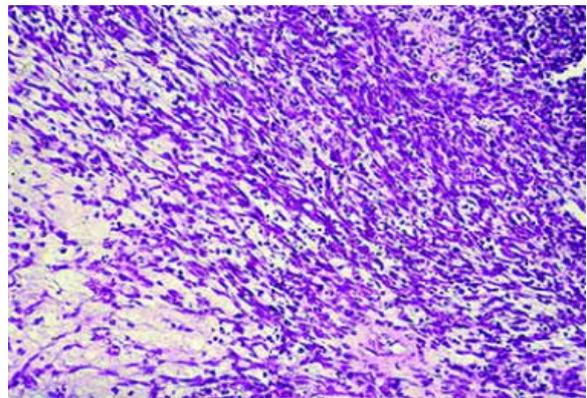


Figure 2: Aspect histologique de a) ARMS et b) ERMS, (hematoxyline-eosine, objectif: 100X).

Dr. Linda Ernst, Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

La caractérisation anatomopathologique des RMS est parfois difficile en raison de la similitude de cette entité avec d'autres petites tumeurs à cellules rondes et bleues de sarcomes osseux et de tissus mous de l'enfance, notamment les lymphomes, les ostéosarcomes à petites cellules, les chondrosarcomes méenchymateux et les sarcomes d'Ewing.

Cette classification histologique est de plus en plus remise en cause par une classification basée sur les signatures moléculaires avec notamment la présence de la translocation Pax3-7/FOXO1. Plusieurs études de séquençage de nouvelle génération à grande échelle ont en effet été effectuées sur des tumeurs de RMS [14] [15]. Ces analyses ont révélé de manière exhaustive la cartographie des mutations, des changements du nombre de copies et des réarrangements génomiques qui définissent ces tumeurs. Elles ont permis notamment de montrer que la présence ou l'absence d'un réarrangement du gène PAX3 ou PAX7 permet de distinguer les entités dites « fusion positive », plus agressives, de celles dites « fusion négative ». Le diagnostic des RMS repose donc à la fois sur l'analyse histologique mais également sur l'analyse de la présence ou l'absence d'une translocation entre les gènes PAX3 ou 7 et FOXO1 [14].

Outre l'existence de la translocation, le pronostic du RMS dépend de plusieurs facteurs, notamment de l'âge du patient au diagnostic, de la taille de la tumeur, de l'emplacement et de

la présence ou non de métastases. En général, la survie globale à cinq ans des adolescents de 15 à 19 ans est inférieure à celle des enfants (65% contre 22%). La survie globale des patients métastatiques est faible et ne dépasse généralement pas 25%. Les RMS parameningés et des membres ont généralement un pronostic plus sombre que les autres sites [16]. La plupart des cas de RMS semble être de nature sporadique, mais la maladie a été associée à des syndromes familiaux tels que la neurofibromatose et le syndrome de Li-Fraumeni (LFS) [17].

ii. Les différents sous types de RMS

Rhabdomyosarcomes embryonnaires (ERMS)

Le sous-type embryonnaire est le plus courant, avec environ 60% des cas de RMS. Ils tirent leur nom de leurs caractéristiques similaires aux cellules embryonnaires du muscle, avec parfois présence de striations rappelant celle des fibres musculaires (**Figure 2b**) et expression de gènes spécifiques du muscle comme Myogénine ou MyoD1[18]. Ils affectent généralement les enfants jeunes et sont de meilleur pronostic lorsqu'ils sont localisés. Les localisations préférentielles d'apparition des tumeurs sont les orbites, la tête, le cou et le tractus génito-urinaire.

Outre son aspect histologique, le sous type embryonnaire présente des anomalies génétiques fréquentes, telles qu'une perte d'hétérozygotie sur le chromosome 11 [19], ou des mutations dans les gènes IGF2 [20], NRAS, KRAS ou HRAS [21]. De nouveaux marqueurs sont cependant requis pour mieux stratifier les patients en groupes de risque.

Rhabdomyosarcomes alvéolaires (ARMS)

Les rhabdomyosarcomes alvéolaires (ARMS) présentent eux une ressemblance avec les alvéoles pulmonaires sur le plan histologique. Ils représentent 15-20 % des cas (**Figure 2a**).

Le sous-type alvéolaire est plus fréquent à l'adolescence. Il se développe préférentiellement sur les extrémités et est de pronostic généralement plus mauvais que le sous type embryonnaire.

Il a été démontré que le sous type ARMS présentait dans 80% des cas l'une des 2 translocations caractéristiques évoquées précédemment, impliquant le bras long du chromosome 2 et le bras long du chromosome 13, appelée t (2; 13) (q35; q14). Cette translocation fusionne le gène PAX3 (supposé réguler la transcription au début du développement neuromusculaire) avec le gène FOXO1 (un membre de la famille des facteurs de transcription forkhead) [22]. On suppose que ce facteur de transcription par fusion active de manière inappropriée la transcription de gènes qui contribuent à un phénotype transformé. Le variant t (1; 13) (p36; q14) fusionne le gène PAX7 situé sur le chromosome 1 avec FOXO1, avec des conséquences similaires [23]. Actuellement, la stratification ARMS/ERMS tend à être supplantée par la stratification des patients en RMS fusion positive (soit 80% des

ARMS) et RMS fusion négative (soit 20% des ARMS et les ERMS), plus homogène sur les plans moléculaire et clinique.

Rhabdomyosarcomes pléomorphes

Le RMS pléomorphe est le sous type prédominant chez l'adulte, les cas infantiles sont très rares [24]. L'appellation de cette tumeur est due à son aspect histologique pléomorphe: les cellules sont de tailles variables, rondes ou allongées. Le noyau est également pléomorphe, unique, ou multiple, souvent de morphologie atypique. Cette tumeur s'observe surtout au niveau des membres.

Les rhabdomyosarcomes indifférenciés/non classés

Les RMS indifférenciés/non classés sont définis par l'OMS en tant que groupe hétérogène de sarcomes sans preuve d'une différenciation particulière. C'est donc essentiellement un groupe par défaut. La plupart des RMS indifférenciés présentent une morphologie à cellules rondes et surviennent chez de jeunes patients. Morphologiquement, ils peuvent être soit à cellules fusiformes, épithélioïdes ou rondes. De nouvelles classifications moléculaires sont donc nécessaires pour catégoriser ces RMS et ainsi pouvoir mieux prendre en charge les patients.

iii. Traitements

Le traitement sera donné dans un centre où des réunions régulières (connues sous le nom de réunion de concertation pluridisciplinaire=RCP) sont organisées pour que tous les professionnels de santé impliqués dans les soins du patient puissent voir les résultats, les images, les biopsies et les évaluations pendant le traitement. Ces réunions sont nécessaires pour fournir des soins optimaux.

La chimiothérapie est la première ligne de traitement contre le RMS. Ces protocoles de chimiothérapies sont optimisés et standardisés dans le cadre de protocoles ou d'essais cliniques internationaux. Ainsi le protocole 2005 avait pour objectif de donner un traitement local et systémique homogène à l'échelle européenne, en fonction du risque de rechute chez les patients classés dans les groupes à risque faible, standard et très élevé, suivant la taille et l'emplacement de la tumeur initiale et la possibilité de la résecter chirurgicalement. L'arsenal thérapeutique inclut également une chirurgie et une radiothérapie pour les formes de haut risque.

Chirurgie

La résection chirurgicale complète dans un premier temps est actuellement recommandée si elle ne mutile pas ou n'endommage pas esthétiquement le patient. Dans les cas où la résection

complète n'est pas réalisable, une biopsie suivie d'une chimiothérapie et des mesures de contrôle local définitives sont appropriées.

Une chirurgie de seconde intention sera envisagée lors que le patient aura reçu un protocole de chimiothérapie.

Chimiothérapie

Le traitement combiné de Vincristine, Actinomycine et Cyclophosphamide (VAC) est la référence pour les RMS. Cependant, ce traitement peut être modulé suivant le grade, la taille, le site et le type de la tumeur (**Figure 3**), selon les préconisations de plusieurs études cliniques larges échelles [17].

APPENDIX. IRSG Study V risk assignments

Risk (Protocol)	Stage	Group	Site	Size	Age	Histology	Metastasis	Nodes	Treatment
Low, subgroup A (D9602)	1	I	Favorable	a or b	<21	EMB	M0	N0	VA
	1	II	Favorable	a or b	<21	EMB	M0	N0	VA + XRT
	1	III	Orbit only	a or b	<21	EMB	M0	N0	VA + XRT
	2	I	Unfavorable	a	<21	EMB	M0	N0 or NX	VA
Low, subgroup B (D9602)	1	II	Favorable	a or b	<21	EMB	M0	N1	VAC + XRT
	1	III	Orbit only	a or b	<21	EMB	M0	N1	VAC + XRT
	1	III	Favorable (excluding orbit)	a or b	<21	EMB	M0	N0 or N1 or NX	VAC + XRT
	2	II	Unfavorable	a	<21	EMB	M0	N0 or NX	VAC + XRT
	3	I or II	Unfavorable	a	<21	EMB	M0	N1	VAC (+XRT, Gp II)
	3	I or II	Unfavorable	b	<21	EMB	M0	N0 or N1 or NX	VAC (+XRT, Gp II)
Intermediate (D9803)	2	III	Unfavorable	a	<21	EMB	M0	N0 or NX	VAC ± Topo + XRT
	3	III	Unfavorable	a	<21	EMB	M0	N1	VAC ± Topo + XRT
	3	III	Unfavorable	b	<21	EMB	M0	N0 or N1 or NX	VAC ± Topo + XRT
	1 or 2 or 3	I or II or III	Favorable or unfavorable	a or b	<21	ALV/UDS	M0	N0 or N1 or NX	VAC ± Topo + XRT
	4	I or II or III or IV	Favorable or unfavorable	a or b	<10	EMB	M1	N0 or N1 or NX	VAC ± Topo + XRT
High (D9802)	4	IV	Favorable or unfavorable	a or b	≥10	EMB	M1	N0 or N1 or NX	CPT-11, VAC + XRT
	4	IV	Favorable or unfavorable	a or b	<21	ALV/UDS	M1	N0 or N1 or NX	CPT-11, VAC + XRT

Figure 3: Traitement des RMS en fonction du grade, de la taille et de la localisation de la tumeur [25].

Radiothérapie

La radiothérapie joue un rôle important dans le traitement des RMS de haut grade, en combinaison avec la chimiothérapie, afin de réduire la taille de la tumeur avant une intervention chirurgicale.

La combinaison chimiothérapie/radiothérapie est aussi souvent maintenue après la résection chirurgicale afin de parer à une rechute du patient.

Le suivi après le traitement est une composante importante des soins apportés aux enfants atteints de cancer. Le patient aura des visites de contrôle régulières, en particulier au cours des 3 premières années qui suivent le traitement. Ces visites permettent à l'équipe de soins de surveiller ses progrès, de mettre en lumière d'éventuelles séquelles et d'anticiper une rechute.

En cas de récurrence, un nouveau protocole de soins sera établi en fonction du lieu de reprise de la tumeur (récurrence locale ou métastatique), du traitement déjà appliqué, du temps passé depuis le dernier protocole de traitement. Fréquemment, le traitement pour une rechute localisée est basé sur une chirurgie alors que pour une rechute métastatique, on s'orientera plus vers un protocole chimiothérapie/radiothérapie.

Le taux de survie suite à une rechute reste mauvais pour la majorité des patients atteints de RMS. 95% des récurrences surviennent dans les trois ans suivant le diagnostic. À l'exception d'un petit groupe de patients à "risque favorable" (environ 20% des patients victimes d'une rechute), dont la survie à 5 ans est proche de 50%, la moitié des patients atteints de RMS récurrents meurent de leur maladie dans l'année suivant leur rechute et 90% des patients meurent dans les cinq ans [26].

De nouvelles thérapies sont absolument nécessaires pour ce groupe de patients. C'est dans cette optique que de nouvelles recherches sont menées afin d'identifier de nouveaux gènes dérégulés pouvant intervenir dans la tumorigénèse des RMS, avec la finalité de guérir « plus et mieux » grâce à de nouvelles thérapies ciblées.

II. Les mécanismes de la tumorigénèse

1. Le modèle d' Hanahan et Weinberg

Le modèle de Hanahan et Weinberg (**Figure 4**) définit six caractéristiques principales acquises par les cellules cancéreuses, nécessaires à l'initiation tumorale et à la formation de métastases, et qui constituent aujourd'hui le fondement de la compréhension de la biologie des cancers [27],[28].

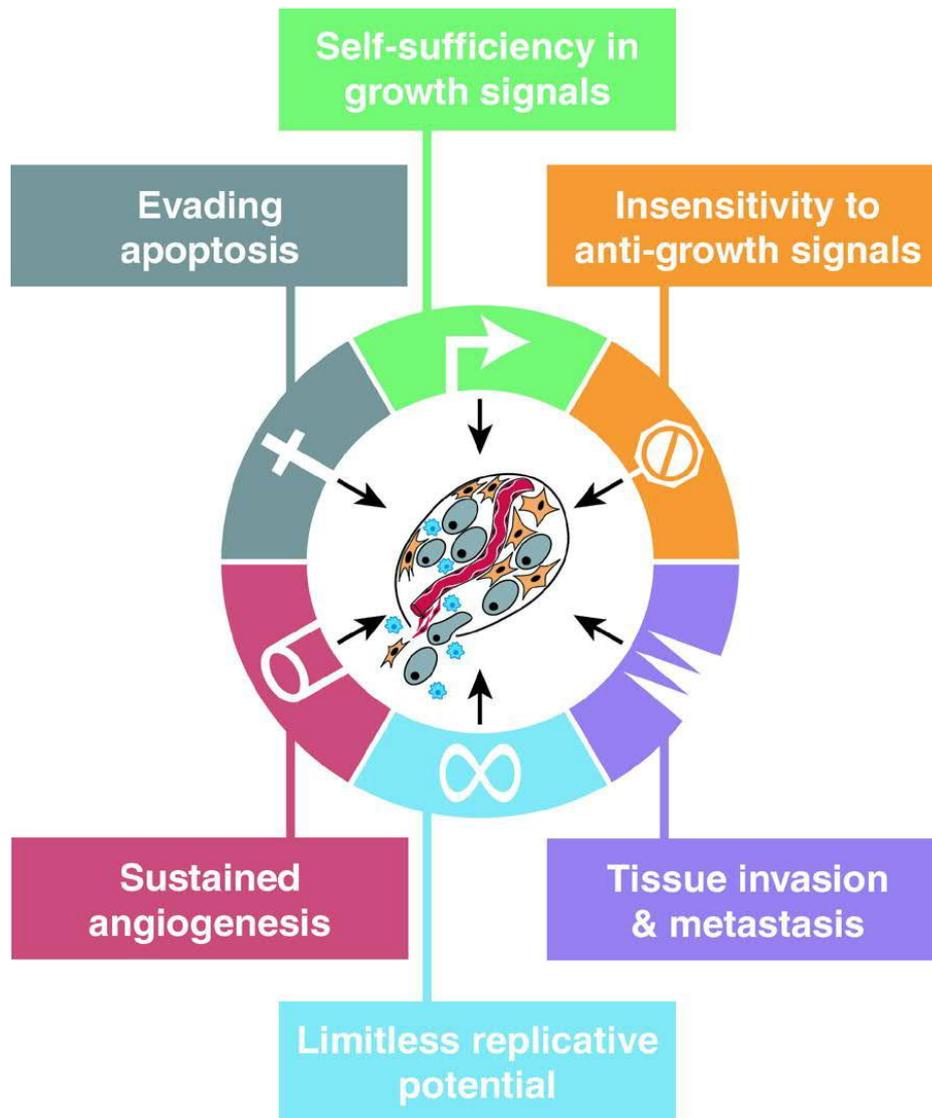


Figure 4: Modèle de Hanahan et Weinberg présentant les six caractéristiques majeures acquises par les cellules cancéreuses au cours de l'échappement [27]

a. Les mécanismes de l'échappement tumoral

Le maintien d'un état constant de prolifération

Contrairement aux tissus normaux, qui contrôlent la production et la sécrétion de facteurs de prolifération, permettant ainsi la conservation du nombre de cellules et le maintien de l'architecture des tissus, les cellules tumorales ont acquis la capacité de proliférer *via* différents mécanismes :

- la surproduction de facteurs de croissance, résultant en une stimulation autocrine de la prolifération.

- la stimulation, *via* différents facteurs, des cellules du stroma qui, en retour, peuvent sécréter des facteurs de croissance favorisant la croissance tumorale.
- l'augmentation du niveau d'expression des récepteurs, rendant les cellules hypersensibles aux facteurs de croissance.
- des modifications dans la structure des récepteurs, rendant leur signalisation indépendante du ligand.
- l'activation constitutive de composants de voies de signalisation contrôlant la prolifération.

L'insensibilité aux signaux antiprolifératif:

Différents signaux antiprolifératifs permettent de maintenir la quiescence cellulaire et l'homéostasie. Ces signaux sont capables de bloquer la prolifération suivant deux mécanismes : les cellules peuvent être bloquées dans le cycle cellulaire en phase G0 ou entrer en phase post-mitotique. Les cellules cancéreuses ont donc acquis la capacité d'échapper à ces signaux antiprolifératifs.

La résistance à la mort cellulaire :

Les cellules cancéreuses sont capables d'échapper à la mort cellulaire programmée, normalement mise en place lorsqu'elles subissent d'importants stress, tels que l'activation d'oncogènes ou les dommages à l'ADN.

L'acquisition d'une immortalité réplivative :

Les cellules normales sont soumises à un nombre limité de cycles de prolifération et de division. On distingue alors deux barrières à la prolifération des cellules : la sénescence (entrée de la cellule dans un état non prolifératif) et la mort cellulaire. Les cellules cancéreuses sont donc capables de se soustraire à ces 2 mécanismes de contrôle et de se diviser de façon illimitée, on parle alors d'immortalisation.

L'induction de l'angiogenèse :

L'apport d'oxygène et de nutriments, ainsi que l'évacuation des déchets métaboliques et du dioxyde de carbone, est nécessaire à la survie des cellules. Cette fonction est assurée dans les tissus normaux par la vascularisation. Les cellules tumorales sont capables de détourner les mécanismes d'angiogenèse pour favoriser la formation d'une néo-vascularisation, nécessaire à leur prolifération/dissémination.

L'invasion et la formation de métastases :

Les cellules tumorales ont la capacité d'envahir le tissu adjacent mais également de former des métastases à distance du site initial de la tumeur. Ce processus comporte différentes étapes:

- l'invasion locale, caractérisée par la perte d'adhésion des cellules et l'augmentation de leur mobilité.

- l'intravasation des cellules dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et leur transit.
- l'extravasation des cellules dans le parenchyme du tissu.
- la formation de micro-métastases.
- la colonisation du tissu, *via* la prolifération.

Deux caractéristiques sont venues plus récemment compléter ce modèle [28] (**Figure 5**) :

La reprogrammation du métabolisme cellulaire

Afin de lui permettre de soutenir une prolifération cellulaire continue, le métabolisme de la cellule tumorale est modifié, glissant notamment vers un métabolisme glycolytique.

L'échappement au contrôle du système immunitaire.

Ce dernier est en effet supposé reconnaître et éliminer la majorité des tumeurs naissantes. Ainsi, les cellules cancéreuses ont acquis la particularité d'échapper à la surveillance du système immunitaire et en particulier à la destruction par les lymphocytes et les macrophages.

b. Les caractéristiques acquises par les cellules tumorales

La cellule tumorale a donc acquis des propriétés de survie, de prolifération et de dissémination. Ceci a été possible *via* l'acquisition de deux particularités :

L'augmentation de l'instabilité génomique et des mutations

L'acquisition des différentes caractéristiques des cellules tumorales dépend largement de l'apparition d'une succession d'altérations du génome. Ces modifications peuvent être l'apparition de mutations conférant un avantage sélectif et/ou la régulation de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et/ou d'oncogènes par modification épigénétique telles que la méthylation de l'ADN et/ou la modification des histones.

La promotion de l'inflammation

L'infiltration des cellules immunitaires est observée dans la majorité des tumeurs. Cette inflammation contribue à l'acquisition des caractéristiques tumorales en favorisant la sécrétion de nombreux facteurs de survie, de facteurs pro-angiogéniques et d'enzymes ciblant la matrice extracellulaire.

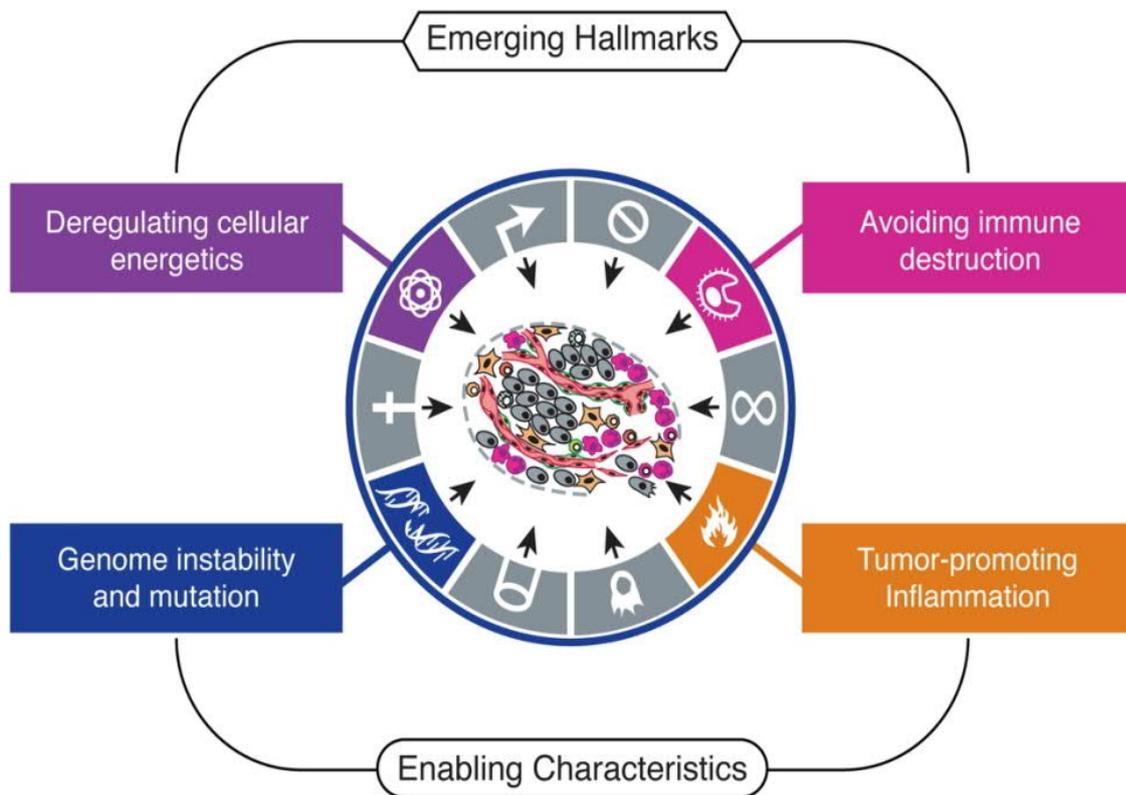


Figure 5: Nouveau modèle de Hanahan et Weinberg, présentant les 4 caractéristiques supplémentaires nécessaires à l'échappement tumoral [28].

2. Tumorigénèse et résistance à la mort cellulaire

a. Historique

Dès l'antiquité, Claude Galien, médecin grec, observa que certaines structures embryonnaires comme le canal artériel, permettant au sang de l'artère pulmonaire de rejoindre l'aorte sans passer par les poumons, disparaissaient après la naissance (Biologie de la mort, Klarsfeld et Revah). A l'époque, la notion de cellule n'existe pas encore et il fallut attendre 1839 et la « théorie cellulaire », l'avènement de la microscopie ainsi que l'invention des premiers microtomes pour que les biologistes fassent le lien entre la régression de certaines structures et la mort cellulaire. Dès la première moitié du 19^e siècle, la mort cellulaire, particulièrement dans le cadre de la métamorphose animale des Insectes et des Amphibiens commença à être évoquée. En 1842, Carl Vogt observa chez le crapaud *Alytes obstetricans* que les cellules de la notochorde étaient « détruites » et « disparaissaient » pour être remplacées par les cellules cartilagineuses adjacentes proliférant. En 1863, August Weisman nota que chez la puppe de diptère, différentes structures larvaires se résorbaient pendant la métamorphose et que de nombreuses cellules mourraient dans le système nerveux. Il baptisa ce phénomène l'histolyse [29].

A l'échelle cellulaire, apparaissent dans la bibliographie les premières descriptions morphologiques de cellules mortes : Gomez et Pike observent dans les cellules nerveuses une dégradation de la chromatine, une vacuolisation, une fracture du protoplasme, le gonflement ou encore un « effondrement » de la cellule par exemple après une période d'anémie dans le système nerveux central [30]. Ces premières analyses ne correspondent pas en réalité à un type de mort cellulaire unique mais recouvrent l'ensemble des différents types de mort cellulaire connues à ce jour et notamment la nécrose, l'apoptose et même la mort autophagique. La nécrose est une mort cellulaire rapide et dégénérative permettant de convertir une cellule en un amas de débris. C'est cette série de réactions, donnant lieu à une morphologie tissulaire altérée, qui a été caractérisée par les pathologistes depuis des siècles sous l'angle de ces manifestations macroscopiques telles qu'un exsudat noir ou l'apparition d'un membre gangréneux. Dans les années 1962 à 1964, John Kerr commença à distinguer un type de mort différent de la nécrose. Il observa en effet dans la glande surrénale de rat, un processus affectant des cellules isolées et sans inflammation, laissant les organelles comme les mitochondries intactes, autrement dit, contrairement à la nécrose, une mort discrète. Grâce à la microscopie électronique, il décrivit ce qu'il qualifia alors de « nécrose contractile », caractérisée par une condensation du cytoplasme et de la chromatine ainsi que la formation des corps apoptotiques [31]. De plus en plus d'exemples de l'implication de ce type de mort dans l'homéostasie des tissus sont alors répertoriés à cette époque-là, rassemblés sous le terme de « nécrobiose », mort physiologique particulièrement conservatrice puisqu'elle peut être massive sans endommager les tissus.

Ce n'est que plus tard qu'elle prendra son terme définitif d' « apoptose », du grec apo- (loin) et ptosis (tomber), faisant référence à la chute des feuilles en automne ou des pétales de fleurs [31]. A la même époque, Schweichel et al., décrivent au cours du développement, un dernier type de mort cellulaire caractérisée par la formation de vacuoles [32]. C'est la première description de la mort par autophagie qui se caractérise par l'apparition de larges vésicules intracellulaires et un engagement de la machinerie autophagique.

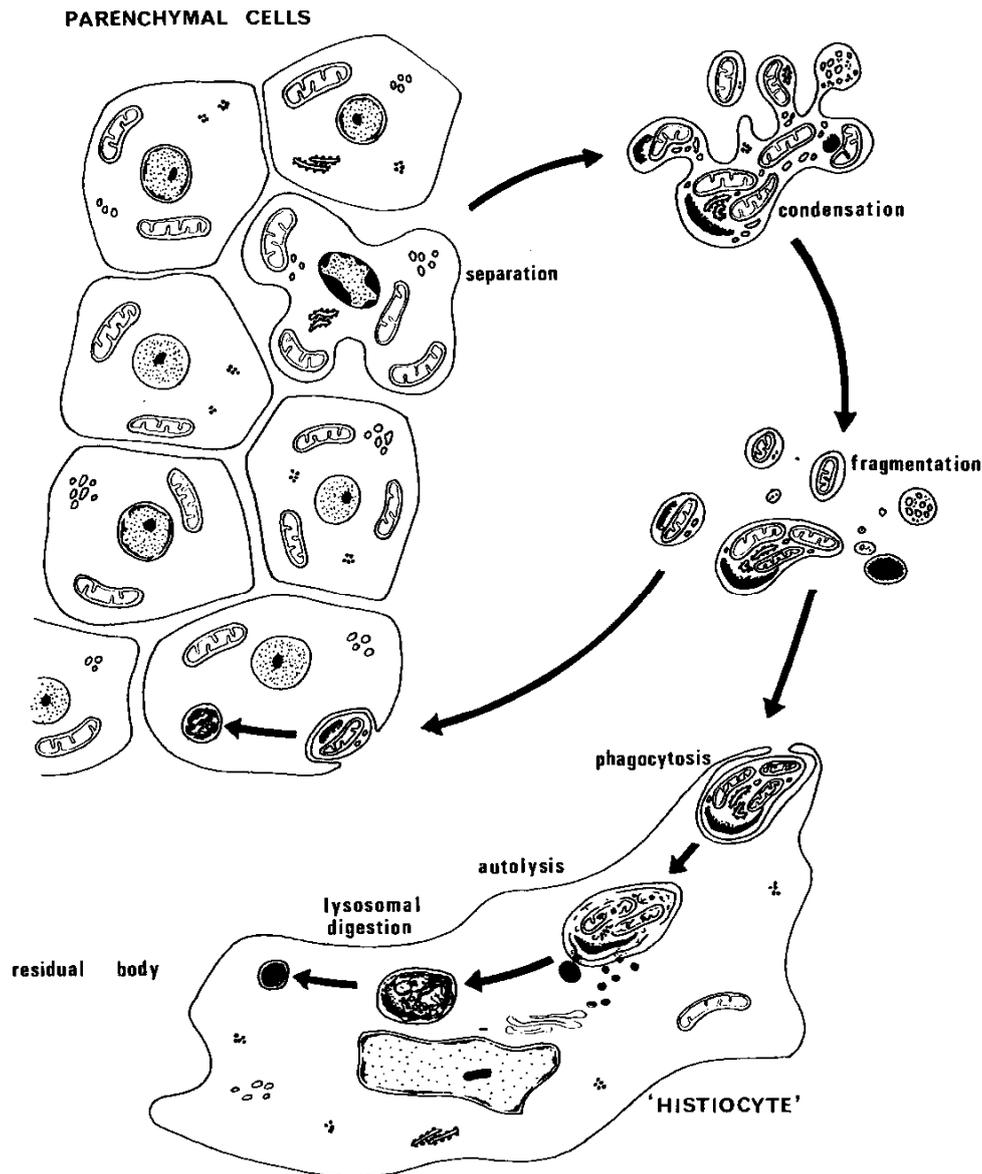


Figure 6: Caractérisation morphologique de l'apoptose, extraite de l'article de Kerr, Wyllie et Currie (1972).

Ce type de mort cellulaire se caractérise tout d'abord par une dissociation des cellules les unes des autres, une condensation du cytoplasme suivie d'une fragmentation formant ainsi les corps apoptotiques. Ces derniers seront éliminés par phagocytose.

b. Les différents types de mort cellulaire programmée : manifestations et mécanistique

i. Généralités

La mort cellulaire programmée est le processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal extérieur, *via* l'activation d'une cascade de signalisation interne. En équilibre constant avec la prolifération cellulaire, elle permet le

maintien de l'homéostasie et joue un rôle important dans des processus normaux, tels que le développement, mais également pathologiques, tels que les cancers. On distingue principalement trois types de mort programmée : la nécrose, l'autophagie et l'apoptose (**Figure 7**) [33].

- l'apoptose, souvent confondue avec le terme de « mort programmée », a été définie par Kerr et al en 1970, par un changement morphologique des cellules aboutissant à leur élimination. Elle se caractérise par une condensation de la chromatine et la fragmentation du noyau et s'accompagne d'un arrondissement des cellules et d'une réduction de leur volume alors que la membrane cellulaire reste intacte.
- l'autophagie est le processus par lequel une cellule peut dégrader une partie de son cytoplasme et des organelles cellulaires, tels que les ribosomes ou la mitochondrie, par digestion au sein de ses propres lysosomes et dans le but de recycler la matière libérée pour son métabolisme de base. Ce phénomène a lieu le plus souvent dans des conditions de carence en nutriments et peut aboutir à la mort cellulaire qualifiée alors de mort autophagique si le stress se prolonge.
- la nécrose est caractérisée par un gain du volume cellulaire entraînant la cassure de la membrane plasmique et la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extérieur. Longtemps considérée comme un événement accidentel, il a été démontré que certaines formes de nécrose sont des mécanismes régulés et programmés, comme la nécroptose par exemple [34]. Contrairement à l'autophagie et à l'apoptose, elle s'accompagne d'une réponse inflammatoire, suite au relargage de chimiokines (CXCL1, CXCL2) et de cytokines (TNF, Il1 et Il6) dans le milieu extracellulaire.

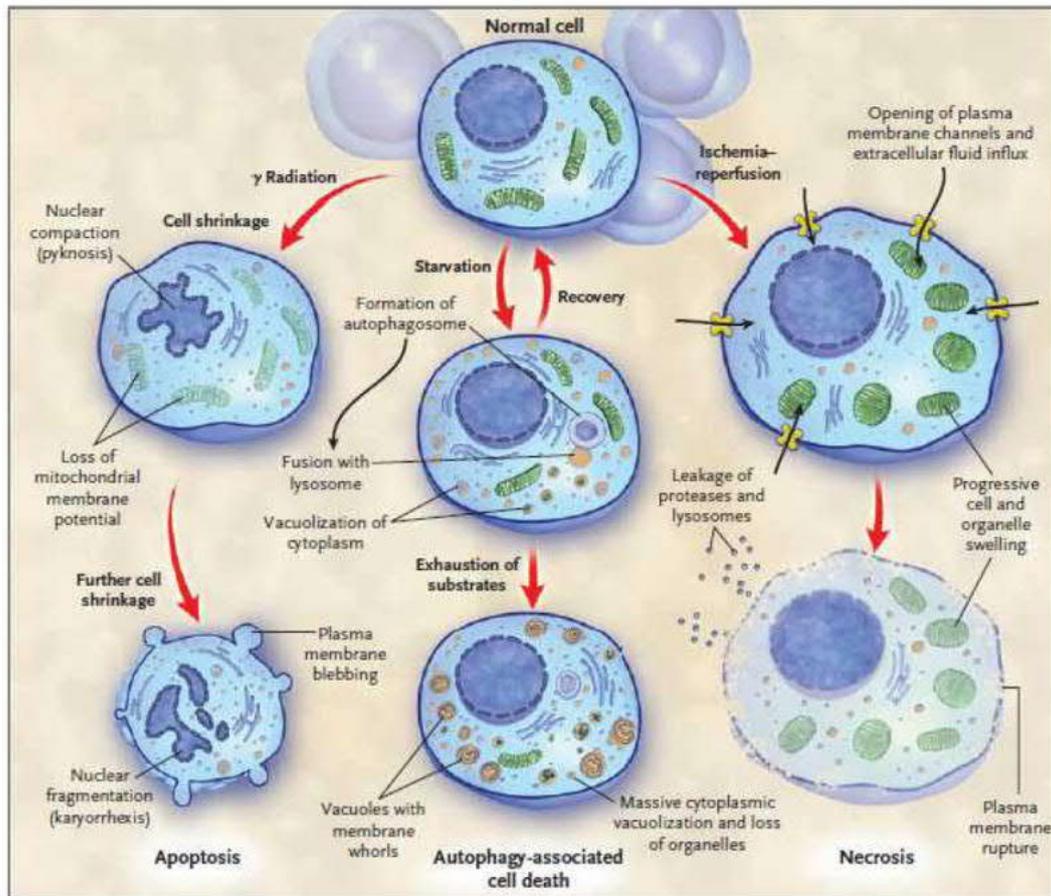


Figure 7 : Les trois principaux types de mort cellulaire : apoptose, autophagie et nécrose.

Les changements morphologiques induits par ces trois types de mort cellulaire suite à divers stimuli sont représentés. L'apoptose est caractérisée par le rétrécissement de la cellule et le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique. La nécrose à l'inverse fait intervenir une perméabilisation précoce de la membrane plasmique qui provoque une lyse de la cellule [35].

ii. Apoptose : Rôle et mécanismes

Présentation générale

L'apoptose a longtemps été confondue avec le terme de mort cellulaire « programmée ». Sous le microscope, l'apoptose se caractérise par un arrondissement de la cellule et un détachement de la matrice extracellulaire (MEC). Ces événements, dus notamment à un remodelage du cytosquelette, sont associés à un bourgeonnement de la membrane plasmique, sur laquelle apparaissent des protrusions.

Au niveau nucléaire, on observe une condensation du noyau et de la chromatine, appelée pycnose, qui est irréversible. L'ADN est ensuite fragmenté par une enzyme, la protéine CAD (Caspase Activated DNase), qui clive cette molécule aux endroits où elle est accessible, entre les nucléosomes. La cellule se fragmente alors en « corps apoptotiques », toujours reliés à la membrane plasmique et contenant des organelles cytoplasmiques, des fragments nucléaires et

autres débris cellulaires [36]. Les phosphatidylsérines, en temps normal exposées sur la face interne de la membrane plasmique, vont être basculées du côté externe ce qui envoie un signal aux cellules environnantes. Les corps apoptotiques générés peuvent alors être digérés par des cellules du système immunitaire, les macrophages, ou par les cellules épithéliales alentour, ce qui permet à la fois d'éviter une réaction inflammatoire et de recycler les composants organiques de la cellule mourante.

Mécanisme de l'apoptose

On distingue principalement deux grandes voies apoptotiques convergeant vers l'activation de protéines centrales de l'apoptose : les caspases (Cystéin Aspartyl Protéases). Il s'agit de la voie mitochondriale, ou voie intrinsèque, et de la voie des récepteurs de mort, ou voie extrinsèque (**Figure 8**).

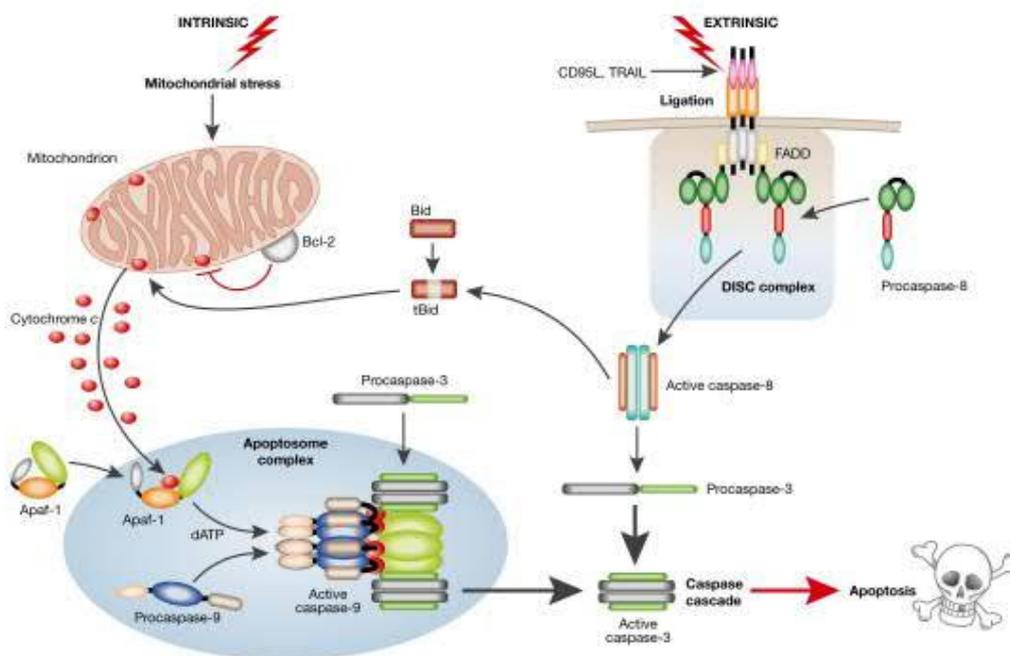


Figure 8: Schéma des deux principales voies d'apoptose (voie intrinsèque et voie extrinsèque).

Dans la voie extrinsèque, l'activation des récepteurs de mort transmembranaires de la superfamille des TNF-R par leur ligand, entraîne l'activation de la caspase 8 suite à la formation du complexe DISC par l'intermédiaire de la protéine FADD. Dans la voie intrinsèque, l'apoptose induite par des stress entraîne une perturbation de la perméabilité des mitochondries et la libération de protéines, telles que le cytochrome c. La libération du cytochrome c par les mitochondries est régulée en partie par les membres de la famille Bcl2, avec des membres anti-apoptotiques (Bcl2/Bcl-XL/Mcl1) et pro-apoptotiques (BAX, Bak et tBid). Une fois libéré, le cytochrome c se lie à Apaf1 et la caspase 9, ce qui entraîne la formation de l'apoptosome. Les caspases 8 et 9 activées déclenchent l'activation des caspases 3, 6 et 7. Elles sont responsables du clivage d'importants substrats cellulaires entraînant les modifications biochimiques et morphologiques classiques associées au phénotype apoptotique [37].

Les caspases sont donc le dénominateur commun des différentes voies apoptotiques. Elles peuvent être initiatrices ou exécutrices de ce programme de mort cellulaire selon leur position dans la voie de signalisation. Toutes les caspases ne sont pas uniquement dévolues à l'apoptose mais elles peuvent aussi contribuer à la signalisation de l'inflammation (**Figure 9**). On retrouve dans le génome humain 11 gènes codant pour des caspases. Les deux voies de signalisation apoptotique, intrinsèque ou extrinsèque, conduisent toutes deux à la mort cellulaire par activation de ces cystéines protéases, qui participent au démantèlement cellulaire en clivant les protéines.

Les caspases contiennent côté N-terminal un domaine caractéristique, le domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) ou le domaine DED (Death Effector Domain) puis, en progressant du côté C-terminal, une sous-unité large p20 et une sous-unité courte p10. Les caspases 1, 4, 5, 11 et 12 sont des caspases pro-inflammatoires régulant la maturation des cytokines.

Les caspases impliquées dans l'apoptose peuvent quant à elles être divisées en deux catégories :

- les caspases initiatrices (2, 8 et 9), qui sont activées en début d'apoptose. Ces caspases sont très spécifiques et possèdent seulement quelques substrats chacune, en plus de leur capacité à cliver des caspases effectrices ;
- les caspases effectrices (3, 6 et 7), clivées et activées par les caspases initiatrices (sauf pour la caspase 6 qui peut être clivée par la caspase 3 et 7) qui vont à leur tour pouvoir cliver leurs substrats respectifs, conduisant à la phase finale de l'apoptose et donc au démantèlement de la cellule. Elles sont notamment responsables de la fragmentation de l'ADN en activant la protéine CAD par clivage de son inhibiteur iCAD [38].

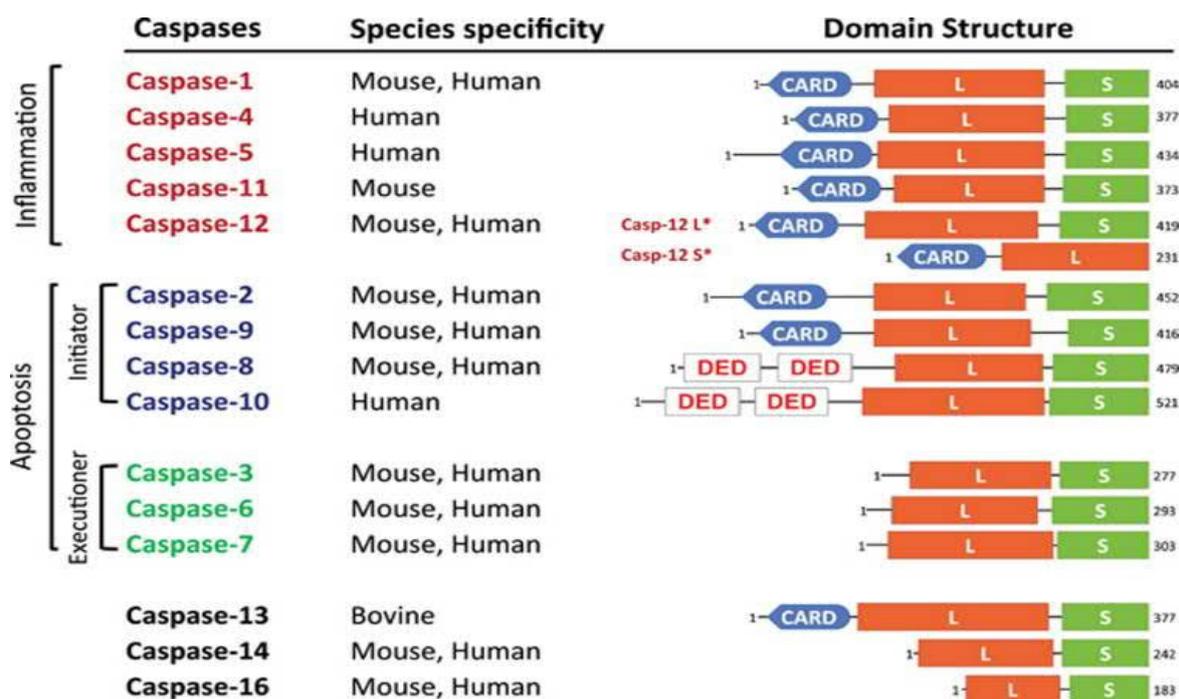


Figure 9: Schéma représentatif des caspases humaines et de leurs fonctions [38].

Les domaines CARD et DED permettent aux caspases d'être recrutées sur les complexes d'initiation. On distingue les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10), les caspases effectrices (3, 6 et 7) et les caspases pro-inflammatoires (1, 4, 5, 11 et 12).

La voie extrinsèque

Elle résulte de l'activation de récepteurs membranaires appelés récepteurs de mort, et qui font partie de la superfamille des récepteurs au TNF [35]. Cette superfamille est composée de 8 membres (TNF-R1, Fas, DR3, DR6, TRAIL-R1, TRAIL-R2, EDAR et p75), leur caractéristique commune étant la présence, dans leur région intracellulaire, d'un domaine de mort Death Domain (DD) capable d'induire une cascade apoptotique après fixation de leur ligand respectif (TNF α , FasL, APO3L, TRAIL) [39]. Le fonctionnement de cette voie peut être illustré par la signalisation induite par le récepteur de mort TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 en réponse à leur ligand spécifique TRAIL.

La liaison du ligand TRAIL au récepteur TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 entraîne une oligomérisation des récepteurs, le recrutement de la protéine Fas-Associated protein with Death Domain (FADD) et de la caspase 8 pour former un complexe protéique de signalisation (DISC). Les protéines inhibitrices des protéases (IAPs), CARP1 et 2, et c-FLIP peuvent inhiber cette voie en formant un complexe inhibiteur avec la caspase 8. Lors de la formation du DISC, la caspase 8 est clivée et activée. A ce stade-là, deux voies de mort peuvent être enclenchées suivant le type cellulaire comme l'a décrit Scaffidi [40]. La première signalisation dans les cellules de type 1 conduit au clivage direct de la caspase 3 ; la seconde, dans les cellules de type 2, déclenche le clivage de protéine BID. Une fois clivée BID peut se lier aux protéines pro-apoptotiques BAX et BAK, entraînant une

perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération des protéines mitochondriales, cytochrome c et DIABLO. Le cytochrome c libéré se lie alors à APAF1 et à la caspase 9 pour former l'apoptosome, ce qui va entraîner le clivage et l'activation de la caspase 9, déclenchant celui de la caspase 3 et ainsi la mort de la cellule. DIABLO quant à lui va lever l'inhibition des caspases en se liant aux inhibiteurs de l'apoptose (IAPs). La caspase 3 peut également cliver et activer la caspase 8, amplifiant ainsi le signal apoptotique [41] (**figure 10**).

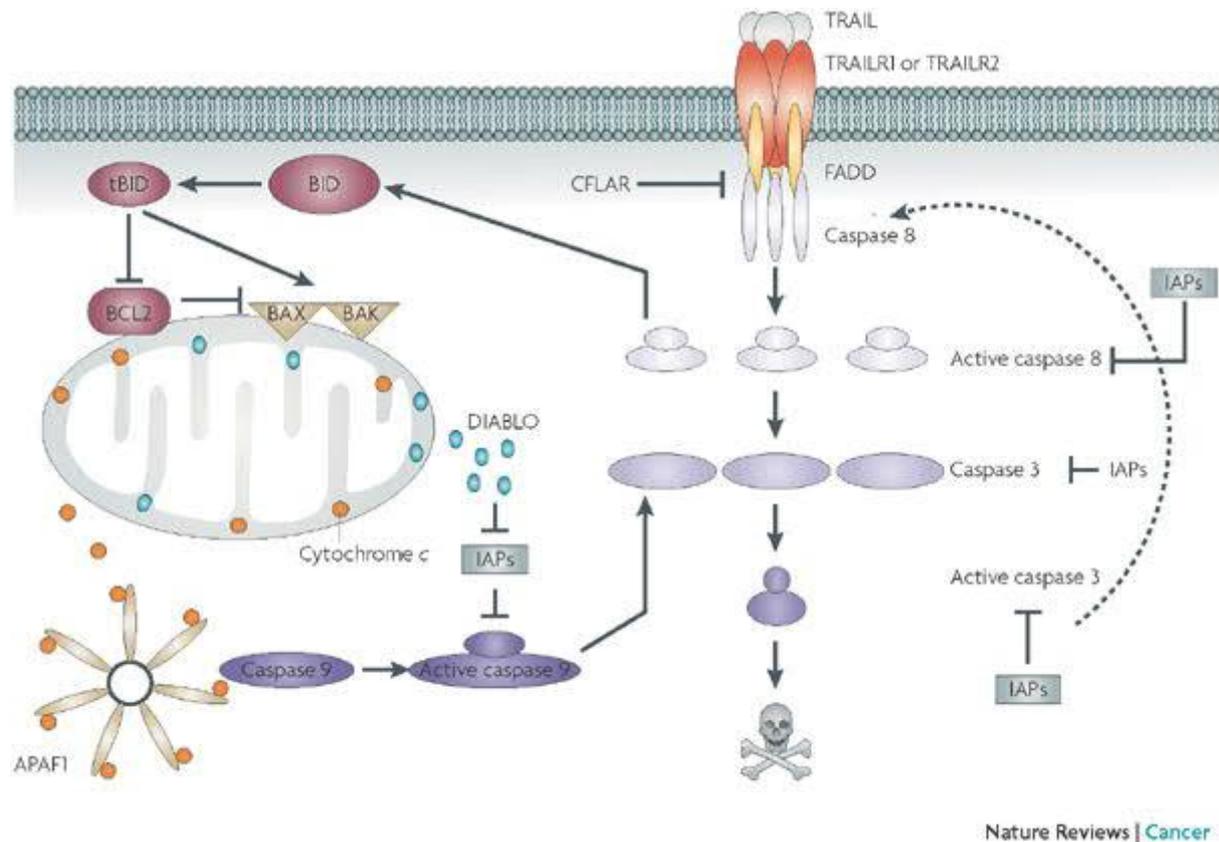


Figure 10: La signalisation apoptotique de TRAIL-R1 ET TRAIL-R2.

La liaison de TRAIL au récepteur TRAIL-R1 ou à TRAIL-R2 entraîne l'oligomérisation du récepteur ainsi que le recrutement de la protéine FADD et de la caspase 8 pour former le complexe DISC. Lors de la formation du DISC, la caspase 8 est clivée et activée, ce qui lui permet à son tour de cliver et d'activer la caspase 3 directement, ou indirectement via la protéine BID. BID active et clivée (tBID) peut se lier aux protéines BAX et BAK, entraînant une perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome c et de la protéine DIABLO. Le cytochrome c, APAF1 et la caspase 9 vont se lier pour créer l'apoptosome, ce qui entraîne le clivage et l'activation de la caspase 9, qui peut alors cliver la caspase 3. DIABLO supprime l'inhibition de l'activité des caspases par les IAP [41].

La voie intrinsèque ou mitochondriale

La voie mitochondriale est déclenchée en réponse à différents types de stress incluant les dommages à l'ADN, la surexpression d'oncogènes, la carence en facteurs de croissance ou en oxygène. L'organe principale de cette voie de mort, comme l'indique son nom est la

mitochondrie, qui reçoit et intègre en permanence les stimuli pro- et anti-apoptotiques. L'induction de l'apoptose débute par la libération de différents facteurs pro-apoptotiques liée à une modification de la perméabilité membranaire mitochondriale. La perméabilité de la membrane mitochondriale est régulée par les protéines de la famille Bcl-2. Dans cette famille, on retrouve :

- les protéines pro-apoptotiques (BAX, BAK), s'enchâssant en pores multimériques dans la membrane mitochondriale après activation par les protéines activatrices de la famille BH3 (Bid, Bim et Puma). En réponse à un stimulus apoptotique, Bid, Bim et Puma sont activées et provoquent, par interaction directe, un changement de conformation de BAX et BAK qui vont alors migrer et s'enchâsser dans la membrane mitochondriale externe.
- les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, MCL-1), qui inhibent l'apoptose en séquestrant les BH3 activatrices.

En fonction de l'équilibre entre homo et hétérodimérisation de ces protéines, la balance est en faveur ou non de l'engagement au sein du processus apoptotique [42]. Comme pour la voie extrinsèque des cellules de type 2, lorsque la membrane est perméabilisée, le cytochrome c est relargué à l'extérieur de la mitochondrie, déclenchant la liaison avec APAF1 et la caspase 9 pour créer l'apoptosome aboutissant au clivage de la caspase 9. Cette activation de la caspase 9 puis des caspases 3 et 7, conduisent au démantèlement de la cellule [43]. Il est à noter que cette voie est notamment régulée positivement par le suppresseur de tumeur p53 (considéré comme le « gardien du génome », puisqu'il contribue à la stabilité génomique en induisant l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire après des dommages à l'ADN) et négativement par les protéines tyrosine kinase PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase)/Akt et MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase).

iii. L'autophagie

Présentation générale

L'appellation autophagie regroupe un ensemble de mécanismes cataboliques aboutissant à la dégradation de constituants cellulaires par les lysosomes [44] notamment en cas de carence en nutriments, d'accumulation d'agrégats protéiques, d'absence de facteurs de croissance ou d'hypoxie.

Le terme « mort par autophagie » est cependant controversé car certains décrivent l'autophagie comme un phénomène secondaire, accompagnant la mort cellulaire en cas de stress dans une tentative de survie plutôt que comme un élément déclencheur de la mort cellulaire. En effet, dans la plupart des cas, l'autophagie reste un mécanisme de survie et son blocage entraîne une augmentation de la mort cellulaire. Les cellules de Mammifères invalidées pour les protéines clés de l'autophagie, présentent une mort cellulaire plus importante en cas de stress induit par un retrait de facteurs de croissance ou une carence en sérum [45].

Elle joue également un rôle majeur dans l'immunité puisqu'elle permet la dégradation des pathogènes intracellulaires et la génération de peptides pouvant être présentés au Complexe Majeur d'Histocompatibilité. La séquestration des organites a lieu dans des vacuoles à double membrane, les autophagosomes, qui fusionnent après leur formation avec les lysosomes cytoplasmiques, formant ainsi les autolysosomes.

Il existe cependant de plus en plus de situations dans lesquelles il a été montré que la machinerie autophagique peut aboutir à la mort cellulaire *via* la voie PI3K/TOR[46]

Mécanismes de l'autophagie

Le déclenchement de l'autophagie est régulé par deux protéines au fonctionnement antagoniste. Dans un contexte cellulaire « normal », mTORC1 va inhiber la formation du complexe de pré-initiation de l'autophagie, composé des protéines ULK1, FIP200 et Atg13. En revanche, en cas de stress métabolique et notamment de manque d'ATP, mTORC1 est inhibée alors que la protéine AMPK est activée ce qui favorise la formation du complexe de pré-initiation. Ce dernier stimule la formation du complexe d'initiation contenant les protéines Beclin-1, Vps34 et Vps15. L'autophagie est enclenchée et commence par la formation du phagophore, structure à double membrane en forme de demi-lune qui se formerait, d'après le consensus actuel *de novo* à partir de membranes du réticulum endoplasmique. Vont ensuite se dérouler une suite d'événements séquentiels faisant intervenir les protéines de la famille ATG spécifiques de l'autophagie permettant l'élongation puis la fermeture du phagophore, donnant ainsi naissance à l'autophagosome. L'étape ultime est la fusion de l'autophagosome avec un lysosome formant alors un autolysosome, dans lequel le matériel séquestré va être dégradé puis relargué dans le cytoplasme afin de servir à de nouveaux processus cellulaires comme la production d'énergie [45] (**Figure 11**). Dans certains cas, l'autophagie semble indispensable à la mort de la cellule. Lors du développement larvaire chez la Drosophile, une destruction de tissus endoréplicatifs est observée. Au cours de leur disparition, ces cellules présentent une morphologie autophagique [47]. Dans les cellules cancéreuses mammaires humaines MCF-7, l'antiœstrogène tamoxifène induit une mort autophagique [48], sans signature moléculaire ni morphologique de l'apoptose. Il est intéressant de noter que les protéines décrites dans un contexte où l'autophagie va être enclenchée pour favoriser la survie, comme en cas de manque de nutriments, sont les mêmes que celles décrites dans les cas de mort autophagique (ATG5, ATG6 et ATG7). La différence réside plutôt dans leur niveau et leur cinétique d'expression [49].

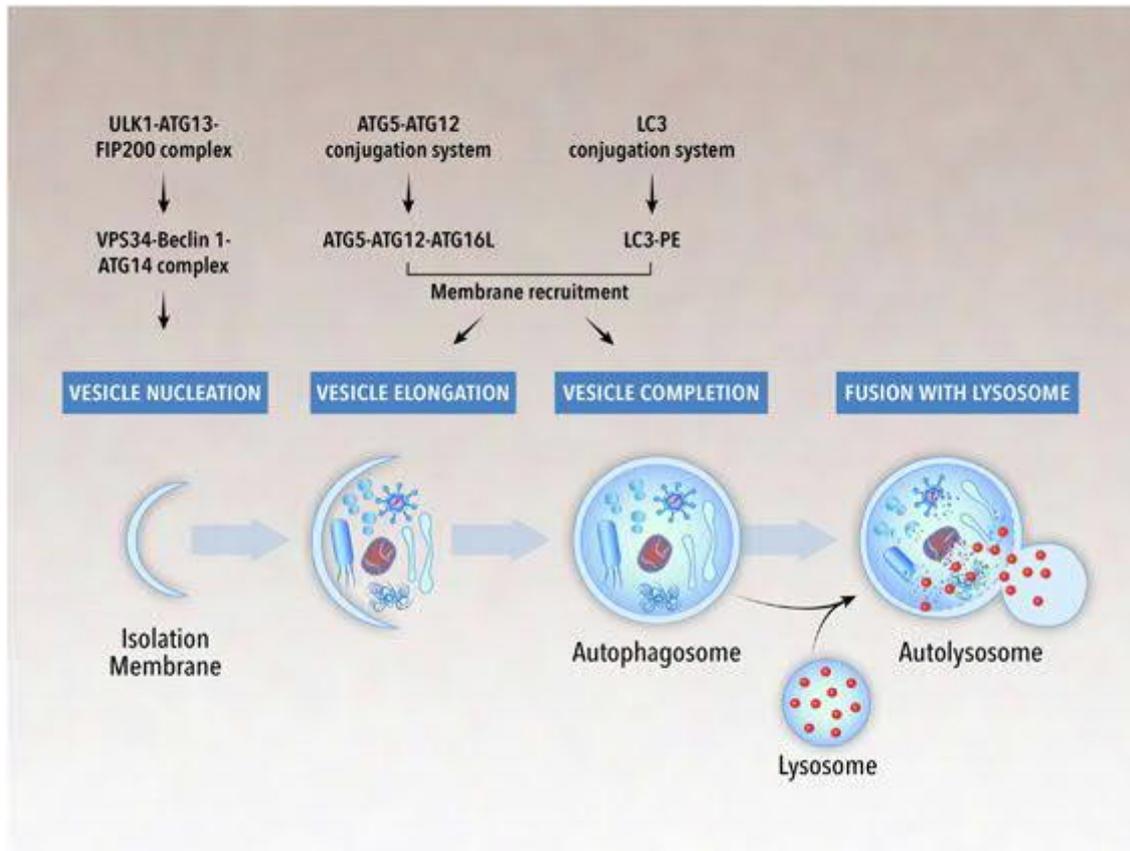


Figure 11: La voie de signalisation autophagique, sous stress métabolique [50].

L'autophagie est un processus catabolique au cours duquel des organites cellulaires endommagés ou redondants, ou des agents pathogènes exogènes sont dégradés par les autophagosomes. La formation de l'autophagosome comprend la formation du phagophore, son allongement et son achèvement, qui sont étroitement régulés par diverses protéines liées à l'autophagie, dont certaines sont énumérées dans la figure. L'autophagosome mature fusionne ensuite avec le lysosome pour former un autolysosome. À l'intérieur de l'autolysosome, le contenu séquestré est dégradé.

iv. La nécrose

Présentation générale

Le mot "nécrose" vient du grec *nekros* qui signifie "mort" ou "mortification".

La nécrose est caractérisée par un gonflement des cellules avec rupture de la membrane plasmique. Il y a par conséquent un rapide efflux des constituants cytoplasmiques dans l'espace extracellulaire, déclenchant une forte réponse inflammatoire. A l'origine, l'apoptose était seule qualifiée de mort programmée, par opposition à la nécrose. Cette distinction est cependant devenue obsolète, avec l'identification de signaux inducteurs déclenchant certaines formes de nécrose. La nécrose n'est donc plus considérée comme un phénomène passif sans activation de voies de signalisation particulières, puisqu'elle met en jeu de nombreuses voies moléculaires, notamment dans les cas où l'intégrité de la cellule est perturbée (haute température, stress mécanique). Différents stimuli peuvent déclencher la nécrose comme les

cytokines, les pathogènes divers (virus, bactéries, protozoaires), les toxines, l'augmentation du stress oxydatif (production d'espèces oxygénées réactives ou ROS) ou les cellules immunitaires (lymphocytes Natural Killer, macrophages). Deux formes de nécrose programmée ont été particulièrement étudiées : la nécroptose et plus récemment la ferroptose.

Mécanisme de la nécroptose

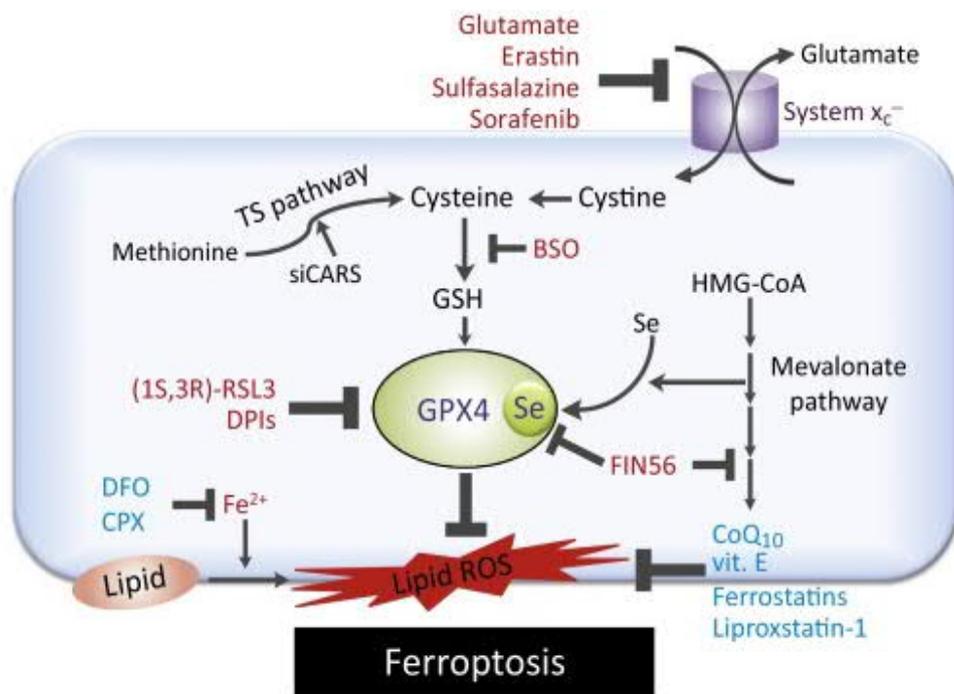
La présence d'un ADN viral double brin ou d'ADN endommagé peut permettre l'engagement de la cellule dans un processus qualifié de nécroptotique. Les récepteurs de mort TRAIL-R, Fas ou TNFR1, comme pour l'apoptose, peuvent déclencher la nécroptose et converger vers l'activation de la Receptor-interacting serine/threonine-protéine kinase 3 (RIP3). Les récepteurs immunitaires Toll-like ainsi que les récepteurs des lymphocytes T (TCR, T-Cell Receptor) peuvent également l'activer [51]. L'activation de RIP3 peut avoir lieu grâce au recrutement par les récepteurs de mort d'une plateforme multiprotéique baptisée RIPoptosome ou nécrosome, en écho à l'apoptosome. L'activation de RIP3 dépend de l'activité kinase de RIP1 [52], qui peut être inhibée par la nécrostatine-1 [53]. Les intervenants situés plus en aval dans la signalisation nécroptotique ne sont pas encore clairement identifiés même s'ils dépendent vraisemblablement de la perméabilisation de la membrane pour MLKL. Des études montrent que la mitochondrie serait impliquée dans la nécroptose. En effet, lors de la nécroptose, il y a une augmentation de la production de ROS responsables entre autres de la peroxydation lipidique des membranes. La peroxydation lipidique a pour conséquence d'augmenter la perméabilité de la membrane mitochondriale, ce qui permet le relargage du facteur AIF qui va pouvoir entrer dans le noyau et cliver l'ADN. Il a été démontré que l'augmentation de la production de ROS mitochondriaux est due à une dysfonction mitochondriale induite lors de la nécroptose [54].

Mécanisme de la Ferroptose

La ferroptose est l'une des dernières voies de mort cellulaire décrites. Dans les cellules exposées aux inducteurs de ferroptose comme par exemple l'éraستine, des perturbations majeures du métabolisme redox engendrent des altérations de la perméabilité membranaire et une perte de viabilité cellulaire. La peroxydation massive des lipides de la membrane plasmique est l'étape biochimique essentielle de la ferroptose.

Les principales espèces réactives de l'oxygène produites par le métabolisme cellulaire sont l'anion radical superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence de traces de fer libre, les ROS sont susceptibles d'être convertis en radical hydroxyle ($HO\bullet$), qui possède une forte réactivité vis-à-vis des macromolécules biologiques. Une enzyme, la glutathion peroxydase (GPx4) utilise le glutathion réduit (GSH) pour prévenir la formation de ces radicaux [55]. Le GSH est un élément clé de cette voie de mort. Ce peptide est essentiel pour le maintien du potentiel redox cellulaire : il peut être oxydé (GSSG) ou réduit GSH. Il est synthétisé en continu à partir des acides aminés cystéine, glutamate et glycine. La

disponibilité cellulaire en cystéine est une étape limitante de la synthèse du glutathion. Le transporteur Xc^- importe la cystine, qui est le précurseur sérique de la cystéine, en échange de la sortie du glutamate hors de la cellule. Ce transporteur est constitué de deux sous-unités appartenant à la superfamille des transporteurs de solutés (SLC3A2 et SLC7A11). L'érastine (l'inducteur le plus connu de ferroptose) interagit avec une autre sous-unité de cette famille (SLC7A5), qui est une composante du système L, un autre transporteur d'acide aminé. En bloquant SLC7A5, l'érastine interfère indirectement avec le transporteur Xc^- et l'entrée de la cystine dans la cellule. L'application de glutamate en grande quantité est susceptible d'induire le blocage du système Xc^- , et donc la synthèse du glutathion. Le blocage de la synthèse du glutathion est à l'origine d'une inhibition de l'activité de l'enzyme glutathion peroxydase 4 (GPx4), qui est un élément clé des défenses de la cellule vis-à-vis de la peroxydation lipidique. Des composés bloquant directement GPx4, comme le composé RSL3, sont susceptibles d'induire la ferroptose sans impacter le stock de GSH. Il existe aussi des inhibiteurs spécifiques de la ferroptose comme la Ferrostatin-1, l' α -tocophérol (Vitamine E) et les chélateurs de fer (Figure 12).



Trends in Cell Biology

Figure 12: La voie de signalisation de la ferroptose avec ses activateurs et inhibiteurs [56].

c. Rôles physiologiques et pathologiques de la mort cellulaire

i. Les rôles physiologiques de la mort cellulaire

- Rôle dans le développement

La mort cellulaire est un processus indispensable à la structuration de l'organisme au cours du développement. Différentes vagues d'apoptose ont lieu pour sculpter les organes et limiter l'hyperplasie des tissus. L'exemple le plus connu, est celui de la formation des doigts, permettant de passer d'un membre à l'extrémité « palmée » à une main munie de doigts indépendants. Un défaut d'apoptose au cours de la formation de l'embryon peut entraîner une persistance du mésoderme interdigital [57]. Ce phénomène n'est pas seulement drivé par l'apoptose, il est intéressant de noter qu'il a été aussi observé des vagues de nécrose au cours du développement [58]. D'autres structures embryonnaires sont ainsi éliminées au cours de l'embryogenèse, comme l'excroissance caudale chez l'Homme par exemple.

- Rôle dans le système immunitaire

L'apoptose a aussi un rôle crucial dans l'organisation du système immunitaire. Elle est en effet capable d'éliminer les lymphocytes dirigés contre le soi. Chez les souris invalidées pour les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK spécifiquement dans les lymphocytes B, on observe un syndrome développemental caractérisé par la persistance de lymphocytes B non spécifiques [59]. Après une réponse immunitaire, il est indispensable de limiter le nombre de lymphocytes T activés pour éviter une réponse excessive. Il a été montré que l'élimination de ces cellules peut être effectuée par apoptose mais aussi par nécrose [60].

- Rôle dans le renouvellement tissulaire

La mort cellulaire a également une utilité physiologique pour le maintien de l'homéostasie tissulaire tout au long de la vie de l'organisme. Une régulation fine de la balance survie et mort pour assurer le renouvellement des tissus et éliminer les cellules endommagées. Ainsi, en cas de lésion d'un muscle squelettique, une phase de nécrose permet d'éliminer les cellules endommagées et de déclencher la réponse immunitaire nécessaire au processus de réparation de la fibre musculaire [61]. On peut aussi citer le cas du renouvellement de l'épithélium du petit intestin, où une forme d'apoptose particulière intervient l'anoïkis (mort cellulaire par défaut d'interaction avec la matrice extracellulaire) [62]. L'intestin des Mammifères est recouvert d'une simple couche de cellules épithéliales renouvelées tous les 4 à 5 jours afin d'éviter l'accumulation de dommages dus notamment à la fonction digestive. Au niveau structurel, l'intestin est composé d'une succession de cryptes et de villi. Le fort renouvellement des cellules épithéliales est assuré par les cellules souches intestinales localisées à la base de la crypte. Ces cellules se différencient et migrent progressivement vers le haut du villus où elles seront éjectées par une pression mécanique due à un nombre trop

important de cellules. Ces cellules meurent donc par anoïkis puisqu'elles se retrouvent sans ancrage.

ii. Les rôles pathologiques de la mort cellulaire

Comme vu précédemment, la mort cellulaire régule de nombreux phénomènes physiologiques permettant le maintien de l'homéostasie dans le corps humain. Dans un état normal, en cas d'activation intempestive d'oncogènes ou de dommages excessifs à l'ADN, une cellule normale déclenche en conditions physiologiques sa propre destruction par l'un des processus de mort cellulaire dite programmée décrite ci-avant.

Des dysfonctionnements des processus d'enclenchement de cet équilibre vie/mort ont très souvent des effets délétères pour l'organisme.

Au cours des premières étapes de l'embryogénèse, un défaut ou un excès de mort cellulaire peut être létale pour l'organisme en développement : l'utilisation d'inhibiteurs de caspases au cours du développement d'embryon de souris dès le stade de deux cellules conduit à des anomalies de développement pouvant aboutir à la mort de l'embryon [63]. De nombreuses pathologies résultent également d'un excès ou un défaut de mort cellulaire.

- Quand la mort devient excessive...

Comme indiqué précédemment, l'apoptose a un rôle central dans le développement de l'organisme mais également dans les processus homéostatiques au cours de la vie post-embryonnaire. Il n'est donc pas étonnant de trouver des descriptions de l'implication d'un excès de mort cellulaire dans différentes pathologies dégénératives. Au niveau neurologique par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, il a été montré *in vitro* que l'accumulation du peptide β -amyloïde caractéristique de cette pathologie entraîne la mort des neurones par apoptose [64]. Dans la maladie de Parkinson, l'excès d'apoptose entraîne la mort des neurones dopaminergiques. Dans le cas du diabète de type I, maladie auto-immune, les cellules β du pancréas productrices d'insuline sont éliminées par une mort excessive de type apoptotique et nécrotique [65]. La mort cellulaire est aussi impliquée dans le phénotype des dystrophies musculaire. Les gènes responsables des dystrophies musculaires (DM) sont notamment les gènes codant pour des protéines du complexe-dystrophine-glycoprotéines (DGC), de la matrice extracellulaire (qui lie le DGC) et des enzymes nécessaires à la glycosylation des dystroglycane. Le déficit du complexe DGC entraîne une rupture du lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette [66]. La fragilité de la membrane musculaire aboutit à une entrée de composants extracellulaires, et notamment de calcium. Il en résulte une destruction de la membrane cellulaire et la nécrose des cellules concernées. Dans certains cas de dystrophies, une hausse de l'activité de caspase-3 et donc l'engagement de la signalisation apoptotique pourraient également être impliqués [67].

- Et quand la mort fait défaut...

En 1991, une souche de souris a été découverte par hasard pour sa ressemblance avec les patients atteints d'un lupus érythémateux aigu disséminé. Les souris présentaient une tendance à développer des ganglions lymphatiques et une hypersplénie, associée à glomérulonéphrite auto-immune. Des mutations dans FAS et FAS L, ont été trouvées dans ces souris. Les lymphocytes de ces souris prolifèrent normalement en réponse à des défis antigéniques, mais ne sont pas éliminés à la fin de la réponse immunitaire en raison de la mutation du récepteur de mort et de son ligand (CD95 et CD95L), entraînant une accumulation anormale de lymphocytes T dans les tissus [68].

Un défaut de mort cellulaire est aussi l'une des caractéristiques principales de la tumorigénèse. La mort cellulaire est une des barrières essentielles à une prolifération cellulaire anarchique.

De nombreuses altérations des voies centrales de contrôle, de signalisation et d'exécution de l'apoptose sont observées dans les cancers, et les cancers pédiatriques ne font pas exception à la règle. L'ensemble de ces données a fait l'objet d'une revue actuellement en révision à Bulletin du cancer, et présentée ci-après.

Mécanismes et altérations de l'apoptose au cours de la tumorigenèse : implication et enjeux en cancérologie pédiatrique.

Broutier L., Vial J., Weber K., Castets M.

Equipe « Mort Cellulaire et Cancers Pédiatriques » - Centre de Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

Correspondence: M. Castets, e-mail: marie.castets@lyon.unicancer.fr

Résumé

L'apoptose est un type de mort cellulaire programmé impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques. Le corollaire est que des dysfonctionnements de ce processus jouent un rôle dans l'étiologie de nombreuses pathologies, et notamment dans la tumorigenèse. L'objectif de cette revue est de décrire les mécanismes et altérations de l'apoptose impliqués dans l'initiation et l'échappement tumoral. Partant du postulat selon lequel "*Pediatrics does not deal with miniature men and women, with reduced doses and the same class of diseases in smaller bodies, but... it has its own independent range and horizon and gives as much to general medicine as it receives from it*", un focus particulier sera notamment mis sur les enjeux et nouveaux challenges associés à une meilleure caractérisation du rôle joué par l'apoptose au cours de la tumorigenèse dans les cancers pédiatriques.

Mechanisms and alterations of apoptosis during tumor development : impact and challenges in pediatric oncology.

Abstract

Apoptosis is a type of programmed cell death that is involved in many physiological processes. The corollary is that malfunctions of this process has been involved in the etiology of several pathological conditions, among which tumorigenesis. The aim of this review is to give an overview of mechanisms and alterations of apoptosis during tumor initiation and escape. Starting from the premise that "*Pediatrics does not deal with miniature men and women, with reduced doses and the same class of diseases in smaller bodies, but... it has its own independent range and horizon and gives as much to general medicine as it receives from it*", particular focus will be placed on issues and challenges associated with a better understanding of apoptosis roles in pediatric cancers tumorigenesis.

Mots clés : apoptose, cancers pédiatriques, tumorigenèse

Key words : apoptosis, pediatric cancers, tumorigenesis

Près de 500 enfants en France et 80 000 à travers le monde décèdent chaque année d'un cancer. Il y a 50 ans, le taux de guérison des cancers pédiatriques était inférieur à 25%. La situation s'est grandement améliorée avec l'avènement des chimiothérapies, initialement développées pour les adultes mais dont ont bénéficié les enfants. On estime que 80% des enfants et adolescents guérissent actuellement dans les pays développés (1). Cependant, malgré des essais cliniques multicentriques en Europe et aux Etats-Unis, les taux de survie associés aux cancers pédiatriques ne se sont plus améliorés significativement depuis la fin des années 90. De plus, les traitements intensifs et multimodaux actuels sont à l'origine de séquelles plus ou moins invalidantes chez deux tiers des enfants, et notamment de cancers secondaires et de pathologies chroniques (2, 3). Le devoir des pédiatres oncologues est de proposer le traitement le plus adapté pour soigner les enfants tout en préservant leur qualité de vie future. Il est pour cela nécessaire de déterminer les bases moléculaires et les spécificités de ces cancers, afin de développer de nouvelles solutions thérapeutiques pour améliorer leur pronostic. L'objectif de cette revue est d'exposer les modalités de fonctionnement des voies apoptotiques ainsi que l'implication des altérations qui leur sont associées en cancérologie pédiatrique, et de proposer des pistes d'exploration de ces dysfonctionnements susceptibles de fournir de nouvelles solutions thérapeutiques.

Apoptose : modalités et rôle physiopathologique

Trois types principaux de mort cellulaire ont été décrits : l'autophagie, l'apoptose et la nécrose. La distinction entre ces 3 grands types de mort cellulaire repose principalement sur des critères morphologiques, même si leur mise en jeu répond à des situations de stress et se fait via des mécanismes moléculaires différents. Ainsi, l'autophagie est une réaction de la cellule à une carence en nutriments, qui la conduit à digérer ses propres organites pour garantir son métabolisme basal. Lorsque cette carence persiste, la cellule enclenche alors un processus de mort cellulaire qualifié d'autophagy-associated cell death (4). L'apoptose, du grec ancien ἀπόπτωσις « chute des feuilles », initialement décrite en 1972 (5), a longtemps été confondue avec le terme de mort cellulaire programmée, par opposition à la nécrose, classiquement considérée comme une mort accidentelle non physiologique. La mort cellulaire programmée est un processus d'autodestruction actif par lequel une cellule surnuméraire, ectopique ou dysfonctionnelle déclenche sa propre élimination. Toutefois, le terme de mort cellulaire programmée s'est progressivement élargi au-delà de l'apoptose, suite à l'identification de types alternatifs incluant notamment la paraptose, la ferroptose ou la nécroptose (6, 7). Contrairement à la nécrose, qui se manifeste par un gonflement cellulaire suivi du relargage du contenu cytoplasmique dans l'environnement, à l'origine d'un processus inflammatoire, l'apoptose est caractérisée par une réduction du volume cellulaire (pyknosis) accompagnée d'un arrondissement de la cellule avec rétraction des pseudopodes, une condensation de la chromatine, une fragmentation du noyau (karyorrhexis) et de l'ADN, sans modification majeure de la structure des organites cytoplasmiques, un «bourgeonnement» membranaire («blebbing») et enfin, une internalisation par les phagocytes. Le contenu cellulaire n'est pas libéré dans l'environnement, et l'apoptose n'entraîne donc pas d'inflammation.

L'apoptose joue un rôle fondamental au cours du développement embryonnaire, en participant à l'élimination de structures (notamment celles caractéristiques des stades larvaires) et à la sculpture des formes, l'exemple le plus connu étant probablement celui de

la formation des doigts (8). L'apoptose exerce également une fonction régulatrice essentielle dans de nombreux processus physiologiques au cours de la vie adulte. Par exemple, elle participe à la mise en place des mécanismes de défense immunitaire, en permettant la sélection des lymphocytes ne réagissant pas avec le soi ou en éliminant les cellules endommagées par des agents nocifs (4). Plus généralement, l'apoptose est cruciale pour maintenir l'homéostasie tissulaire, qui est la résultante d'un équilibre subtil entre prolifération, survie et mort cellulaire. De ce fait, tout défaut dans la régulation ou l'exécution du programme apoptotique est susceptible de déclencher une situation de déséquilibre potentiellement pathologique. Ainsi, un excès d'apoptose est impliqué de manière causale dans des anomalies dégénératives telles que l'amyotrophie spinale, la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington et même les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (9). D'autre part, les défauts d'apoptose sont également associés à des pathologies, comme les maladies auto-immunes, causées par la non-élimination de lymphocytes auto-réactifs (10, 11), ou les cancers, l'apoptose constituant, en conditions physiologiques, un rempart au développement de tumeurs par élimination de cellules surnuméraires et/ou ectopiques.

Principales voies de signalisation apoptotique

On distingue principalement deux grandes voies apoptotiques convergeant vers l'activation de protéines centrales de l'apoptose : les caspases (Cystein Aspartyl Protéases). Il s'agit de la voie mitochondriale, ou voie intrinsèque, et de la voie des récepteurs de mort, ou voie extrinsèque.

La voie mitochondriale est déclenchée en réponse à différents types de stress incluant les dommages à l'ADN, la surexpression d'oncogènes, la privation en facteurs de croissance ou en oxygène. Elle est donc une des voies ciblées préférentiellement par les thérapies anti-cancéreuses (12). Au coeur de cette voie, la mitochondrie reçoit et intègre en permanence les stimuli pro- et anti-apoptotiques. L'induction de l'apoptose débute par la libération de différents facteurs pro-apoptotiques liée à une modification de la perméabilité membranaire mitochondriale. La perméabilité de la membrane mitochondriale est régulée par les protéines de la famille Bcl-2. Cette famille comprend des membres anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-XL) et d'autres pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bid, Bim et Bad). En fonction de l'équilibre entre homo et hétérodimérisation de ces protéines, la balance est en faveur ou non de l'engagement au sein du processus apoptotique (13). Le principal facteur libéré de la mitochondrie en conditions apoptotiques est le cytochrome c qui s'associe à un complexe protéique appelé apoptosome et entraîne l'activation de la caspase 9 puis des caspases 3 et 7, conduisant finalement au démantèlement de la cellule par clivage de substrats essentiels au maintien de son intégrité (14). En plus du cytochrome c, la mitochondrie est capable de libérer d'autres facteurs apoptotiques comme Smac/Diablo (4) qui activent les caspases de façon indirecte en inhibant les protéines IAPs (Inhibitors of APoptosis). Il est à noter que cette voie est notamment régulée positivement par le suppresseur de tumeur p53 et négativement par les protéines tyrosine kinase PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/Akt et MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase).

La voie des récepteurs de mort ou extrinsèque passe par l'activation à la membrane cellulaire des récepteurs de mort faisant partie de la superfamille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor). Au nombre de huit (TNF-R1, Fas, DR3, DR6, TRAIL-R1, TRAIL-R2, EDAR et p75), ils sont caractérisés par la présence, dans leur région intracellulaire, d'un domaine de mort DD (Death Domain) et induisent un signal apoptotique en réponse à la

liaison d'un ligand spécifique (TNF α , FasL, APO3L, TRAIL) (15). La liaison du ligand déclenche la formation d'un trimère qui permet soit l'activation directe de la caspase 8, activant à son tour les caspases 3, 6 et 7, ou bien l'activation de la voie mitochondriale par clivage de la protéine Bid. Les protéines IAPs CARP1 et 2, et c-FLIP peuvent inhiber cette voie en formant un complexe inhibiteur avec la caspase 8 (4).

Un troisième type de signalisation apoptotique, moins connu, est la voie intrinsèque dépendant du réticulum endoplasmique, qui est activée en cas de dommages de ce compartiment cellulaire par différents stress (hypoxie, radicaux libres, carence en glucose...). Elle requiert l'activation de la caspase-12 par dissociation de TRAF2 (16).

Les caspases sont les effecteurs centraux de l'apoptose. Ce sont des protéases à cystéines qui clivent leurs cibles protéiques après un résidu acide aspartique au niveau d'un motif spécifique de reconnaissance de quatre acides aminés (16, 17). En absence de stress, elles sont majoritairement présentes dans la cellule sous forme de procaspases peu actives. On distingue deux grandes classes fonctionnelles de caspases selon leur position dans la cascade apoptotique et leur mode d'activation : les caspases initiatrices et les caspases effectrices (17). Les caspases initiatrices 2, 8, 9 et 10 se situent au début de la cascade apoptotique et assurent le lien entre le signal déclencheur et l'initiation de l'apoptose. Elles sont composées d'un grand pro-domaine, qui possède soit un motif CARD (Caspase Recrutement Domain) pour les caspases 2 et 9, soit un motif DED (Death Effector Domain) pour les caspases 8 et 10, ce qui permet leur recrutement au niveau des complexes déclencheurs (ou plateforme d'activation) de l'apoptose et leur auto-activation par multimérisation grâce à l'augmentation locale de leur concentration. Chaque caspase initiatrice a sa propre plateforme d'activation : le DISC recrute et active les caspases 8 et 10, l'apoptosome active la caspase-9 et le PIDDosome pourrait-être impliqué dans l'activation de la caspase-2 (18). En aval de la cascade, on retrouve les caspases 3, 6 et 7, dites effectrices, qui possèdent un pro-domaine court empêchant leur auto-activation. Leur activation nécessite deux clivages par les caspases initiatrices : un entre leur pro-domaine et p20 et un entre p20 et p10. Les sous-unités p20 et p10 s'organisent alors en tétramères, qui constituent les formes actives des caspases effectrices. Elles peuvent alors à leur tour aller cliver d'autres procaspases, aboutissant au démantèlement de la cellule par la fragmentation du cytosquelette et de protéines diverses, impliquées notamment dans la réparation de l'ADN et dans le métabolisme.

L'activité des caspases est notamment contrôlée par les IAPs, caractérisées par l'existence d'un domaine protéique BIR (baculovirus IAP repeat) et au nombre de 8 chez l'Homme (NAIP (*BIRC1*), c-IAP1 (*BIRC2*), c-IAP2 (*BIRC3*), X-linked IAP (*BIRC4*), Survivin (*BIRC5*), Apollon (*BIRC6*), Livin/ML-IAP (*BIRC7*) et IAP-like protein 2 (*BIRC8*)) (19). Leur action inhibitrice sur les caspases s'exerce par blocage de leur site catalytique, induction de leur dégradation ou inhibition de l'interaction avec le substrat.

Résistance à l'apoptose et cancers pédiatriques : de l'identification d'altérations des voies apoptotiques à leur réactivation thérapeutique

Le cancer peut être envisagé comme le résultat d'une succession de changements génétiques aboutissant à la transformation maligne d'une cellule normale. Malgré la disparité des lésions néoplasiques, et quel que soit le modèle, six caractéristiques communes aux cellules tumorales, acquises au cours du processus de transformation, ont

été résumées au travers du premier modèle d'Hanahan et Weinberg (20). La résistance à la mort cellulaire, notamment apoptotique, est l'un des six dysfonctionnements conditionnant la transformation tumorale. En cas d'activation intempestive d'oncogènes ou de dommages excessifs à l'ADN, une cellule normale déclenche en conditions physiologiques sa propre destruction par un processus de mort cellulaire dite programmée. Ce phénomène est aboli dans les cellules tumorales. Un défaut d'enclenchement de mort cellulaire programmée, et notamment d'apoptose peut donc favoriser l'initiation de la tumorigenèse, y compris sans augmentation majeure du taux de prolifération, et constitue *a priori* un avantage sélectif pour les cellules tumorales au cours de l'échappement (16). De plus, la plupart des stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses actuellement utilisées, et notamment les agents cytotoxiques et la radiothérapie, induisent l'apoptose notamment par activation de la voie intrinsèque (21) : il est classiquement supposé que la principale limitation à l'efficacité de ces traitements conventionnels puisse donc résulter des anomalies de déclenchement de ce programme. En d'autres termes, l'état réfractaire des cellules tumorales à la transduction de signaux apoptotiques expliquerait pour partie la résistance aux thérapies et les rechutes associées. Le corollaire est que le succès des thérapies actuelles et futures dépende notamment de l'intégrité fonctionnelle de tout ou partie des voies apoptotiques.

De nombreuses altérations des voies centrales de contrôle, de signalisation et d'exécution de l'apoptose sont observées dans les cancers, et les cancers pédiatriques ne font pas exception à la règle. Elles peuvent globalement être regroupées en 5 types sur le plan mécanistique (Figure 1) (16).

Le premier type regroupe les altérations de p53. Cette protéine codée par le gène *TP53* est l'un des systèmes senseurs majeurs des stress, susceptible de déclencher de fait l'activation de la mort cellulaire. Elle constitue donc un pivot dans l'engagement du processus apoptotique et son absence/sa perte de fonction permet aux cellules tumorales de s'affranchir de l'induction de ce processus, malgré l'existence de dommages à l'ADN, la surexpression d'oncogènes, l'hypoxie, ou la carence en facteurs de croissance par exemple. La diminution d'expression de *TP53* ou son inactivation fonctionnelle a été décrite dans de nombreux cancers. Ainsi, une étude récente montre que dans les tumeurs de l'enfant, *TP53* est le gène le plus communément muté avec une fréquence de 4% des tumeurs, soit 10 fois moins fréquemment que dans les cancers adultes cependant (22). Des mécanismes alternatifs d'inhibition de l'expression de p53 existe : ainsi, dans le neuroblastome, tumeur extracrâniale la plus fréquente chez l'enfant et supposée résulter de la transformation oncogénique de cellules des crêtes neurales engagées dans le lignage sympatho-adrénal, si *TP53* est fréquemment muté dans les tumeurs à la rechute, son inactivation résulte du blocage de son activité pro-apoptotique par surexpression de *MDM2* dans les tumeurs primaires (23). Le second type d'altérations existant dans les cancers consiste en une modification de l'équilibre des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Dans le rhabdomyosarcome, la principale forme de sarcomes de tissus mous chez l'enfant et l'adolescent, l'expression des protéines anti-apoptotiques mitochondriales Bcl-2 et Mcl-1 a par exemple été rapportée (24, 25). Un tel gain de la famille de protéines Bcl-2 est également retrouvé dans l'ostéosarcome, principale forme de sarcomes osseux en pédiatrie (23, 26). Dans ces deux types de sarcomes, une corrélation entre le niveau d'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, le stade clinique et/ou la dissémination métastatique a été établie (25, 26). De même, le neuroblastome de haut grade présentent une expression de *MCL1* et/ou *BCL-2* plus fréquente que ceux de grade inférieur (26, 27),

tandis que le polymorphisme *BCL2*-938 C>A a été identifié comme un facteur prédictif dans la leucémie aigüe lymphoblastique pédiatrique (28). Les tumeurs de rhabdomyosarcome exprimant la protéine pro-apoptotique Bax sont au contraire associés à un pronostic favorable (25). Des dysfonctionnements de la voie extrinsèque des récepteurs de mort par mutation des ligands, diminution de l'expression des récepteurs ou expression de « récepteurs leurres » fixant le ligand sans entraîner de cascade apoptotique sont un troisième type d'altérations possibles des voies centrales de l'apoptose (12, 29). Une autre option pour la cellule tumorale pour freiner l'induction de l'apoptose est la réduction de l'expression des caspases. Ainsi, une perte d'expression de la caspase-8, notamment par hyperméthylation, est observée dans une large fraction de neuroblastomes de haut-grade, et chez certains patients atteints de rhabdomyosarcome ou de médulloblastome (30-33). Dans les tumeurs périphériques neuroectodermiques du cerveau, constituant plus de 20% des cas de cancers du cerveau chez l'enfant, et le neuroblastome la perte d'expression de la caspase-8 a été impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par TRAIL et/ou aux chimiothérapies (31, 34, 35). Enfin, le blocage de l'activité des caspases, par une dérégulation de l'expression de leurs inhibiteurs, et notamment des IAPs, constitue un 5^{ème} type d'anomalies couramment retrouvé dans les cellules tumorales. Ainsi, un gain de Survivine résultant potentiellement d'une amplification de la région q25 du chromosome 17 a notamment été décrit dans les neuroblastomes de haut grade et corrélé au risque de rechute précoce dans le cas de la leucémie aigüe lymphoblastique (36). Des défauts d'épissage de ce gène, conduisant à la diminution du niveau d'expression d'une isoforme pro-apoptotique, ont également été rapportés (36).

Paradoxalement, malgré les altérations décrites ci-dessus, les cellules tumorales peuvent être considérées comme prédisposées à mourir (37). En effet, leur transformation en cellule tumorale s'accompagne de l'acquisition d'anomalies (dommages à l'ADN, activation d'oncogènes...), qui déclenchent l'engagement des signalisations apoptotiques; leur survie ne tient donc qu'à un fil, celui des points de blocage des voies de mort acquis simultanément. Lever ces points de blocage pourrait dans ce cadre suffire à faire basculer les cellules tumorales dans un processus de mort déjà engagé (Figure 2). De plus, le concept de « priming » mitochondrial a récemment mis en lumière le fait que l'élimination d'une cellule tumorale par apoptose en réponse à un traitement de chimiothérapie dépend étroitement de son seuil initial d'engagement dans ce processus (38). En conséquence, les stratégies thérapeutiques ciblant les voies apoptotiques peuvent donc être envisagées comme des moyens de sensibiliser les tumeurs aux thérapies conventionnelles pro-apoptotiques.

Ainsi, un effort considérable a été entrepris ces dernières décennies pour corriger les 5 grands types de défauts décrits ci-dessus, et déclencher la mort des cellules tumorales, directement ou indirectement en rétablissant la sensibilité aux thérapies conventionnelles. Des stratégies thérapeutiques reposant sur la restauration fonctionnelle de p53 (à l'aide de composés, par thérapie génique ou immunothérapie), le ciblage des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et des IAPs, l'induction des cascades apoptotiques induites par les récepteurs de mort (par utilisation de ligands ou d'anticorps agonistes), ou le rétablissement de l'expression des caspases ont notamment été développées et testées (16). Il a ainsi été établi que le ligand TRAIL induit l'apoptose de lignées cellulaires de neuroblastome, de rhabdomyosarcome, de leucémie et de sarcome d'Ewing (36, 39, 40).

Des anticorps monoclonaux agonistes de TRAIL ont également démontré une activité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo*. Des essais cliniques de phase 1 reposant sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal agoniste du récepteur TRAIL-R2 ont notamment été entrepris (39). Sur la base de l'interaction inhibitrice entre les protéines IAPs et la protéine mitochondriale SMAC, des petites molécules mimétiques de SMAC ont été développées pour se lier au domaine BIR3 des IAPs et notamment à celui de XIAP. L'activité anti-tumorale de ces composés a été établie *in vitro* sur des lignées de neuroblastome, permettant en particulier de contourner la résistance à des chimiothérapies (36, 41, 42). Dans le neuroblastome, des oligonucléotides ciblant la Survivine ont similairement démontré leur capacité à déclencher l'apoptose, notamment en synergie avec TRAIL (36), et l'utilisation de l'oligonucléotide antisens AEG35156 ciblant XIAP déclenche l'apoptose des cellules de rhabdomyosarcome *in vitro* (33). L'efficacité de petites molécules mimétiques des BH3 comme l'ABT-737, l'ABT-199 ou l'ABT-263, capables de bloquer l'interaction entre les protéines Bax et Bak et les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, et de déclencher de fait la perméabilisation de la membrane mitochondriale a été testée dans certains cancers pédiatriques (33, 36, 43). Contrairement aux molécules mimétiques de SMAC supposées être capables uniquement de sensibiliser les cellules tumorales, ces composés ont démontré une activité anti-tumorale directe, *in vitro* et *in vivo*, dans certains cas, et en particulier la leucémie aigue lymphoblastique ou le neuroblastome (36). En revanche, leur efficacité anti-tumorale s'est avérée plus décevante *in vivo* dans des modèles de sarcomes (39). D'autres approches reposant sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens ciblant l'expression de *BCL2* ont également été testées (33). Leur efficacité a été établie dans un certain nombre de modèles précliniques de cancers pédiatriques. Des essais cliniques de phase 1 utilisant certains de ces composés sont actuellement en cours (44).

Limites et nouveaux enjeux dans le ciblage des voies apoptotiques en oncologie pédiatrique : vers un paradigme revisité et intégré

Si l'approche consistant à cibler les voies centrales de l'apoptose pour déclencher ou favoriser l'élimination des cellules tumorales reste prometteuse, sa mise en oeuvre et son efficacité sont plus complexes qu'initialement envisagé (21, 45). L'utilisation de la voie des récepteurs de mort qui paraissait prometteuse s'est par exemple heurtée à l'identification de propriétés pro-tumorales de ces récepteurs, et à l'existence de résistance due à des points de blocage dans les cascades effectrices situées en aval (45). De plus, outre les phénomènes de résistance évoqués, les thérapies testées jusqu'alors posent des problèmes de toxicité particulièrement exacerbée dans les cancers pédiatriques. En effet, une étude récente a conclu que l'enclenchement du processus apoptotique était plus avancé dans les cellules au cours de l'ontogénie (« priming » apoptotique), suggérant de fait que les thérapies déclenchant l'apoptose puissent avoir plus d'effet délétères lorsqu'utilisées en pédiatrie (38). Ainsi, le ciblage des voies apoptotiques comme outil thérapeutique en oncologie pédiatrique fait face à plusieurs challenges soulignant la nécessité d'une vision plus intégrée.

Le premier est probablement d'intégrer les anomalies génétiques et épigénétiques des voies apoptotiques centrales de l'apoptose de la tumeur chez chaque patient, afin de reconstituer une cartographie globale de l'état de fonctionnement apoptotique à l'échelle individuelle, puis de regrouper les patients sur cette base. En effet, l'acquisition du caractère tumoral par

une cellule ne s'accompagne pas d'un blocage simultané de l'ensemble des voies apoptotiques, mais partiel de l'une ou plusieurs d'entre elles pour contrecarrer les systèmes tumeurs suppresseurs mis en jeu lors de l'initiation tumorale dans une tumeur donnée (46). Or, si la dissection des voies apoptotiques a été initiée dans les tumeurs pédiatriques au cours des 20 dernières années, conduisant à l'identification de nombreuses molécules susceptibles de constituer des cibles thérapeutiques, les données disponibles et relatives aux modalités de blocage des voies apoptotiques restent cependant parcellaires et fragmentées dans de nombreux cancers. L'enjeu est donc de définir des groupes de patients potentiellement éligibles pour une des thérapies décrites ci-dessus. En d'autres termes, il s'agit de stratifier les patients en groupes homogènes sur la base de l'état de fonctionnalité de leurs voies apoptotiques, de manière à adapter les traitements utilisés dans le cadre d'approche de médecine personnalisée. Cette approche a déjà été envisagée pour utiliser la voie TRAIL uniquement chez des patients prédéfinis comme répondeurs (47).

Le second challenge est de comprendre de façon plus globale les mécanismes de résistance à la mort cellulaire notamment en tenant compte de l'hétérogénéité et de la plasticité des cellules tumorales. En effet, les tumeurs ne sont plus considérées comme des entités homogènes constituées de cellules présentant toutes le même potentiel malin. En particulier, les mécanismes de résistance à l'apoptose doivent être questionnés de manière plus spécifique dans le compartiment souche des tumeurs. Les cellules souches cancéreuses (CSCs) désignent le pool de cellules tumorales capable d'auto-renouvellement et à même de reconstituer l'ensemble de la population tumorale car possédant un potentiel de différenciation (48). Ces CSCs sont supposées être à l'origine de la résistance aux traitements conventionnels et aux rechutes associées, notamment du fait de résistance à l'apoptose (43). Le blocage des voies apoptotiques pourrait être particulièrement efficace dans les CSCs et résulter de la concomitance entre un gain des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) potentialisant l'export des drogues, l'activation des systèmes de réponse aux dommages à l'ADN et notamment des protéines CHK1/2, l'augmentation du niveau d'expression des protéines anti-apoptotiques, et la potentialisation de la résistance au stress oxydatif (49). En d'autres termes, les mécanismes de résistance à l'apoptose pourraient être différents en fonction des populations tumorales. Pour être efficaces et anticiper les résistances intrinsèques ou acquises, les stratégies thérapeutiques ciblant l'apoptose doivent donc appréhender la tumeur dans sa composante hétérogène et dynamique (50). En ce sens, il a été établi que les CSCs présentaient une expression accrue de DR5 dans les cancers pancréatiques, justifiant de fait l'utilisation d'un anticorps monoclonal agoniste de ce récepteur en combinaison avec la gemcitabine pour éliminer ce pool de cellules souches (49). De la même manière, le ciblage de cFLIP pourrait être intéressant pour induire l'apoptose des CSCs dans les cas de cancers du sein (49). En résumé, l'enjeu en cancérologie pédiatrique, est similairement de définir les mécanismes de blocage de la mort cellulaire dans ce compartiment souche en particulier, et d'anticiper les modalités de résistance acquis en cours de traitement, notamment via des phénomènes de plasticité cellulaire, de manière à potentialiser l'effet des traitements et à garantir leur efficacité sur le long terme en s'attaquant au cœur de la tumeur (45).

Le troisième niveau de complexité concerne l'impact du microenvironnement dans la promotion de la résistance à l'apoptose (51). En effet, le phénotype tumoral est le résultat de plusieurs altérations génétiques présentes dans les cellules tumorales elles-mêmes (résistance autonome), mais des études récentes ont suggéré que la résistance à l'apoptose

pourrait également être associée au microenvironnement tumoral (résistance non autonome). Les cellules stromales peuvent moduler la progression tumorale et la réponse aux traitements, notamment en impactant la survie des cellules tumorales (52-54). L'un des exemples les plus prégnants est probablement celui du blocage par les checkpoints immunitaires de l'activité cytotoxique -par exocytose de granules ou déclenchement des voies extrinsèques- des lymphocytes dans les tumeurs : ceci justifie une stratégie indirecte de déclenchement de l'apoptose des cellules tumorales par réactivation du système immunitaire par immunothérapie (55-57). De manière similaire, la fonction tumoricide des macrophages peut être convertie en une fonction trophique, qui pourrait même participer au blocage des voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque en réponse aux chimiothérapies (58, 59). L'induction de l'apoptose des cellules tumorales ne doit donc pas être considérée uniquement à leur échelle, mais plus globalement en intégrant le rôle de la niche tumorale.

L'identification du potentiel oncogénique de l'apoptose au cours de l'échappement tumoral constitue également un écueil majeur à l'efficacité de thérapies ciblant ce processus. En effet, si le blocage de signaux apoptotiques apparaît crucial au moment de l'initiation tumorale pour permettre l'émergence d'un pool de cellules malignes présentant des anomalies susceptibles de déclencher normalement leur élimination, l'apoptose pourrait au contraire participer à l'échappement tumoral par différents mécanismes. Le décalage de l'équilibre vie/mort par ciblage de l'apoptose ne doit plus être vu uniquement à l'échelle cellulaire, mais dans un cadre plus global où la mort de certaines cellules tumorales promeut la survie des autres (37). La caspase 8 joue en particulier un rôle complexe (60). Le rôle anti-tumoral de cet effecteur apoptotique a été confirmée notamment *in vivo* par l'étude de modèles transgéniques : ainsi, dans le modèle TH/N-MYC de neuroblastome, la perte de la caspase-8 accélère la progression tumorale (46). Mais la caspase-8 pourrait également avoir un rôle pro-tumoral en bloquant l'induction des voies de mort nécroptotiques (46, 61). Il convient donc de distinguer les situations dans lesquelles la perte de son expression constitue un frein à l'induction de la voie apoptotique extrinsèque, de celles où elle constitue au contraire un levier pour déclencher l'élimination des cellules tumorales par nécroptose. Le concept de niche « onco-régénérative » a également été évoqué pour décrire la manière dont le dialogue intercellulaire mis en place pour régénérer un tissu est détourné par les cellules tumorales pour favoriser la survie cellulaire : en d'autres termes, le suicide d'un pool de cellules tumorales par apoptose notamment dans les tumeurs agressives déclencherait une réaction de l'environnement analogue à celle observée en cas de lésion, et favorisant de fait la survie et la prolifération (51). L'apoptose joue donc un rôle paradoxal à l'échelle de la population de cellules tumorales, son blocage favorisant la survie cellulaire à l'échelle individuelle mais son induction étant susceptible de booster la croissance de la masse tumorale dans son ensemble.

Enfin, les travaux décrits ci-dessus ne concernent que les voies centrales de l'apoptose, et n'adressent pas les problématiques spécifiques des cancers pédiatriques. De nombreux acteurs jouent un rôle plus ou moins important dans la régulation du déclenchement de ce programme de mort cellulaire, de manière à garantir un contrôle précis de la balance survie/mort. Ainsi, au-delà des effecteurs des principales voies apoptotiques décrites précédemment, la complexité mais également la robustesse de l'équilibre survie/mort reposent sur l'interaction entre de nombreuses voies de signalisation et sur la mise en jeu de molécules différentes en fonction du contexte spatial et temporel. Si les cancers sont supposés résulter en grande partie chez l'adulte de l'accumulation progressive d'anomalies

résultant notamment d'expositions environnementales, on estime que près de la moitié des types de cancers pédiatriques pourraient avoir une origine embryonnaire et résulteraient de l'existence de quelques altérations à fort pouvoir oncogénique (62). Plus largement, il est supposé que les programmes développementaux contrôlant la construction de tissus et d'organes, en orchestrant la genèse de cellules en nombre suffisant, l'élimination de celles produites en excès, leur différenciation et leur cheminement vers leur destination appropriée dans l'organisme puissent être altérés et détournés dans les cancers, notamment pédiatriques (63). Un pool de myoblastes est ainsi généré dans les somites lors du développement des muscles squelettiques. Une fraction de ces cellules subira une différenciation, tandis qu'un autre sous-groupe quittera le cycle cellulaire pour constituer un pool de cellules souches quiescentes appelées cellules satellites, qui assurera la régénération musculaire au cours de la vie (64). Les myoblastes restants sont éliminés par apoptose. Dans le même ordre d'idées, l'apoptose ostéoblastique joue un rôle important dans le développement et le maintien du tissu osseux, car on estime que 60 à 80% des ostéoblastes qui se rassemblent à l'origine dans la fosse de résorption meurent par apoptose (65). Un blocage des programmes apoptotiques responsables de l'élimination de l'excès de myoblastes et d'ostéoblastes, et plus largement de cellules produites à certaines phases du développement, pourraient jouer un rôle dans l'apparition respectivement de rhabdomyosarcome, d'ostéosarcome et d'autres tumeurs, tandis que les mécanismes survenant au cours de l'embryogenèse pour garantir la survie de cellules, notamment souches, pourraient être réactivés dans certaines tumeurs pédiatriques (45, 63). L'enjeu en oncopédiatrie est donc probablement de définir, au-delà des voies apoptotiques de référence, si et comment des mécanismes moléculaires développementaux impliquant des effecteurs jouant un rôle plus spécifique et discret dans la régulation de l'apoptose, pourraient être réactivés ou bloqués dans les tumeurs. L'implication récente d'altérations de la voie Hippo dans un certain nombre de cancers pédiatriques en est une illustration (66). La voie de signalisation Hippo régule la prolifération cellulaire et l'apoptose au cours du développement des organes. L'activation de cette voie inhibe les facteurs de transcription YAP et TAZ et inhibe de fait le renouvellement des cellules progénitrices, la régénération tissulaire et la prolifération de cellules progénitrices non différenciées et favorise l'apoptose des cellules. Il a été supposé que compte-tenu de son rôle dans l'embryogenèse, cette voie puisse jouer un rôle clé dans les cancers pédiatriques. La voie Hippo est notamment impliquée dans la différenciation des précurseurs mésenchymateux, supposés être à l'origine des sarcomes. Une activation anormale de la protéine YAP a effectivement été identifiée en tant que facteur causal dans la survenue de rhabdomyosarcome, l'inhibition de son expression par utilisation de shARN étant associée à une induction de l'apoptose et de la différenciation myogénique *in vitro*, et à une inhibition de la croissance tumorale *in vivo* (67, 68). De même, l'expression de YAP participe à la migration des cellules des crêtes neurales, à l'origine du neuroblastome, et la diminution progressive de son expression est associée à la différenciation de ces précurseurs au cours du développement (66). L'activation anormale de YAP et de TAZ a été décrite dans le neuroblastome et corrélée positivement avec un pronostic défavorable. Des mutations de *PTPN14*, qui codent pour un régulateur négatif de YAP, ont également été associées à des rechutes (66).

Outre l'apoptose, plusieurs modes de mort cellulaire non apoptotiques ont également été identifiés plus récemment. Le ciblage de la « catastrophe mitotique », induite en réponse à certaines chimiothérapies, de la mort autophagique ou de la nécrose/nécroptose et de son potentiel immunogénique pourrait notamment présenter un intérêt thérapeutique pour

contourner les blocages des voies apoptotiques. En particulier, la nécroptose pourrait être une stratégie alternative d'engagement de la mort cellulaire par certains récepteurs de mort en cas d'absence de la caspase 8. Restaurer l'expression de cette dernière peut donc s'avérer contre-productif dans certains cas, puisque le rétablissement de la voie apoptotique empêcherait en retour, l'induction de celle nécroptotique, potentiellement plus efficace dans un système donné, notamment du fait de son caractère immunogénique. Là encore, la complexité du système réside dans l'interconnexion entre ces voies de mort et souligne la nécessité d'une vision intégrée pour le développement de stratégies thérapeutiques pertinentes et efficaces.

Conclusion

De nombreuses thérapies anti-cancéreuses utilisées reposent sur l'induction des voies de signalisation apoptotique, et donc sur leur intégrité. La compréhension des dysfonctionnements et des anomalies de ces voies de signalisation est donc essentielle pour appréhender les phénomènes de résistance et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Une approche intégrée fonctionnelle des voies apoptotiques, et plus largement des voies de mort cellulaire, paraît indispensable pour définir des groupes de patients éligibles à une stratégie thérapeutique basée sur le ciblage de l'une ou l'autre d'entre elles. Le changement de paradigme doit aller au-delà en incluant la composante hétérogène de la tumeur, et en ne considérant pas l'impact de l'induction de l'apoptose à l'échelle de la cellule mais de l'écosystème tumoral. En cancérologie pédiatrique, le dernier challenge sera probablement d'identifier de nouveaux effecteurs impliqués dans la régulation fine de la balance apoptose/survie, sous l'angle développemental notamment afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques activables, de contourner les points de blocage des voies centrales, mais surtout de préserver l'intégrité des pools de cellules souches nécessaires à l'ontogenèse et au maintien de l'intégrité tissulaire tout au long de la vie future des enfants et adolescents atteints de cancers.

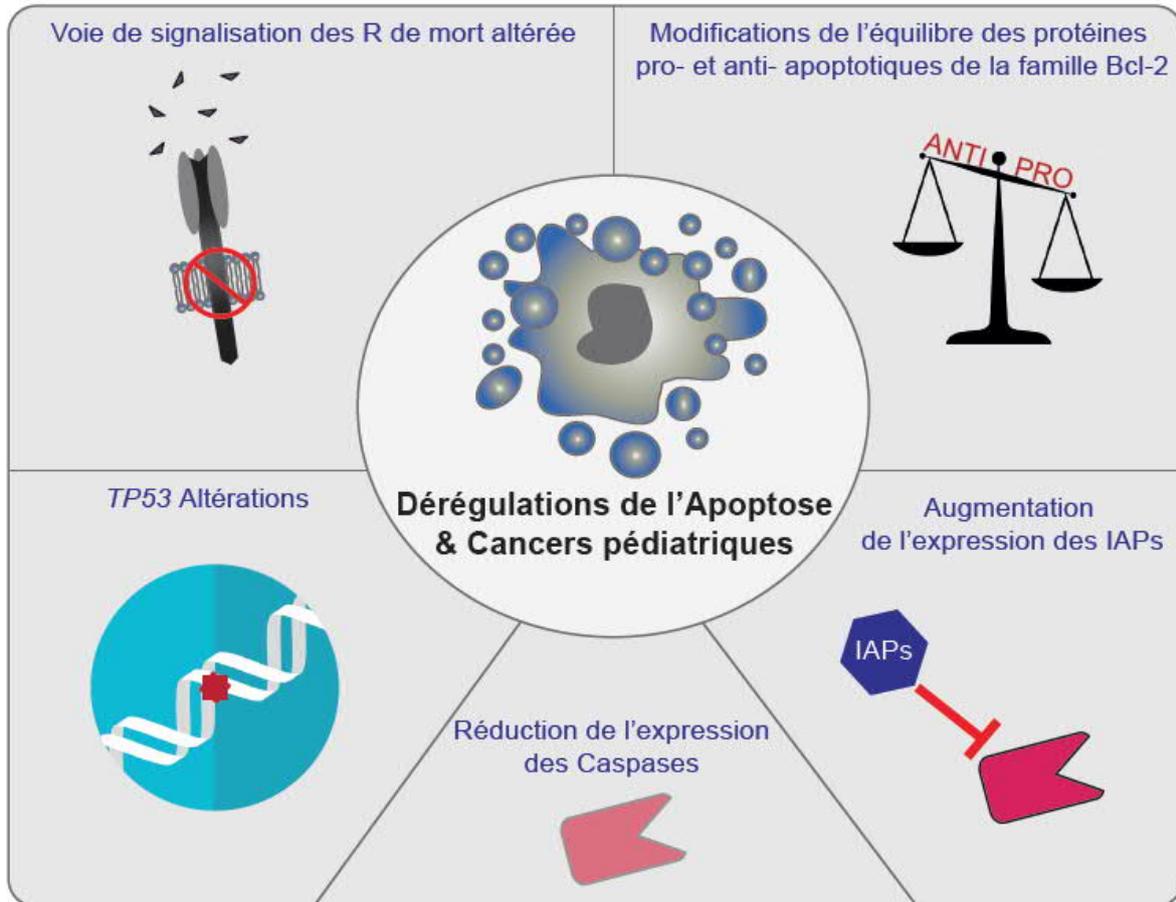


Figure 1 : Mécanismes contribuant à la résistance à l'apoptose et à la tumorigenèse dans les cancers pédiatriques. *R*, récepteur

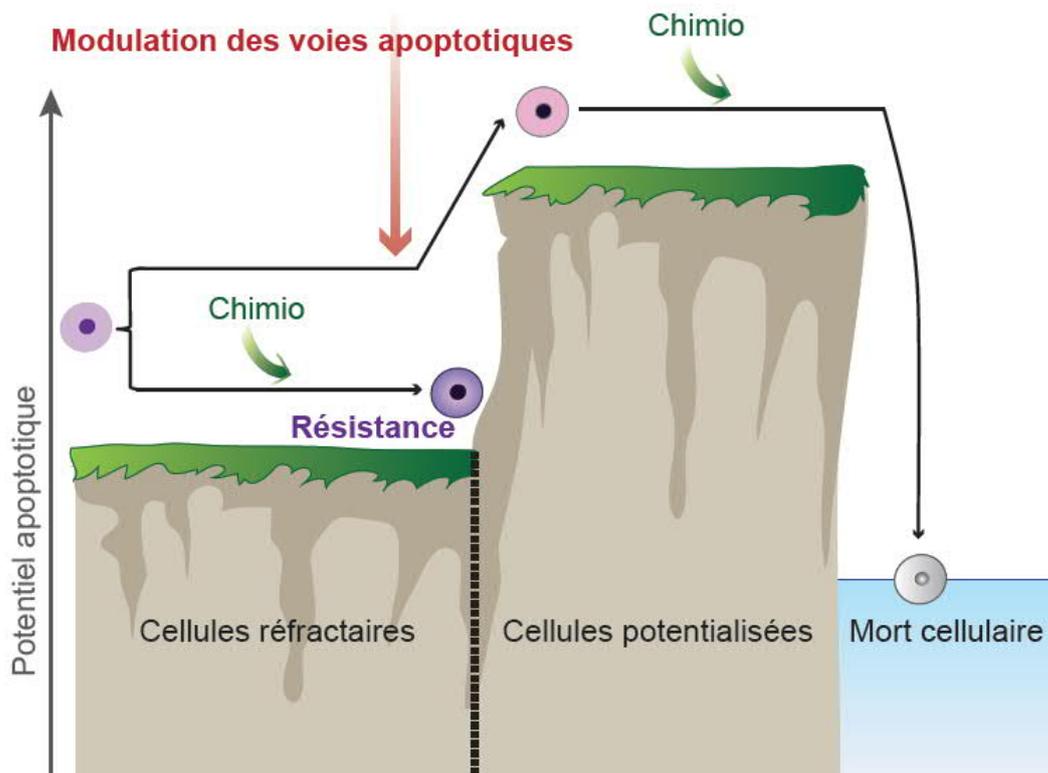


Figure 2 : Concept de « priming » apoptotique. L'efficacité des traitements de chimiothérapie dépendrait étroitement de l'état d'activation basale des voies apoptotiques dans les cellules tumorales, justifiant de fait l'utilisation de thérapies ciblant les voies apoptotiques en combinaison.

Bibliographie

1. Gatta G, Botta L, Rossi S, Aareleid T, Bielska-Lasota M, Clavel J, et al. Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EUROCARE-5--a population-based study. *The Lancet Oncology*. 2014;15(1):35-47.
2. Armstrong GT, Kawashima T, Leisenring W, Stratton K, Stovall M, Hudson MM, et al. Aging and risk of severe, disabling, life-threatening, and fatal events in the childhood cancer survivor study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(12):1218-27.
3. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;355(15):1572-82.
4. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *The New England journal of medicine*. 2009;361(16):1570-83.
5. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239-57.
6. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(2):135-47.
7. Fearnhead HO, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. How do we fit ferroptosis in the family of regulated cell death? *Cell death and differentiation*. 2017;24(12):1991-8.
8. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*. 2000;407(6805):796-801.
9. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging*. 2012;4(5):330-49.
10. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Fischer A. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell death and differentiation*. 2003;10(1):124-33.
11. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Annals of internal medicine*. 1999;130(7):591-601.
12. Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(3):231-7.
13. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular immunology*. 2003;39(11):615-47.
14. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
15. French LE, Tschopp J. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell death and differentiation*. 2003;10(1):117-23.
16. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2011;30:87.
17. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 1997;91(4):443-6.
18. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(33):21777-81.
19. Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? *Molecular cell*. 2008;30(2):123-35.
20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
21. Westhoff MA, Marschall N, Debatin KM. Novel Approaches to Apoptosis-Inducing Therapies. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;930:173-204.
22. Grobner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, Buchhalter I, Kleinheinz K, Rudneva VA, et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*. 2018;555(7696):321-7.

23. Carr-Wilkinson J, O'Toole K, Wood KM, Challen CC, Baker AG, Board JR, et al. High Frequency of p53/MDM2/p14ARF Pathway Abnormalities in Relapsed Neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(4):1108-18.
24. Pazzaglia L, Chiechi A, Conti A, Gamberi G, Magagnoli G, Novello C, et al. Genetic and molecular alterations in rhabdomyosarcoma: mRNA overexpression of MCL1 and MAP2K4 genes. *Histol Histopathol*. 2009;24(1):61-7.
25. Armistead PM, Salganick J, Roh JS, Steinert DM, Patel S, Munsell M, et al. Expression of receptor tyrosine kinases and apoptotic molecules in rhabdomyosarcoma: correlation with overall survival in 105 patients. *Cancer*. 2007;110(10):2293-303.
26. Wang ZX, Yang JS, Pan X, Wang JR, Li J, Yin YM, et al. Functional and biological analysis of Bcl-xL expression in human osteosarcoma. *Bone*. 2010;47(2):445-54.
27. Lestini BJ, Goldsmith KC, Fluchel MN, Liu X, Chen NL, Goyal B, et al. Mcl1 downregulation sensitizes neuroblastoma to cytotoxic chemotherapy and small molecule Bcl2-family antagonists. *Cancer biology & therapy*. 2009;8(16):1587-95.
28. Kunkele A, Grosse-Lordemann A, Schramm A, Eggert A, Schulte JH, Bachmann HS. The BCL2-938 C > A promoter polymorphism is associated with risk group classification in children with acute lymphoblastic leukemia. *BMC cancer*. 2013;13:452.
29. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*. 1998;281(5381):1317-22.
30. van Noesel MM, Versteeg R. Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'. *Gene*. 2004;325:1-15.
31. Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Boursouf KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N. Loss of caspase-8 expression in neuroblastoma is related to malignancy and resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Medical and pediatric oncology*. 2000;35(6):608-11.
32. Pingoud-Meier C, Lang D, Janss AJ, Rorke LB, Phillips PC, Shalaby T, et al. Loss of caspase-8 protein expression correlates with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(17):6401-9.
33. Fulda S. Cell death pathways as therapeutic targets in rhabdomyosarcoma. *Sarcoma*. 2012;2012:326210.
34. Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Boursouf KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N. Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer research*. 2000;60(16):4315-9.
35. Grotzer MA, Eggert A, Zuzak TJ, Janss AJ, Marwaha S, Wiewrodt BR, et al. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene*. 2000;19(40):4604-10.
36. Fulda S. Exploiting apoptosis pathways for the treatment of pediatric cancers. *Pediatric blood & cancer*. 2009;53(4):533-6.
37. Ichim G, Tait SW. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(8):539-48.
38. Sarosiek KA, Fraser C, Muthalagu N, Bhola PD, Chang W, McBrayer SK, et al. Developmental Regulation of Mitochondrial Apoptosis by c-Myc Governs Age- and Tissue-Specific Sensitivity to Cancer Therapeutics. *Cancer cell*. 2017;31(1):142-56.
39. Wachtel M, Schafer BW. Targets for cancer therapy in childhood sarcomas. *Cancer treatment reviews*. 2010;36(4):318-27.
40. Fulda S. Apoptosis pathways and neuroblastoma therapy. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(4):430-5.
41. Frommann K, Appl B, Hundsdoerfer P, Reinshagen K, Eschenburg G. Vincristine resistance in relapsed neuroblastoma can be efficiently overcome by Smac mimetic LCL161 treatment. *Journal of pediatric surgery*. 2018;53(10):2059-64.
42. Najem S, Langemann D, Appl B, Trochimiuk M, Hundsdoerfer P, Reinshagen K, et al. Smac mimetic LCL161 supports neuroblastoma chemotherapy in a drug class-dependent

manner and synergistically interacts with ALK inhibitor TAE684 in cells with ALK mutation F1174L. *Oncotarget*. 2016;7(45):72634-53.

43. Fulda S. Targeting apoptosis pathways in childhood malignancies. *Cancer letters*. 2013;332(2):369-73.
44. Place AE, Goldsmith K, Bourquin JP, Loh ML, Gore L, Morgenstern DA, et al. Accelerating drug development in pediatric cancer: a novel Phase I study design of venetoclax in relapsed/refractory malignancies. *Future oncology*. 2018;14(21):2115-29.
45. Westhoff MA, Marschall N, Grunert M, Karpel-Massler G, Burdach S, Debatin KM. Cell death-based treatment of childhood cancer. *Cell death & disease*. 2018;9(2):116.
46. Dillon CP, Green DR. Molecular Cell Biology of Apoptosis and Necroptosis in Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;930:1-23.
47. Lemke J, von Karstedt S, Zinngrebe J, Walczak H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell death and differentiation*. 2014;21(9):1350-64.
48. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research*. 2006;66(19):9339-44.
49. Safa AR. Resistance to Cell Death and Its Modulation in Cancer Stem Cells. *Critical reviews in oncogenesis*. 2016;21(3-4):203-19.
50. Burdach SEG, Westhoff MA, Steinhauser MF, Debatin KM. Precision medicine in pediatric oncology. *Molecular and cellular pediatrics*. 2018;5(1):6.
51. Gregory CD, Ford CA, Voss JJ. Microenvironmental Effects of Cell Death in Malignant Disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;930:51-88.
52. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*. 2012;21(3):309-22.
53. Mlecnik B, Bindea G, Kirilovsky A, Angell HK, Obenauf AC, Tosolini M, et al. The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Science translational medicine*. 2016;8(327):327ra26.
54. Finnberg NK, Gokare P, Lev A, Grivennikov SI, MacFarlane AWt, Campbell KS, et al. Application of 3D tumoroid systems to define immune and cytotoxic therapeutic responses based on tumoroid and tissue slice culture molecular signatures. *Oncotarget*. 2017;8(40):66747-57.
55. Brigati C, Noonan DM, Albin A, Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clinical & experimental metastasis*. 2002;19(3):247-58.
56. Borchering N, Kolb R, Gullicksrud J, Vikas P, Zhu Y, Zhang W. Keeping Tumors in Check: A Mechanistic Review of Clinical Response and Resistance to Immune Checkpoint Blockade in Cancer. *Journal of molecular biology*. 2018;430(14):2014-29.
57. Gifford GE, Loewenstein J, Yamin A, Gallily R. Correlation of macrophage-mediated tumor-cell lysis with the production of macrophage cytolytic factor (CF). Preliminary characterization of a factor inhibiting CF production. *International journal of cancer*. 1986;37(1):73-9.
58. Shree T, Olson OC, Elie BT, Kester JC, Garfall AL, Simpson K, et al. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes & development*. 2011;25(23):2465-79.
59. Mitchem JB, Brennan DJ, Knolhoff BL, Belt BA, Zhu Y, Sanford DE, et al. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer research*. 2013;73(3):1128-41.
60. Dabrowska C, Li M, Fan Y. Apoptotic Caspases in Promoting Cancer: Implications from Their Roles in Development and Tissue Homeostasis. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016;930:89-112.
61. Nicolai S, Pieraccioli M, Peschiaroli A, Melino G, Raschella G. Neuroblastoma: oncogenic mechanisms and therapeutic exploitation of necroptosis. *Cell death & disease*. 2015;6:e2010.
62. Marshall GM, Carter DR, Cheung BB, Liu T, Mateos MK, Meyerowitz JG, et al. The prenatal origins of cancer. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(4):277-89.

63. Dempke WCM, Fenchel K, Uciechowski P, Chevassut T. Targeting Developmental Pathways: The Achilles Heel of Cancer? *Oncology*. 2017;93(4):213-23.
64. Schwartz LM, Gao Z, Brown C, Parelkar SS, Glenn H. Cell death in myoblasts and muscles. *Methods Mol Biol*. 2009;559:313-32.
65. Komori T. Cell Death in Chondrocytes, Osteoblasts, and Osteocytes. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12).
66. Ahmed AA, Mohamed AD, Gener M, Li W, Taboada E. YAP and the Hippo pathway in pediatric cancer. *Molecular & cellular oncology*. 2017;4(3):e1295127.
67. Crose LE, Galindo KA, Kephart JG, Chen C, Fitamant J, Bardeesy N, et al. Alveolar rhabdomyosarcoma-associated PAX3-FOXO1 promotes tumorigenesis via Hippo pathway suppression. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(1):285-96.
68. Tremblay AM, Missiaglia E, Galli GG, Hettmer S, Urcia R, Carrara M, et al. The Hippo transducer YAP1 transforms activated satellite cells and is a potent effector of embryonal rhabdomyosarcoma formation. *Cancer cell*. 2014;26(2):273-87.

L'autophagie représente également un moyen de contrôle du développement tumoral. Chez les mammifères, Elgendy et al. ont rapporté que, dans une lignée humaine de neuroblastome la mort induite par H-Ras^{v12} est seulement effective lorsque les gènes de l'autophagie ATG5, ATG7 ou Beclin1 sont actifs. Ce mécanisme régulé par les protéines de l'autophagie permettrait de limiter les effets oncogéniques de Ras, fréquemment dérégulé dans les cancers [69].

Il est également intéressant de noter que le système de dérégulation de la mort dans les cancers est complexe. En effet, il a par exemple été observé dans un modèle murin de lymphomes qu'inhiber l'autophagie favorise l'induction de l'apoptose et promeut la régression des tumeurs [70]. Et réciproquement, plusieurs études ont montré que dans les tumeurs résistantes à la mort apoptotique, il est possible grâce à des traitements de type radiothérapie d'induire une mort de type autophagique notamment par la voie TLR9-ERK-mTOR [71]. Il pourrait donc exister des moyens de contourner le blocage d'une voie de mort cellulaire dans les tumeurs en utilisant les autres types.

3. Tumorigénese et changements métaboliques

a. Introduction et définition

Le métabolisme est l'ensemble des processus par lesquels les molécules biologiques sont dégradées puis re-synthétisées. Il se décompose en deux parties:

- le catabolisme, ou l'ensemble des réactions enzymatiques de dégradation des macromolécules, produisant de l'énergie, du pouvoir réducteur et des molécules simples.
- l'anabolisme, correspondant aux réactions de synthèse de macromolécules, utilisant de l'énergie et consommant les produits du catabolisme.

Comme vu précédemment, la reprogrammation du métabolisme énergétique a été décrite en 2011 comme une caractéristique de la tumorigénese [28]. Les cellules tumorales acquièrent la capacité de moduler leur métabolisme énergétique dans le but de soutenir une prolifération importante dans un environnement non physiologique.

b. La glycolyse

La glycolyse ou voie d'Embden-Meyeroff-Parnas est l'une des premières voies métaboliques à avoir été décrite et complètement élucidée dès 1940. La glycolyse consiste en la transformation d'une molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate, associée à la production nette de 2 molécules d'ATP. L'ensemble de ces réactions a lieu exclusivement dans le cytosol chez tous les organismes eucaryotes, soit en présence d'oxygène (glycolyse aérobie), soit en absence d'oxygène ou hypoxie (glycolyse anaérobie). Ces deux phases ne diffèrent que dans l'utilisation finale du produit de la glycolyse : le pyruvate (**Figure 13**).

- En aérobie, celui-ci est transformé en acétyl-coA afin d'alimenter le cycle de Krebs mitochondrial où il sera complètement oxydé en CO₂. La production d'équivalents réducteurs par le cycle de Krebs permet l'initiation de la phosphorylation oxydative qui produit une quantité importante d'ATP.
- En anaérobie, il est transformé en lactate, dans le cadre par exemple de la fermentation lactique observée dans les cellules musculaires pendant un effort violent ou encore dans les érythrocytes qui ne possèdent pas de mitochondrie. Ce processus est détourné dans certaines conditions pathologiques et notamment dans les cellules cancéreuses.

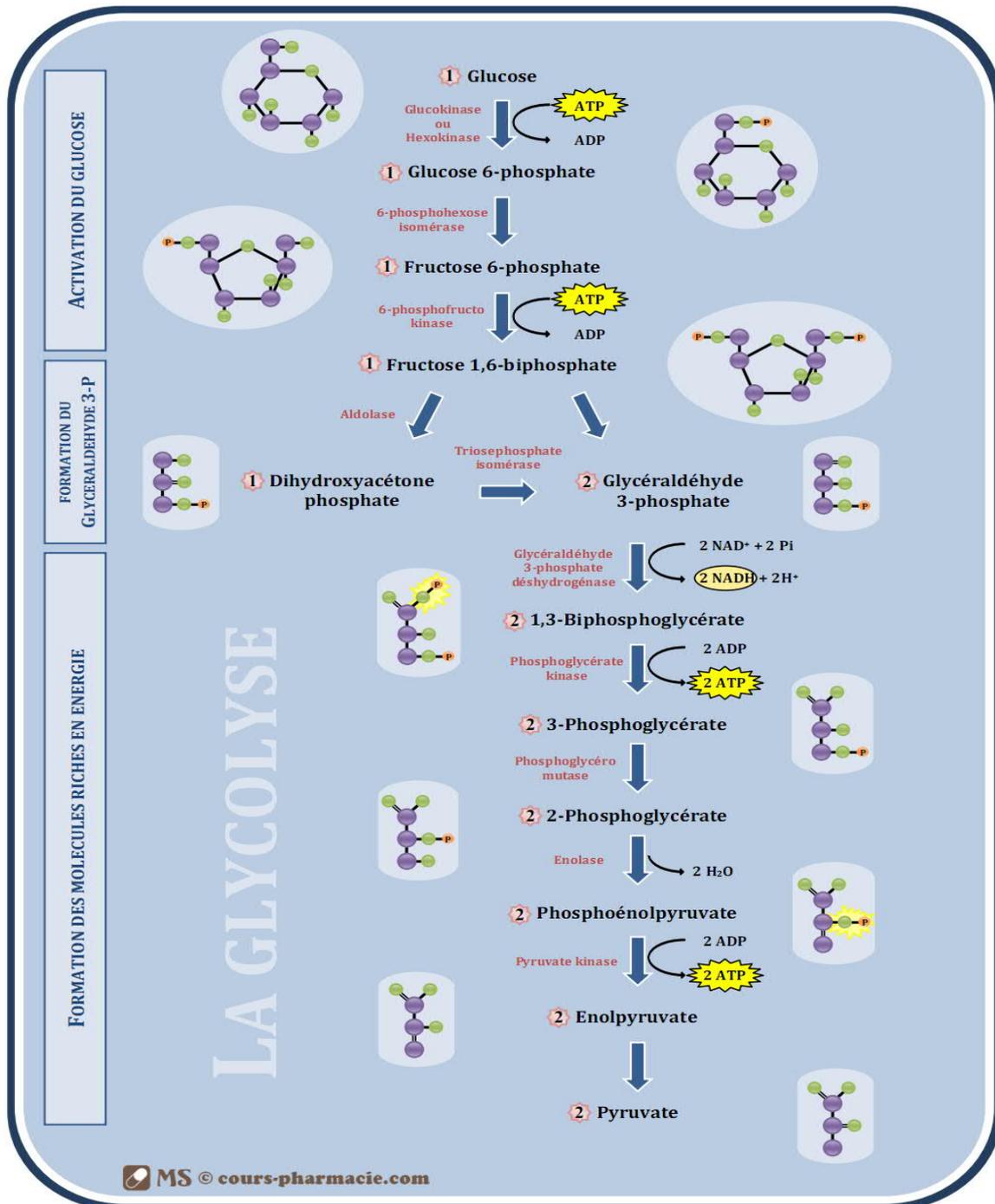


Figure 13: Schéma de la glycolyse, aboutissant à la transformation du glucose en pyruvate, avec production de 2 molécules d'ATP [72].

c. La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est une réaction permettant la synthèse d'ATP au niveau de la mitochondrie en conditions aérobies. Elle repose sur l'action conjuguée des complexes protéiques de la chaîne respiratoire située sur la membrane interne de la mitochondrie et de l'ATP synthase. Au niveau de la chaîne respiratoire, un transfert d'électrons s'opère entre les

équivalents réduits NADH,H^+ et FADH_2 issus du catabolisme des nutriments (lipides, glucides) jusqu'à un accepteur final: l'oxygène. A ce flux d'électrons est associé un transfert actif de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire générant une force, la force proton-motrice. La phosphorylation oxydative est le processus de couplage entre le transfert d'électrons (oxydation) et la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique P_i (phosphorylation), l'énergie nécessaire à cette réaction étant fournie par la force promotrice, *via* l'ATP synthase [73]. Quatre complexes constituent la chaîne respiratoire dont 3 s'avèrent être des pompes à protons:

Complexe I : NADH ubiquinone oxydoréductase. Le complexe I est le plus gros composant protéique de la membrane interne de la mitochondrie. L'oxydation du coenzyme NADH,H^+ qui a lieu sur la face matricielle de la membrane par la NADH-déshydrogénase produit 2 électrons qui sont transférés jusqu'à l'ubiquinone (CoQ). Le complexe I est la première pompe à proton de la chaîne respiratoire: il permet le transport de quatre protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire.

Complexe II : Succinate-deshydrogénase. Le complexe II catalyse la ré-oxydation du succinate en fumarate qui, par l'intermédiaire de l'oxydation du FADH_2 et de la réduction d'ubiquinone, permet le transfert de deux électrons vers le complexe III. Ce transfert d'électrons est le seul à ne pas être couplé à un efflux de protons.

Complexe III : Complexe b-c1 (ubiquinone-cytochrome c réductase). Les quinones sont des transporteurs libres d'électrons des complexes I et II vers le complexe III. Ces dernières permettent un transfert d'électrons au cytochrome C, un deuxième transporteur mobile situé dans l'espace intermembranaire et qui relie le complexe III au complexe IV. Ce transfert d'électrons, également associé à un efflux de quatre protons, fait du complexe III la deuxième pompe à protons de la chaîne respiratoire.

Complexe IV : cytochrome c oxydase. Le complexe IV catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction entre le cytochrome c et l'oxygène, qui est réduit en H_2O par quatre électrons. Ce transfert d'électrons est irréversible, contrairement à ceux qui ont lieu entre les complexes I, II et III mais est aussi associé à un efflux de deux protons faisant de ce complexe le dernier site de couplage de la mitochondrie.

Complexe V : ATP synthase. Il n'est pas toujours considéré comme un complexe à part entière. L'ATP synthase utilise la force proton-motrice afin de produire l'ATP à partir de l'ADP et de P_i . Ainsi, il constitue la dernière étape de la chaîne respiratoire. On peut diviser ce complexe en deux: la partie catalytique (F_1) se situant du côté matriciel, la partie membranaire constituant le canal (F_o).

Export de l'ATP vers la cellule. L'export d'ATP hors de la mitochondrie est couplé à l'import d'ADP. Ce processus est réalisé grâce à des transporteurs de nucléotides adényliques (la famille des protéines ANT qui sera décrite plus loin) en créant un pore avec différentes protéines, dont les protéines VDAC.

d. Altérations du métabolisme et tumorigenèse : zoom sur l'effet Warburg

La glycolyse est un processus métabolique indispensable pour produire de l'énergie dans les cellules. Dans les cellules cancéreuses, cette réaction est très souvent dérégulée comme dans de nombreuses autres pathologies comme par exemple l'obésité ou le diabète. Otto Warburg (1883-1970) fut le premier à décrire les dérégulations métaboliques des cellules malignes. Ses premiers travaux en 1920 sur des cellules tumorales l'ont conduit à observer à ce que l'on appelle aujourd'hui l'effet Warburg. Cet effet désigne la persistance de la transformation du glucose en lactate dans les cellules cancéreuses même en présence d'oxygène [74]. Les cellules saines utilisent généralement ce métabolisme seulement en anaérobie et lui préfère la phosphorylation oxydative en aérobie, plus efficace en termes de rendement. La glycolyse anaérobie ne fournit en effet que 2 ATP à partir d'une molécule de glucose alors que la glycolyse aérobie combinée à la phosphorylation oxydative en produit 30 à 32 [75]. La glycolyse anaérobie semble toutefois privilégiée par les cellules cancéreuses, car elle permet une production plus rapide d'ATP, adaptée à leur taux de prolifération. La théorie d'Otto Warburg connut un véritable engouement dans la population scientifique et d'innombrables études ont depuis montré la pertinence de ses observations dans de nombreux types de cancers. Les conclusions de Warburg ont même eu un effet direct en clinique : la consommation accrue de glucose par les cellules tumorales peut en effet être observée par la technique de tomographie par émission de positons (TEP) scan, basée sur l'observation d'une plus grande consommation du glucose par les cellules cancéreuses à l'aide d'un marquage ^{18}F -déoxyglucose, au moment du diagnostic notamment.

Sur le plan mécanistique, Warburg avait dans un premier temps supposé que cette utilisation accrue de la glycolyse au dépend de la phosphorylation oxydative dans les cellules cancéreuses résultait d'anomalies au niveau des mitochondries. Ces dernières années, de nombreux auteurs ont montré une consommation d'oxygène par les cellules cancéreuses. Warburg lui-même avait écrit : *“As a rule, the respiration of the tumour cell is small, but in recent years tumour cells with a large respiration have also been found...”* (Warburg Otto 1931). Weinhouse, dans les années 1950, montra que les tumeurs et les tissus non-néoplasiques ne présentent pas de différence dans leur capacité à convertir le glucose et les acides gras en dioxyde de carbone, un processus qui requiert la respiration et des mitochondries fonctionnelles [76]. Depuis, plusieurs études ont même montré que certains types de cellules cancéreuses pouvaient utiliser davantage le métabolisme OXPHOS, c'est à dire basée sur la phosphorylation oxydative, que la glycolyse pour produire l'ATP [77]. Les cellules utiliseraient donc volontairement l'effet Warburg pour augmenter l'utilisation des voies métaboliques annexes et pour produire une quantité importante de métabolites intermédiaires (bases nucléotidiques, acides-gras) nécessaires à la croissance tumorale. Enfin, l'utilisation préférentielle de la glycolyse permet également de maintenir l'équilibre redox de la cellule tumorale en limitant à la production de ROS [78].

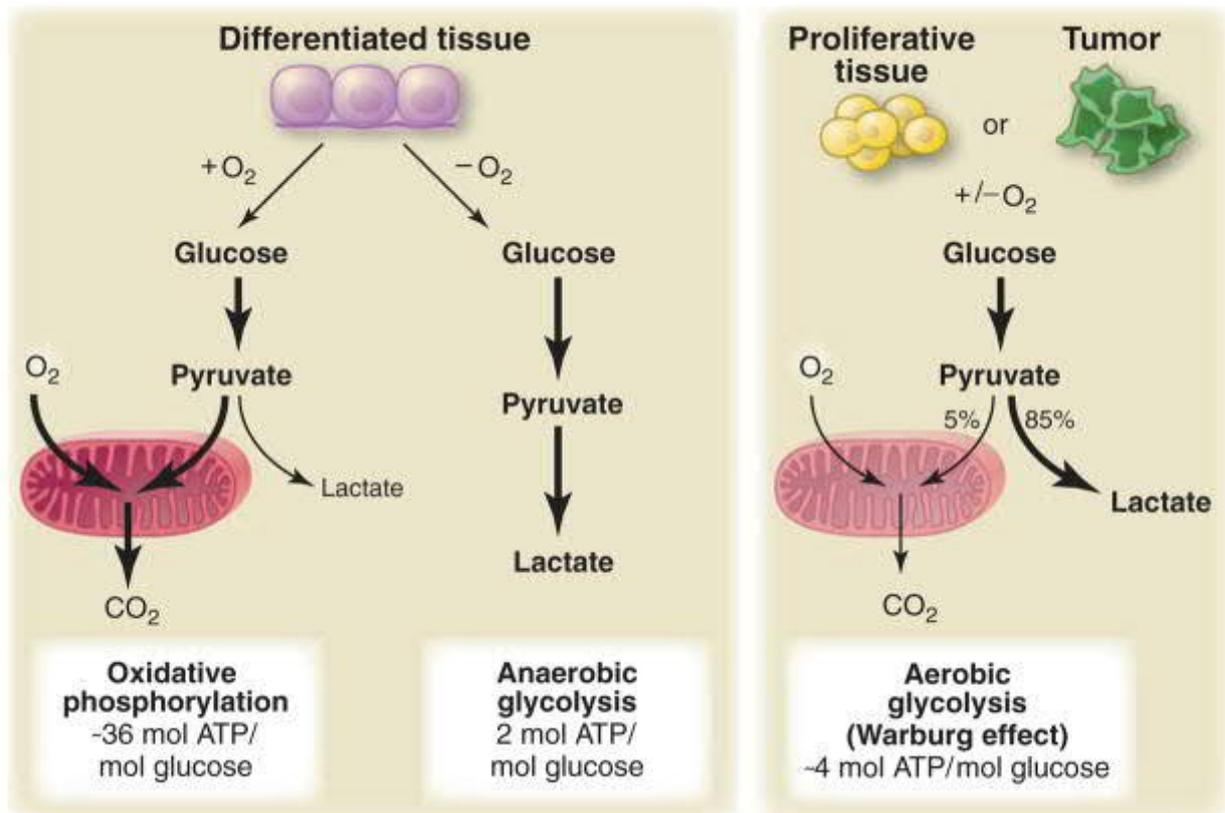


Figure 14: Représentation schématique des différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie (effet Warburg).

En présence d'oxygène, les tissus non prolifératifs (différenciés) métabolisent d'abord le glucose en pyruvate via la glycolyse, puis oxydent complètement la plus grande partie de ce pyruvate dans les mitochondries en CO₂, au cours du processus de phosphorylation oxydative. L'oxygène est essentiel pour ce processus en tant qu'accepteur final d'électrons pour oxyder complètement le glucose. Lorsque l'oxygène est limitant, les cellules peuvent détourner le pyruvate généré par la glycolyse en générant du lactate (glycolyse anaérobie). Cette génération de lactate au cours de la glycolyse anaérobie permet la poursuite de la glycolyse, mais entraîne une production réduite d'ATP par rapport à la phosphorylation oxydative. Warburg a observé que les cellules cancéreuses ont tendance à convertir la plupart du glucose en lactate, que l'oxygène soit présent ou non (glycolyse aérobie). Cette propriété est partagée par les tissus prolifératifs normaux. Les mitochondries restent tout de même fonctionnelles et une phosphorylation oxydative se poursuit dans les cellules cancéreuses et les cellules prolifératives saines. Néanmoins, la glycolyse aérobie est moins efficace que la phosphorylation oxydative pour générer de l'ATP[75].

Au niveau moléculaire, plusieurs dérégulations favorisant la glycolyse ont été décrites dans les cellules cancéreuses:

i. Dérégulation des transporteurs du glucose

Les protéines de transport passif du glucose (GLUT) sont fréquemment surexprimées à la surface des cellules cancéreuses, de manière concomitante à une hausse de la glycolyse. Par exemple, l'expression de GLUT1 et GLUT3 est accrue dans les leucémies aigües lymphoblastiques B [79].

ii. Dérégulation des enzymes du métabolisme du glucose

Les enzymes impliquées dans la voie glycolytique comme HK2, PFK2 et PKM2 sont surexprimées dans de nombreux cancers[80].

- L'hexokinase 2 (HK2) : HK2 est l'enzyme qui catalyse la première réaction de la glycolyse (transformation du Glucose en G6P). HK2 est l'isoforme la plus souvent exprimée dans les cellules cancéreuses. Il a été montré que HK2 en se liant à différentes protéines partenaires est capable d'augmenter la synthèse de G6P et de réguler la progression tumorale. Ainsi, HK2 peut interagir directement avec les protéines GLUT pour faciliter l'entrée du glucose dans la cellule mais peut aussi interagir avec les canaux VDAC au niveau des pores externes de la mitochondrie afin d'importer l'ATP nécessaire au maintien du potentiel mitochondrial par le biais à l'adénosine nucléotide translocase de type 2 (ANT2) [81]. Cette liaison avec VDAC permet le blocage de l'apoptose résultant de la dimérisation de BAX. L'expression de HK2 est par exemple surexprimée dans le glioblastome humain multiforme (GBM, tumeur cérébrale maligne la plus fréquente) et est associée à un mauvais pronostic [82].
- La phosphofructokinase-2 (PFK-2): la PFK2 est une enzyme permettant la modulation de la glycolyse et qui possède des propriétés de type phosphatase et kinase. La PFK-2 est surexprimée dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses et elle est nécessaire à la croissance des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*. Une diminution de son activité entraîne une baisse du taux intracellulaire du 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate, produit de la voie des pentoses et précurseur important pour la biosynthèse des bases azotées. Cet exemple souligne un rôle secondaire du glucose, en tant que précurseur de la synthèse des acides nucléiques *via* la voie des pentoses nécessaire à une croissance rapide des cellules cancéreuses [83].
- La pyruvate kinase isoenzyme type M2 (PKM2): l'isoenzyme PKM2 est l'enzyme qui catalyse la dernière étape de la glycolyse. Elle est activée préférentiellement dans les cellules indifférenciées et les cellules cancéreuses, contrairement à l'isoenzyme M1 (PKM1), normalement exprimée dans des cellules différenciées. Au cours de l'épissage alternatif dans les cellules cancéreuses, l'expression de l'isoforme PKM2 est privilégiée, supprimant de fait la production de l'isoforme PKM1. Ceci confère un avantage sélectif aux cellules tumorales en déviant les intermédiaires de la glycolyse en amont vers les voies anaboliques, ce qui facilite la synthèse d'acides nucléiques et de composés nécessaires à la prolifération cellulaire [84]. Il a été démontré que la perte d'expression de PKM2 dans un modèle conditionnel de cellules de fibroblastes embryonnaire murins conduit à une augmentation de l'expression de PKM1 associée à une diminution de la prolifération cellulaire [85].

iii. Stimulation de la glycolyse par des oncogènes

- Hypoxia inducible factor 1 α (HIF1 α): le facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF-1) est responsable de l'induction de nombreux gènes impliqués dans l'adaptation des cellules cancéreuses à l'hypoxie, stress fréquent dans les tumeurs. Il en résulte alors une augmentation de l'expression de certaines enzymes, telle que la pyruvate deshydrogénase kinase 1 (PDK1), qui phosphoryle et inhibe le complexe PDH. La transformation du pyruvate en acétyl-CoA est alors bloquée et contraint la cellule à produire du lactate (**Figure 15**) [86].

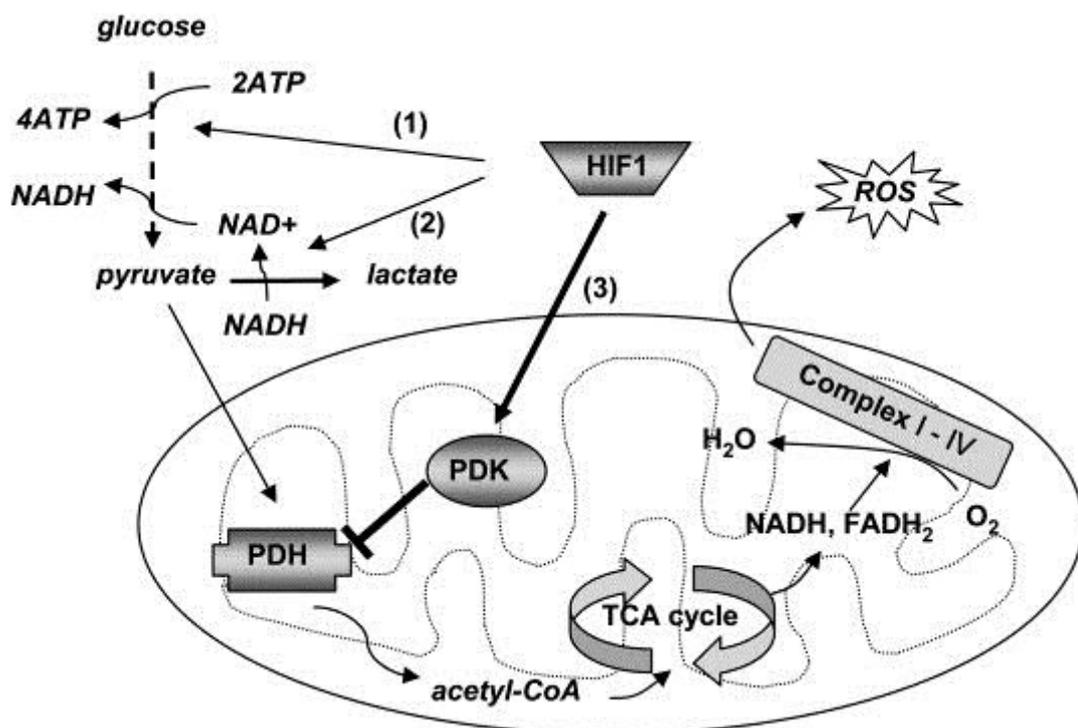


Figure 15: Régulations métaboliques induites par l'hypoxie via HIF-1.

Sous hypoxie, HIF1 α active PDK1 qui inhibe le complexe PDH, bloquant ainsi la transformation du pyruvate en Acétyl-CoA, ce qui contraint la cellule à produire du lactate.

- MYC : MYC est un facteur de transcription régulant de nombreux gènes, notamment impliqués dans la transformation du glucose en pyruvate et, finalement, en lactate. Parmi ces gènes, on trouve la lactate déshydrogénase (LDHA), le transporteur de glucose GLUT1, HK2 et PDK1 [87]. MYC contrôle également l'épissage alternatif de PKM2 au dépend de PKM1 [88]. Par ailleurs, MYC est aussi connu pour stimuler d'autres voies métaboliques comme celle de la glutaminolyse (transformation de la glutamine en glutamate) en induisant la dégradation de la glutamine et en stimulant l'expression de la glutaminase. Il a aussi un impact sur la biosynthèse des sérines et

des lipides, et permet ainsi aux cellules tumorales d'utiliser différentes voies métaboliques pour soutenir leur croissance élevée.

- p53: p53 participe également à la régulation du métabolisme [89]. En effet, p53 contrôle négativement la glycolyse en activant l'expression du gène TIGAR (TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator), qui réduit le niveau du fructose-2,6-bisphosphate intracellulaire [90]. De plus, p53 réduit le taux de glucose intracellulaire en inhibant l'expression des transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT4 [91]. Ces données suggèrent que l'inactivation de p53 pourrait promouvoir la tumorigénèse en diminuant la dépendance cellulaire à l'oxygène et en permettant la croissance des cellules en anaérobie.

4. La mitochondrie, clé de voute de la balance vie/mort

a. Généralités

La mitochondrie est un organite clé de la mort cellulaire programmée et du métabolisme cellulaire.

La mitochondrie est organisée en plusieurs sous parties:

- Une membrane externe composée d'une bicouche lipidique pouvant faire de 5 à 7 nm d'épaisseur. Elle est perméable à de nombreuses molécules et contient des protéines de transport (porines) comme les protéines VDAC (Voltage Dependant Anion Channel) laissant passer les molécules de taille inférieure à 10 kDa (comme les acides gras, les acides aminés...) vers la matrice mitochondriale.
- Un espace intermembranaire. Dans cet espace, les concentrations ioniques du potassium, du calcium, du sodium et du chlore sont proches de celles retrouvées dans le cytosol. Cet espace contient aussi des protons (H⁺) expulsés au cours de la phosphorylation oxydative. Le cytochrome c et des protéines impliquées dans l'apoptose intrinsèque, comme certaines procaspases ou les protéines mitochondriales activatrices de l'apoptose Smac/DIABLO et AIF [92], sont également localisés dans cette zone.
- Une membrane interne imperméable aux ions et aux petites molécules. Elle contient de nombreuses protéines de transport permettant la perméabilité sélective de cette bicouche lipidique. Dans cette membrane, se trouvent les complexes protéiques nécessaires au processus de phosphorylation oxydative. Sa surface est supérieure à celle de la membrane externe du fait de la présence de replis ou « crêtes » qui

s'étendent vers la matrice. De nombreux transporteurs comme l'antiport d'échange ADP cytosolique/ATP mitochondriale (ANT), les symports pyruvate/H⁺, acide gras/H⁺ et phosphate inorganique/H⁺ sont retrouvés dans cette membrane.

- Une matrice mitochondriale dans laquelle se déroulent diverses voies métaboliques comme le cycle de Krebs et la β -oxydation des acides gras. Une des particularités de la mitochondrie est qu'elle possède son propre ADN appelé ADN mitochondrial (ADNmt), même si une grande partie des protéines mitochondriales sont codées par l'ADN nucléaire.

La mitochondrie est donc le siège de réactions biochimiques clés du métabolisme cellulaire mais également un organite au carrefour de voies de mort cellulaire. La régulation de son activité est donc un enjeu essentiel dans le fonctionnement cellulaire. Réciproquement, des dysfonctionnements de l'activité mitochondriale notamment par altération des perméabilités membranaires sont impliqués dans de nombreuses pathologies, et notamment dans les cancers.

b. Production d'espèces oxygénées réactives (ROS) par la mitochondrie

Les espèces oxygénées réactives (ROS) sont des molécules chimiques oxygénées pouvant entraîner l'oxydation d'autres molécules. Parmi les ROS, on retrouve en majorité l'anion superoxyde (O₂⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le radical hydroxyle (OH[•]) et les radicaux peroxydes (RCOO[•] et ROO[•]).

La mitochondrie est le site préférentiel de production de ROS, notamment au niveau de la chaîne respiratoire. Selon certains auteurs, sur des mitochondries isolées en culture *in-vitro*, 1 à 3% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie est incomplètement réduit et produit des ROS [93]. La production de ROS serait ceci dit moins importante *in-vivo* environ (0,4 à 0,8%).

Il existe deux sites majeurs de production de ROS le long de la chaîne respiratoire, au niveau des complexes I et III. Dans des conditions physiologiques, le transport des électrons est couplé à la synthèse d'ATP. Toutefois, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyl, sont des produits excédentaires issus du flux de la chaîne respiratoire [94]. En conditions limitantes en ADP, la diminution de la phosphorylation augmente la fuite d'électrons et entraîne la production d'anion superoxyde. L'anion superoxyde est donc le précurseur de la plupart des ROS, puisque c'est le premier produit issu de la fuite d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire.

La production de ROS n'est toutefois pas limitée à la mitochondrie : la β -oxydation des acides gras dans les peroxysomes produit par exemple du H₂O₂. Les enzymes microsomiales cytochrome P-450, qui métabolisent des composés xénobiotiques, réduisent directement l'O₂ en O₂⁻. Les phagocytes, eux, attaquent les corps étrangers avec un cocktail d'oxydants et de

radicaux libres. Enfin, plusieurs enzymes sont aptes à produire des oxydants dans des conditions physiologiques normales ou pathologiques [95].

Une production modérée de ROS dans les cellules sert de messenger pour stimuler la croissance et la prolifération cellulaire en activant certaines voies de prolifération comme PI3K-AKT, NFκB ou encore le facteur HIF1α en cas d'hypoxie [96]. Ces mécanismes sont détournés par les cellules cancéreuses. Une production soutenue de ROS peut conduire à la mort cellulaire par altération des acides nucléiques, des protéines ou des lipides, notamment par action du radical hydroxyle (OH.) [97]. Les dommages cellulaires massifs induits par les ROS ont longtemps été associés à une mort de la cellule par nécrose. Néanmoins, le stress oxydant est également à l'origine du déclenchement de l'apoptose [98]. Les ROS interviennent au niveau de la perméabilisation de la mitochondrie, et de nombreuses études ont montré que les ROS, tout comme le Ca²⁺, induisent l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) qui sera décrit plus loin dans ce mémoire [99] et le relargage du cytochrome c.

La formation d'H₂O₂ peut, en présence de fer, induire la production de radicaux hydroxyles (OH.) par la réaction de Fenton, entraînant là aussi des dommages de l'ADN, une oxydation protéique et une peroxydation lipidique pouvant aboutir à la mort par ferroptose.

Cette production de ROS est contrôlée par un système antioxydant permettant à la cellule de réguler le niveau de ces éléments potentiellement nocifs pour son intégrité. Plusieurs familles d'enzymes participent à la réduction des ROS. Ainsi, l'anion superoxyde peut être pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD) transformant l'O₂⁻ en H₂O₂. La SOD se trouve sous deux formes dans les cellules eucaryotes : Cu/ZnSOD dans le cytoplasme et l'espace intermembranaire mitochondrial, et MnSOD dans la matrice mitochondriale [100]. La dégradation de l'H₂O₂ s'effectue grâce à des enzymes antioxydantes comme la glutathion peroxydase 4 (GPx4) au niveau mitochondrial. Cette enzyme permet la formation de molécule d'eau et de glutathion disulfite. Ces systèmes antioxydants permettent de maintenir le potentiel redox de la cellule pour éviter tout dysfonctionnement pathologique, et notamment l'échappement tumoral ou la mort cellulaire selon le contexte.

c. Régulation de la perméabilité membranaire mitochondriale : enjeux et rôle clé du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP)

Il a été reconnu il y a plus de 50 ans que les mitochondries exposées à de fortes concentrations de calcium extracellulaire peuvent subir un gonflement massif par entrée de liquide à travers les membranes mitochondriales et que ce phénomène pouvait être reversé par des chélateurs de calcium [101]. Des études pionnières de Haworth et Hunter [102] et plus tard de Crompton et al. [103] ont démontré que l'augmentation de la perméabilité associée à ce gonflement résultait de l'ouverture d'un canal non spécifique laissant passer les molécules de poids moléculaire inférieur à 1,5 kDa. L'ouverture de ce canal, nommé pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP), déclenche la perméabilisation de la

membrane interne. L'influx d'ions associé s'accompagne d'un effondrement du potentiel de la membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$). En cas d'ouverture du mPTP, la dissipation du $\Delta\Psi_m$ induit l'arrêt de la synthèse d'ATP et même l'hydrolyse de l'ATP, puisque l'ATP synthase se met à fonctionner en sens inverse. Le gonflement de la matrice peut aller jusqu'à la rupture de la membrane externe. En cas de stress mitochondrial, l'ouverture du mPTP représente donc pour la cellule un point de non-retour vers la mort cellulaire, qu'elle soit de nature nécrotique ou apoptotique. L'ouverture du pore peut être activée par le Ca^{2+} , le phosphate inorganique et les ROS, et est inhibée par les adénines nucléotides, un pH acide, les cations divalents comme le Mg^{2+} et les inhibiteurs de la Cyclophiline D, la Cyclosporine A et la sanglifehrin A [104].

d. Composition du mPTP

Le mPTP est un assemblage multi-protéique qui comporterait l'adénosine nucléotide translocase (ANT), la cyclophiline D (CypD), la porine (voltage dependent anion channel, VDAC), ainsi que des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL et BAX). Cependant, des études récentes basées sur l'étude de modèles animaux génétiquement modifiés ont remis en doute l'architecture du mPTP, puisque son ouverture reste possible en absence de certains de ses composants. De nouvelles protéines ont aussi été proposées comme faisant partie de ce pore.

i. La cyclophiline D (CypD)

La CypD est une protéine matricielle d'un faible poids moléculaire d'environ 19-20 kDa exprimée dans la matrice mitochondriale. L'implication de la CypD dans la régulation du mPTP a été découverte grâce à l'étude de la Cyclosporine A, qui inhibe l'activité de la CypD [105]. Dans un modèle de souris invalidé pour la CypD, l'ouverture du mPTP et le déclenchement de la mort cellulaire sont inhibés lors de stress calcique ou oxydant suggérant que la CypD soit un constituant essentiel du pore [106] [107]. La CypD peut lier directement de nombreux composants du mPTP. Toutefois, le mécanisme exact par lequel la CypD régule l'ouverture du mPTP n'a pas encore été déterminé.

ii. VDAC

Les protéines VDAC représentent une famille de canaux ioniques. Ce sont des pores non sélectifs aux anions et cations, et compte-tenu des similitudes entre les propriétés électrophysiologiques du mPTP et de VDAC, le VDAC était historiquement considéré comme un composant majeur de ce complexe au niveau de la membrane externe de la mitochondrie [108]. Toutefois, des études ont montré que des souris invalidées pour les trois isoformes de VDAC conservait un mPTP fonctionnel, et que la délétion de VDAC2 dans des cellules en culture augmentait le phénomène de mort cellulaire au lieu d'être protecteur [109]. VDAC serait donc un constituant non essentiel du pore.

iii. ANT

Chez l'Homme, ANT est une famille de quatre gènes (ANT1, 2, 3 et 4) qui possèdent une grande homologie (68 à 88%), mais avec des patrons d'expression différents et variables en fonction de l'état physiopathologique de la cellule. Les protéines ANT sont insérées dans la membrane interne mitochondriale par six hélices transmembranaires, comme le révèle l'analyse de structure 3D [110]. Leur structure est similaire à celle prédite pour d'autres transporteurs mitochondriaux (**Figure 16**).

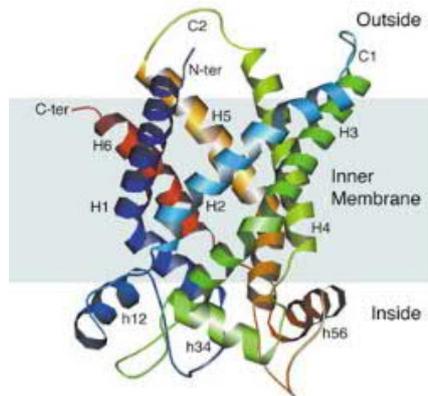


Figure 16 : Schéma en ruban de la structure d'ANT [110].

Les limites des membranes sont tracées en accord avec les segments hydrophobes.

Les protéines ANT codent des transporteurs de la membrane interne mitochondriale, impliqués dans le transfert ADP/ATP vers la matrice, constituant de fait des composants de la voie de synthèse de l'ATP. Les isoformes ANT1 et ANT3 assument la même fonction. Elles exportent l'ATP produit par phosphorylation oxydative (OXPHOS) de la mitochondrie dans le cytosol et importent l'ADP nécessaire aux synthèses. ANT1 est l'isoforme spécifique du muscle et du cœur alors qu'ANT3 est ubiquitaire. En revanche, l'isoforme ANT2 codée par le gène SLC25A5, est quant à elle spécifiquement exprimée dans les cellules en prolifération, dotées d'un métabolisme majoritairement glycolytique. ANT2 stabilise en effet le potentiel de la membrane mitochondriale en important l'ATP de la cellule vers la mitochondrie et en relarguant de l'ADP. L'isoforme ANT4 est celle qui partage les moins d'homologie avec les trois autres (66%-68%). Chez l'Homme, la protéine se localise dans le foie, le cerveau, mais elle s'exprime principalement dans les testicules. Des études sur des souris déficientes en ANT4 révèlent une apoptose accrue dans les testicules, entraînant une infertilité, indiquant ainsi que ANT4 est nécessaire pour la spermatogenèse [111].

ANT1 interagirait avec plusieurs protéines mitochondriales du mPTP telles que la cyclophiline D, les protéines VDAC ainsi que les protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 [112]. Contrairement à l'isoforme ANT1, et malgré leurs séquences protéiques très voisines, ANT2 n'interviendrait pas dans l'élaboration de ce mPTP [113]. Il avait été suggéré que les protéines ANT 1-3 puissent faire partie du mPTP puisque l'utilisation d'un inhibiteur d'ANT 1-3 (l'acide Bongkreikic) inhibait son activité, l'effet opposé étant observé avec un activateur [114]. Mais il a été montré que la délétion d'ANT1 et 2, au niveau des

mitochondries de foie n'abolissait pas la perméabilité de transition induite par le Ca^{2+} , bien que le seuil d'activation soit augmenté [115]. De plus, l'invalidation des gènes SLC25A4 et SLC25A5, de manière permanente ou conditionnelle, n'aurait pas d'incidence sur le déclenchement de l'apoptose chez la souris [115]. Globalement, les différentes études montrent que les protéines ANT ne seraient pas des composants essentiels du mPTP mais joueraient clairement un rôle dans sa régulation.

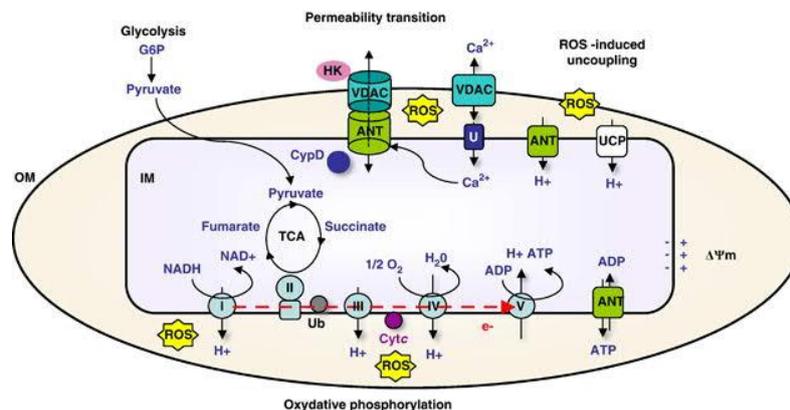


Figure 17 : Schéma des fonctions mitochondriales des protéines ANT [116].

La famille ANT possède diverses fonctions, notamment l'échange ADP/ATP et la régulation de l'ouverture du mPTP.

iv. Les protéines de la famille Bcl-2

En plus de leur rôle dans l'induction de l'apoptose, BAX et BAK, exprimées à la membrane externe, seraient impliqués dans la régulation de l'ouverture du mPTP. En effet, les mitochondries n'exprimant pas BAX et BAK sont résistantes à l'ouverture de ce canal, et la restauration de l'expression de BAX et BAK rétablit ce phénotype [117]. D'autres protéines de la famille Bcl-2 ont été décrites pour leur rôle dans la régulation du mPTP (Bcl-xL, Bcl-2, Bad, Bnip3, Puma...) [118]. Le déséquilibre entre les membres de la famille Bcl-2, en faveur des membres anti-apoptotiques, augmenterait le seuil de sensibilité du mPTP aux ROS. Les protéines de la famille Bcl-2 joueraient donc à la fois un rôle dans le dispositif en lui-même et dans la régulation de son fonctionnement.

III. Etiologie moléculaire des RMS : état des connaissances et enjeux

1. D'une classification histologique à une classification moléculaire des RMS

La stratification sur risque du *Children's* Oncology Group (COG) reposait jusqu'à récemment traditionnellement sur la classification histologique, l'emplacement de la tumeur, sa taille, l'étendue de l'excision chirurgicale et la présence de métastases régionales ou distantes pour

regrouper les patients en trois catégories de traitement: RMS à faible risque, à risque intermédiaire et à risque élevé [25][119].

Dans ce système, les biomarqueurs moléculaires ne jouaient aucun rôle dans la stratification sur risque des patients. L'avènement des technologies -omiques a modifié ce paradigme. La découverte de la fusion PAX3/7-FOXO1 a permis de séparer les ARMS fusion positif, de mauvais pronostic, des ARMS fusion négatif, qui s'agrègent avec les ERMS sur le plan du profil moléculaire [120]. Ces données sont extrêmement importantes car elles conditionnent la prise en charge thérapeutique des patients : le protocole haut risque inclus des séances de radiothérapie, nécessaires pour éradiquer les tumeurs de haut grade mais non dénuées d'effets secondaires. D'autres marqueurs ont émergé pour améliorer la stratification sur risque des patients, notamment à partir de la signature d'expression d'ARNm dérivés de l'expression de cinq gènes (EPHA2, EED, NELF, CBS et EPB41L4B) [121] : un haut niveau d'expression de ces gènes serait associé à une survie inférieure dans le groupe des RMS fusion négatifs [122]. Une mutation de MYOD1 (L122R MYOD1) a également été rapportée comme un facteur de mauvais pronostic dans une petite fraction d'ERMS [15], [123].

Cependant, de nouveaux marqueurs sont nécessaires pour mieux stratifier les patients notamment dans le groupe des RMS fusion négatif, de manière à optimiser le protocole thérapeutique par rapport à l'agressivité de la tumeur.

2. Déséquilibre de la balance vie/mort dans les RMS

La résistance à la mort cellulaire, normalement induite en cas de prolifération trop élevée ou en lien avec l'activation d'oncogènes, est l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses. Les RMS ne font pas exception à la règle. Cette résistance provient d'un déséquilibre de la balance vie/mort, résultant soit d'une activation anormale des signaux de survie, soit d'un blocage des signaux de mort.

Plusieurs anomalies de cette balance ont été décrites dans les RMS.

La voie de signalisation induite par le récepteur au FGF (Fibroblast Growth Factor), FGFR4, joue un rôle essentiel dans la myogenèse [124],[125]. Or, FGFR4 est surexprimé dans la grande majorité des tumeurs RMS [126]–[128], et notamment dans le groupe fusion positif puisque le gène FGFR4 est une cible des protéines de fusion PAX-FOXO1. Cette surexpression de FGFR4 favoriserait l'échappement tumoral, notamment en favorisant la prolifération et la survie cellulaire. Dans une étude de séquençage de 94 cas de RMS fusion négative, des mutations du FGFR4 ont été observées et des mutations dans des gènes codant pour un ou plusieurs composants de la voie FGFR4 ont été découvertes dans 37% des cas [14]. Globalement, ces résultats montrent que dans les RMS, la voie FGFR4 est généralement activée. Outre FGFR4, des mutations du gène RAS ont été observées dans 22% des cas (NRAS, 12%; KRAS, 6%; HRAS, 4%) dans cette même étude, ainsi que des mutations du gène PIK3CA dans 7% des cas, et des mutations NF1 dans 5% des cas. Toutes ces mutations sont susceptibles de conduire à une sur-activation de signaux de survie.

L'expression des protéines anti-apoptotiques mitochondriales Bcl-2 et Mcl-1 est également observée dans une fraction de RMS et a été corrélée de manière inverse à la survie [129], [130]. Au contraire, les tumeurs RMS positives pour la protéine pro-apoptotique BAX sont associées à une survie globale significativement plus longue chez les patients [131]. *In vitro*, la résistance à l'apoptose a été établie dans les lignées cellulaires de RMS et est liée à l'échec des thérapies conventionnelles [132], [133].

Cependant, les données sur les modalités moléculaires de résistance à la mort cellulaire dans les tumeurs de RMS restent rares.

3. RMS et myogenèse: Dr Jekyll et Mr Hyde du muscle squelettique

Outre les observations histologiques montrant les similitudes entre la striation des rhabdomyoblastes et celle des cellules musculaires, les signatures d'expression des RMS sont également caractérisées par l'expression de marqueurs spécifiques du muscle adulte ou embryonnaire tels que Myogenin, Desmin ou MyoD [111] [121] [136]. L'expression nucléaire de la myogénine est notamment utilisée de manière routinière dans le diagnostic différentiel des RMS [137]. Il a été démontré que l'expression des protéines de fusion PAX-FOXO1 était suffisante pour induire l'expression de marqueurs myogéniques tels que MyoD et Myogenin, ce qui rappelle l'initiation de la myogenèse dirigé par les facteurs de transcription Pax3/7 au cours du développement [138]. Enfin, même si l'origine cellulaire précise des RMS reste un sujet de débat, certains arguments soutiennent que les RMS seraient issus de précurseurs musculaires plus ou moins engagés dans la voie de différenciation myogénique: l'expression de la région précoce du SV40 et de H-ras, combinée à l'inactivation de p53 dans des myoblastes humains est par exemple suffisante pour déclencher la formation de tumeurs de type ERMS [139].

Récemment, la notion selon laquelle la signature moléculaire des cancers myogéniques, et en particulier des RMS, pourrait partager des similitudes avec les dystrophies musculaires a commencé à émerger [134]. Les dystrophies musculaires sont un ensemble hétérogène de maladies génétiques caractérisées par une dégénérescence du tissu musculaire. Une propension accrue à développer des RMS a été rapportée dans certains modèles murins de dystrophies [134], [140], [141]. Ceci résulterait de l'induction de l'inflammation, de la fibrose et du stress oxydatif qui accompagnent le développement de dystrophies musculaires et favorisent également la survenue de tumeurs.

Il est intéressant de noter que certaines des protéines décrites comme dérégulées dans les dystrophies ont également été liées à la survenue de RMS et réciproquement. Il a notamment été montré très récemment que des mutations de la dystrophine dans les cas de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et dystrophie musculaire de Becker (BMD), sont l'une des causes sous-jacentes de l'échappement tumoral dans les RMS [134], [140], [141]. DUX4, dont le gain d'expression est maintenant largement reconnu pour être impliqué dans les dystrophie facio-scapulo-humorale (FSHD), est également altéré par une translocation chromosomique en (4; 22) (q35; q12) dans un cas de RMS [142], et DUX4 est aussi exprimé

dans des lignées cellulaires de RMS [143]. Réciproquement, un enrichissement significatif des gènes liés au cancer a été observé dans la FSHD, suggérant ainsi que les altérations moléculaires impliquées dans les dystrophies et les cancers soient à rechercher dans un pool commun de gènes [142]. En particulier, huit gènes liés aux RMS ont été analysés dans cette étude, et sont surexprimés dans les myoblastes issus de patients atteints de FSHD (GATM, IGFBP5, ATN1, BIN1, FGFR4, IL4R, NFIB, TP53). Un examen plus attentif des données révèle que l'expression de certains gènes est similairement up ou down régulée dans les tumeurs et les FSHD, tandis que d'autres évoluent dans une direction opposée (47,7% des gènes ont une expression accrue dans une pathologie mais diminue dans l'autre et réciproquement). Cependant, le rôle causal de ces modifications n'est pas encore établi. Globalement, ces observations suggèrent fortement que: (i) les mécanismes moléculaires impliqués dans la survenue de RMS et dans les dystrophies musculaires puissent résulter d'altération du niveau d'expression ou de la fonction d'un ensemble de gènes; (ii) et que ces anomalies puissent être identiques ou inverses en fonction du rôle du processus moléculaire concerné : une hausse du niveau de stress oxydatif par altération des gènes contrôlant l'équilibre rédox pourrait par exemple favoriser la dégénérescence musculaire et la tumorigénèse, alors que la perte d'une protéine anti apoptotique pourrait favoriser la mort des cellules musculaires dans les dystrophies, la hausse de son expression ayant un effet opposé dans les tumeurs.

L'identification de similitude des défauts existant dans ces deux types de pathologies - via la mise en œuvre d'une approche comparative - pourrait alors mettre en évidence de manière efficace les altérations impliquées de manière causale dans leur étiologie.

En particulier, la dégénérescence musculaire observée dans les dystrophies résulte d'une inflammation et d'une mort cellulaire anormale [144]. Si ce phénomène était principalement attribué à la nécrose, l'implication de l'apoptose a également été rapportée [145], [146]. Des noyaux apoptotiques ont été observés, en particulier dans les fibres musculaires de patients atteints de DMD et FSHD [67], [145], [147]. Plusieurs observations sur l'implication de l'apoptose ont été établies dans la dégénérescence musculaire de modèles animaux. En particulier, dans le modèle murin mdx de DMD, l'apoptose serait impliquée dans la déplétion des cellules satellites [145], [146], [148]. Il a également été récemment établi que la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 pourrait restaurer la faiblesse musculaire dans un modèle murin de dystrophie musculaire oculo-pharyngée (OPMD) [149] [6].

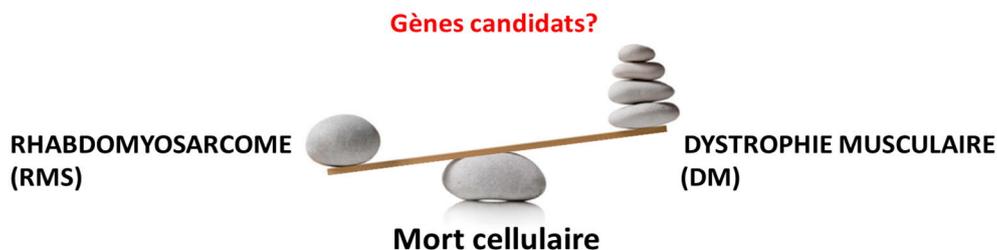


Figure 18: Schéma simplifié du rationnel de la comparaison entre RMS et DM.

Hypothèse du projet de thèse

La caractérisation des voies pro-apoptotiques et anti-apoptotiques qui sont perturbées dans les RMS fait encore défaut, mais pourrait ouvrir la voie à des thérapies basées sur la restauration de la mort cellulaire. Mon projet de thèse visait donc à identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la résistance à la mort cellulaire dans les RMS, notamment en réponse aux traitements.

Pour ce faire, mon projet de thèse s'est articulé autour de deux axes d'études

- 1) dans un premier temps nous avons réalisé une analyse large échelle des voies de mort dans les RMS, l'idée étant d'établir une cartographie des défauts des circuits de mort dans ces cancers pour identifier de nouveaux drivers oncogéniques mais également potentiellement améliorer la classification en entités homogènes. Cette étude s'est faite sur la base d'analyses de données transcriptomiques et d'un crible fonctionnel siARN
- 2) Dans un second temps, j'ai sélectionné un candidat identifié dans le cadre de cette analyse large échelle. Nous avons décidé d'étudier le rôle d'ANT1 dans la régulation de la mort cellulaire dans les RMS, puisque i) ce gène avait été identifié dans le cadre de l'étude large échelle comme possiblement altéré quantitativement et ii) puisque ce gène est impliqué dans un type de dystrophie musculaire (FSHD). Ce dernier critère reposait sur l'idée développée précédemment, selon laquelle une comparaison entre les RMS et les dystrophies musculaires pourrait permettre d'identifier des acteurs impliqués de manière plus spécifique dans le contrôle de l'équilibre vie/mort de ces tumeurs du lignage musculaire. L'étude du rôle d'ANT1 a été réalisée *in vitro* et *in vivo* à l'aide de modèles cellulaires génétiquement modifiés de RMS. Nous avons investigué deux facettes du rôle de ce gène dans les RMS.
 - Son rôle dans le métabolisme, à l'aide d'étude métabolomique, de test de prolifération et d'analyse seahorse, nous permettant d'évaluer le métabolisme énergétique des cellules de RMS lorsque le gène SLC25A4 est modulé.
 - Son rôle dans la mort cellulaire en analysant la résistance à la mort de cellule de RMS en conditions de stress, selon le niveau d'expression de SLC25A4, notamment par des tests de viabilité et de dépolarisation mitochondrial.

Chapitre 2 : Résultats

Lorsqu'une cellule devient anormale, se localise hors de son tissu ou est en excès, elle est normalement éliminée par l'activation de signaux internes aboutissant à la mort cellulaire. La capacité à résister au déclenchement de sa propre mort est l'une des caractéristiques acquises par les cellules tumorales.

Afin d'améliorer la compréhension de l'étiologie moléculaire des RMS, mon projet s'est organisé autour de 2 axes d'études visant à identifier les anomalies à l'origine des mécanismes de résistance à la mort cellulaire.

I. Cartographie de l'état de fonctionnement des signaux internes de mort cellulaire dans les RMS.

Deux approches large échelle complémentaires ont été mises en place dans le but de définir les défauts de mort cellulaire, et notamment d'apoptose, dans les RMS : une analyse bioinformatique de bases de données visant à identifier des anomalies du profil d'expression de gènes impliqués dans la mort cellulaire et une approche fonctionnelle basée sur un crible siARN.

1. Analyse fonctionnelle de type « puces de cellules »

Une analyse fonctionnelle de type crible siARN sur « puces de cellules », basée sur l'inactivation de gènes de mort cellulaire a été entreprise en collaboration avec l'équipe de Xavier Gidrol au CEA de Grenoble, qui maîtrise cette technologie (Sukkurwala et al., 2014). L'objectif était d'identifier des gènes dont l'invalidation restaurait la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose, lors d'un stress induit par carence en sérum, constituant de fait des points de résistance à la mort cellulaire.

a. Matériel et Méthodes

Cette étude a été réalisée sur 3 lignées cellulaires (ERMS CCL-136, ARMS ACC-489 et ACC-592). La banque de siARN utilisée est composée de 496 siARN différents (Qiagen), sélectionnés pour cibler des effecteurs impliqués dans la modulation de l'apoptose. Elle comporte 2 séquences siARN différentes ciblant un même ARNm, permettant ainsi d'inhiber l'expression de 248 gènes différents. Le principe des puces de cellules est d'inhiber

l'expression d'un seul gène clé de la mort cellulaire par puit afin de pouvoir mesurer son impact sur le blocage de la mort cellulaire grâce à la sonde « CellEvent Caspase3/7 ». Cette sonde est basalement non fluorescente car le peptide DEVD inhibe la capacité de liaison du colorant à l'ADN. Cependant, après l'activation de la caspase-3/7 dans les cellules apoptotiques, le peptide DEVD est clivé, ce qui permet au colorant de se lier à l'ADN et déclenche l'émission d'un signal fluorescent. Plus la fluorescence sera intense dans un puit, plus l'activité de la caspase-3 est importante, indiquant que le gène ciblé par le siARN correspondant a un rôle clé dans le blocage de l'apoptose. Pour ces cribles, les siARN ont été utilisés à une concentration de 20nM finale. Le choix de l'agent de transfection a nécessité 2 étapes distinctes.

Dans une première étape, des lignées de RMS ont été transfectées avec du Métafectene, du N-Ter, du Dharmafect-1, du Silentfect et de la Lipofectamine RNAiMAX à plusieurs concentrations. Les efficacités de transfection ainsi que la toxicité potentiellement induite par chacun de ces agents de transfection ont été évaluées par microscopie à fluorescence à l'aide de la sonde « CellEvent Caspase3/7 » et de siARN contrôles. Les siARN AllStars et RiskFree n'ont aucune homologie avec des gènes de mammifère connus (Ctrl négatifs) et les siARN-CellDeath et EG5 sont un mélange de siRNA ciblant des gènes humains exprimés de manière omniprésente et essentiels pour la survie des cellules. L'invalidation de ces gènes induit un degré élevé de mort cellulaire (Ctrl positifs). Cette première étude a permis de sélectionner la Lipofectamine RNAiMAX comme l'agent le plus efficace et le moins toxique pour l'ensemble des modèles cellulaires.

Dans une deuxième étape, nous avons complété notre étude en réalisant des cinétiques (24, 36 et 48h), des doses réponses de Lipofectamine RNAiMAX (de 0.035 à 0.1µl/puits), des tests d'ensemencement avec différentes concentrations cellulaires et enfin des tests de fixation afin de ne pas perdre les cellules en apoptose. Une fois ces tests effectués, nous avons automatisé l'ensemble de ces étapes à l'aide du Robot Zephyr (Perkin Elmer) et du logiciel Maestro. L'objectif de ces différentes expériences était l'obtention de la meilleure séparation possible entre les populations cellulaires transfectées avec les siARN-AllStars/Riskfree et CellDeath/EG5, après marquage par le CellEvent (= critère de qualité pour les futurs cribles). Cette séparation est apparue optimale après 36 heures de transfection, une fixation avec de la PFA 2.6% finale, 2µM de CellEvent et des ensemencements allant de 2000 à 2600 cellules suivant les lignées.

b. Résultats

A l'issue de cette phase de mise au point, nous avons lancé le criblage siARN per se. Chacune des lignées a été criblée deux fois pour avoir un réplicat biologique. Les 30 transcrits avec les plus forts potentiels pro-apoptotiques, c'est à dire induisant le plus fort niveau d'activation de la caspase-3 ont ensuite été sélectionnés pour chaque lignée, sur la

base du calcul d'un ZScore moyen, correspondant à la moyenne des 2 ZScores pour les 2 siARN ciblant le même gène. Ces résultats sont présentés dans la **figure 19**.

	A	B		A	B		A	B
1		ZScore_489	1		ZScore_136	1		Zscore_592
2	Hs_SNAP23	64.96	2	CellDeath	326.54	2	Hs_MCL1	55.51
3	CellDeath	62.33	3	Hs_HGD	99.93	3	Hs_PRKCD	46.55
4	Hs_HK1	18.70	4	Hs_LIPC	94.31	4	Hs_LOC202459	38.12
5	EG5	18.18	5	Hs_TNFRSF1B	84.78	5	CellDeath	29.15
6	Hs_MCL1	11.59	6	Hs_EMD	74.22	6	Hs_TLR3	28.14
7	Hs_RIPK2	10.11	7	Hs_ACHE	69.02	7	Hs_LAMP1	26.98
8	Hs_NCOA3	9.56	8	Hs_MAPK1	49.06	8	Hs_AKT1	26.48
9	Hs_AKT1	9.16	9	Hs_MCL1	40.62	9	Hs_ITGB6	18.15
10	Hs_LOC202459	8.52	10	EG5	40.19	10	Hs_WSB2	17.33
11	Hs EIF4EBP1	7.91	11	Hs_RRAD	37.43	11	Hs_TFF1	15.20
12	Hs_ITGB6	7.73	12	Hs_AKT1	18.73	12	Hs_RAB3C	13.64
13	Hs_RAB3C	7.65	13	Hs_BAIAP3	18.11	13	Hs_CYP11B2	12.24
14	Hs_DEFB4	6.95	14	Hs_AGER	18.08	14	Hs_FBXO42	11.95
15	Hs_PLD3	6.79	15	Hs_BOK	17.44	15	Hs_HK1	10.66
16	Hs_PARP1	6.59	16	Hs_KHSRP	16.87	16	Hs_IKBKG	10.65
17	Hs_CD151	6.52	17	Hs_ITGB6	15.70	17	Hs_RIPK2	10.58
18	Hs_PRKR	6.47	18	Hs_HK2	15.17	18	Hs_KDELRL3	10.43
19	Hs_MAP3K5	6.39	19	Hs_HK1	12.17	19	Hs_CKMT1	9.10
20	Hs_CKMT1	6.21	20	Hs_CAPNS1	10.43	20	Hs_PLD3	8.87
21	Hs_CYP11B2	5.80	21	Hs_HDLBP	9.99	21	Hs_SESN2	8.55
22	Hs_COX7C	5.77	22	Hs_RAB3C	7.69	22	Hs_EBP	8.43
23	Hs_SESN2	5.47	23	Hs_VDAC3	7.67	23	Hs_PIK3CA	8.32
24	Hs_ALDH7A1	5.36	24	Hs_PLD3	7.51	24	Hs_BCL2L1like	8.08
25	Hs_TFF1	5.34	25	Hs_PRSS21	7.51	25	Hs_USP8	7.94
26	Hs_PIK3CG	5.27	26	Hs_MGC17791	7.17	26	Hs EIF4EBP1	7.63
27	Hs_SEMA3C	5.20	27	Hs_JUN	6.80	27	Hs_SESN1	7.19
28	Hs_RRAD	5.20	28	Hs_RIPK2	6.61			
29	Hs_EBP	5.19	29	Hs_CD40	6.51			
30	Hs_TLR3	5.10	30	Hs_EBP	5.45			
31	Hs EIF2S1	5.01	31	Hs_MAT2A	5.10			

Figure 19 : Présentation des gènes dont l'inactivation induit la plus forte augmentation de l'apoptose.

Les gènes dont l'inactivation présente un potentiel pro-apoptotique élevé (induisant le plus fort niveau de caspase 3 activée) sont présentés pour chacune des lignées de RMS : ACC-489, CCL-136 et les ACC-592 après un stress de type carence en sérum. Données analysées par le logiciel Maestro.

c. Analyses

Sur les 30 transcrits avec les plus forts potentiels apoptotiques, 5 transcrits (HK1, MCL-1, AKT1, PLD3, RIPK2) sont communs aux trois lignées de RMS. 7 transcrits (LOC202459, EIF4EBP1, RAB3C, CKMT1, CYP11B2, SESN2, TL3) sont communs aux deux lignées d'ARMS. Il est intéressant de noter que dans les ERMS et les ARMS, on trouve de nombreux gènes localisés dans la mitochondrie et ayant une fonction dans la régulation du métabolisme mitochondrial et dans l'ouverture du mPTP (HK1, HK2, VDAC3, CKMT1, COX7C). Dans

les ARMS, les Sestrines semblent également jouer un rôle dans le contrôle vie/mort, puisque l'inactivation de SESN1 et SESN2 conduit dans les 2 cas à une hausse de l'apoptose. Cette famille est impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et de la survie. Elles sont capables de réduire le stress oxydatif et de réguler AMPK inhibant ainsi la voie mTOR. Ces candidats pourraient correspondre à des points de blocage potentiel des voies apoptotiques dans ces cellules.

2. Analyse bioinformatique des données transcriptomiques des bases de données publiques

Afin de compléter l'analyse fonctionnelle décrite ci-dessus, nous avons décidé d'effectuer une analyse bioinformatique des données transcriptomiques des bases de données publiques. L'analyse bio-informatique a été effectuée à partir de deux études transcriptomiques (GSE28511, E-TABM-1202) en collaboration étroite avec les biostatisticiens du service LBBE Biométrie et Biologie Evolutive Laboratoire de Biostatistique Santé des Hospices Civils de Lyon, dirigé par le Pr Maucort Boulch.

a. Choix des gènes d'intérêt

Nous avons décidé d'étudier le profil d'expression des gènes de mort cellulaire de la « DeathBase »[150], en ajoutant aussi les gènes décrits comme apoptotiques dans la banque de l'étude de « puce fonctionnelle » et les gènes décrits dans la bibliographie comme pouvant être impliqués dans la mort cellulaire au cours de la myogenèse ou dans les dystrophies musculaire (DUX4, SLC25A4, SLC25A5, PITX1, PITX2, voie du TGFβ...). La liste de ces gènes est décrite dans **l'annexe 1**.

Etude GSE 28511

La base de données GeoDataSet (GSE28511) est intéressante car elle permet de comparer le profil d'expression des gènes entre des biopsies de muscle sain, utilisées comme contrôles non-tumoraux, et des biopsies de RMS.

Le jeu de données contient le transcriptome de 24 échantillons :

- 6 échantillons de muscles non-tumoraux (provenant de 3 muscles squelettiques sains et de 3 biopsies de muscles prélevées en zone péri-tumorale).
- 8 échantillons d'ERMS.
- 10 échantillons d'ARMS.

La base de données initiale contient 48801 transcrits provenant de 37802 gènes. Seuls les gènes d'intérêt décrits ci-dessus ont été extraits et analysés, soit 433 transcrits provenant de 250 gènes.

L'exploration des données a été réalisée au niveau des transcrits et au niveau des gènes. Le niveau gène correspond à la moyenne des valeurs des transcrits obtenus à partir d'un gène donné. Les données sont exprimées en Log2.

Etude E-TABM-1202

La base de données E-TABM-1202 regroupe une cohorte de biopsies de RMS. L'avantage de cette base de données est son effectif plus important que celui de l'étude GSE28511, permettant une approche statistique plus fiable.

106 échantillons de patients avec des données transcriptomiques ont été analysés dans cette étude. Pour 5 d'entre eux, les données cliniques ne sont pas disponibles portant donc à 101 le nombre d'échantillons de patients d'intérêt dans le cadre de notre analyse, se décomposant comme suit :

- 36 échantillons d'ERMS.
- 65 échantillons d'ARMS.

La base de données transcriptomiques contient 23520 gènes. Seuls les gènes d'intérêt décrits ci-dessus ont été extraits et analysés, soit 250 gènes.

b. Analyse des données

Etude GSE 28511

Analyse Heatmap

Les Heatmaps représentent un clustering non supervisé. La distance euclidienne est utilisée ici pour regrouper les individus les plus proches en fonction des valeurs des variables (transcrits ou gènes). De manière très intéressante, on remarque que le dendrogramme du haut sépare d'abord les échantillons correspondant aux tissus sains (sauf FT-262) des autres échantillons tumoraux (**Figure 20**). L'échantillon FT-262 était notifié comme un muscle squelettique péri-tumoral mais au regard des analyses, on peut supposer qu'il s'agit d'un échantillon contaminé par de la tumeur. Cette première analyse suggère donc qu'il soit possible de distinguer les échantillons tumoraux de RMS des muscles squelettiques non tumoraux sur le simple profil d'expression des gènes de mort cellulaire.

- Transcrits

- Gènes

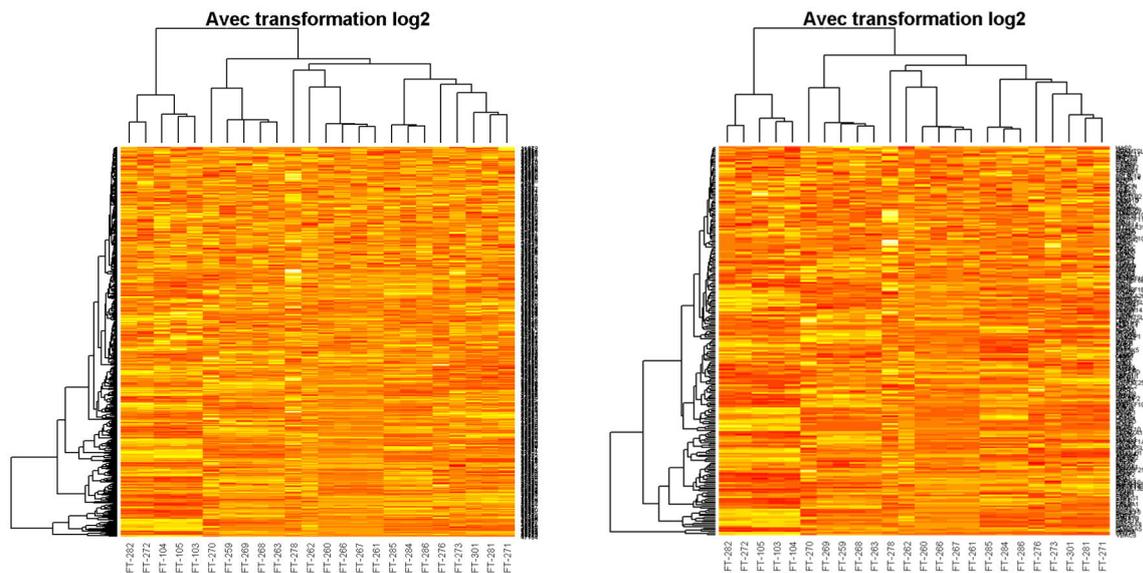


Figure 20: Analyse Heatmap avec transformation Log2 des gènes de mort cellulaire entre RMS et muscles non-tumoraux.

Au niveau des transcrits ou des gènes, on distingue clairement un clustering regroupant sur la gauche les tissus sains et à droite les RMS, exception faite de l'échantillon FT-262. Cette représentation nous montre bien la différence d'expression des gènes d'intérêt en fonction du statut de l'échantillon (sain versus tumoral).

Analyse ACP

L'exploration des données a été réalisée au niveau des transcrits et au niveau des gènes.

Les analyses ont été effectuées en Analyses en Composantes Principales (ACP) pour trouver pour chaque axe, une combinaison linéaire des variables telle que la variance du nuage autour de cet axe soit maximale.

Les ACP ont été réalisées à partir des données transformées. Les variables sont centrées-réduites.

Que ce soit au niveau des transcrits ou des gènes, la représentation des axes sépare très bien les échantillons sains des autres échantillons (**Figure 21**), à l'exception de l'échantillon péri-tumoral FT_262, qui avait été identifié comme possiblement contaminé par du matériel tumoral sur la base de l'analyse en HeatMaps.

Seules les variables ayant une corrélation supérieure à 0.8 (en valeur absolue) à l'un des deux axes sont représentées.

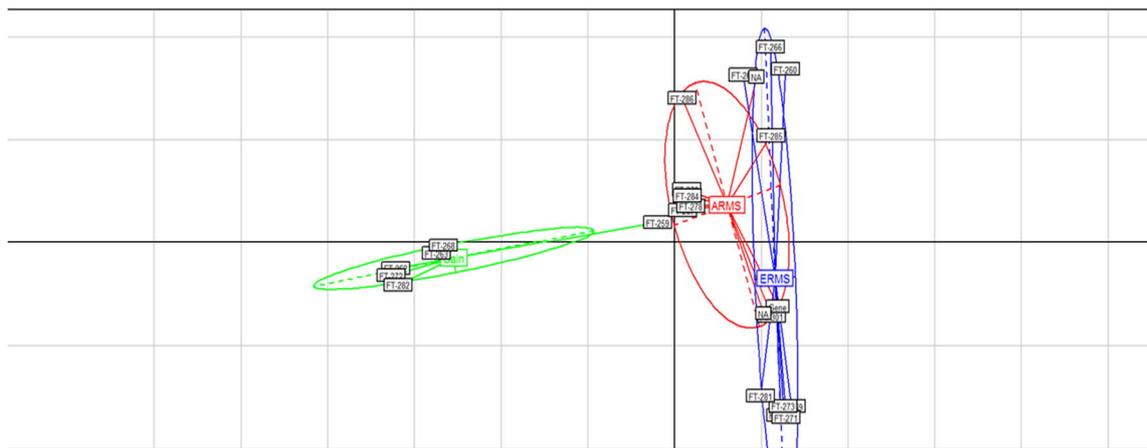


Figure 21 : Résultats de l'analyse en ACP.

Résultats de l'analyse ACP permettant une discrimination claire entre les échantillons de RMS et les échantillons sains.

La liste des gènes avec une corrélation supérieur à 0.8 comporte : ABL1, ACHE, ADAMTSL4, AIFM1, AK2, AKT1, ALDH7A1, APAF1, BAG3, BCL2, BCL2L13, BIRC5, BNIP2, CALR, CASP2, COX7C, CRADD, CSE1L, DAP, DNAJA3, ENDOG, FASN, HK1, HSPA1A, KHSRP, MAT2A, MED12, MOAP1, NOL3, OPA1, RNF34, RRAD, SESN1, SH3GLB1, SLC25A26, SLC25A4, SMYD1, SNAP23, TNFRSF10B, TNFSF10, TRAF4, VDAC1, LAMA2, SMAD6.

Les gènes séparant les échantillons tumoraux et non-tumoraux sont aussi bien associés à la voie extrinsèque (TNFRSF10B, TNFSF10, CASP2, TRAF4, CRADD, NOL3) qu'à la voie intrinsèque (BCL2, BCL2L13, AIFM1, APAF1, BIRC5, BNIP2, ENDOG, SH3GLB1). La voie de prolifération PI3K/AKT semble elle aussi être différemment exprimée dans les RMS (ABL1, DAP, AKT1). Enfin, comme pour l'analyse fonctionnelle, on retrouve des gènes codant pour des protéines partenaires d'ANT1 (COX7C, VDAC1, HK1, SLC25A26, FASN, AK2, ALDH7A1).

Certains résultats sont plutôt cohérents avec ce qui est connu dans les circuits apoptotiques notamment une baisse d'expression des gènes BCL2L13, TNFSF10, ENDOG, CRADD et AIFM et une hausse d'expression de BIRC5 dans les RMS. Cependant d'autres étaient plus inattendus : en effet des gènes pro-apoptotiques comme APAF-1, TNFRSF10B, CASP2 sont moins exprimés dans les tissus sains que dans les RMS ; réciproquement, des gènes anti-apoptotiques sont eux plus exprimés dans les tissus sains que dans les RMS (BCL2, BNIP2, NOL3). Ceci est probablement à rapprocher de la notion de priming évoquée dans la revue. En effet, la transformation de la cellule tumorale s'accompagne de l'acquisition d'anomalies (dommages à l'ADN, activation d'oncogènes...), qui déclenchent l'engagement des signalisations apoptotiques : il peut donc être normal de retrouver des gènes pro-apoptotiques sur exprimés dans les RMS par rapport aux tissus sains, avec possiblement des points de blocage en aval.

Nous avons cherché à définir s'il existait des différences de profil d'expression de gènes de mort cellulaire en fonction d'un certain nombre de paramètres cliniques. 7 paramètres cliniques ont été étudiés : le type histologique (ARMS versus ERMS), le sexe, la présence de métastases au diagnostic, l'âge au diagnostic, le stade, le grade selon la classification du COG, et enfin la présence de la translocation. Le profil d'expression des gènes de mort cellulaire permet uniquement de distinguer les tumeurs sur la base du critère histologique ou de la présence de la translocation Pax-FOXO1, selon l'axe 2. Ces deux critères sont d'ailleurs largement équivalents puisque 80% des ARMS sont également Pax-FOXO1 positifs. Seules les variables ayant une corrélation supérieure à 0.6 (en valeur absolue) à l'un des deux axes sont représentées (**Figure 22**).

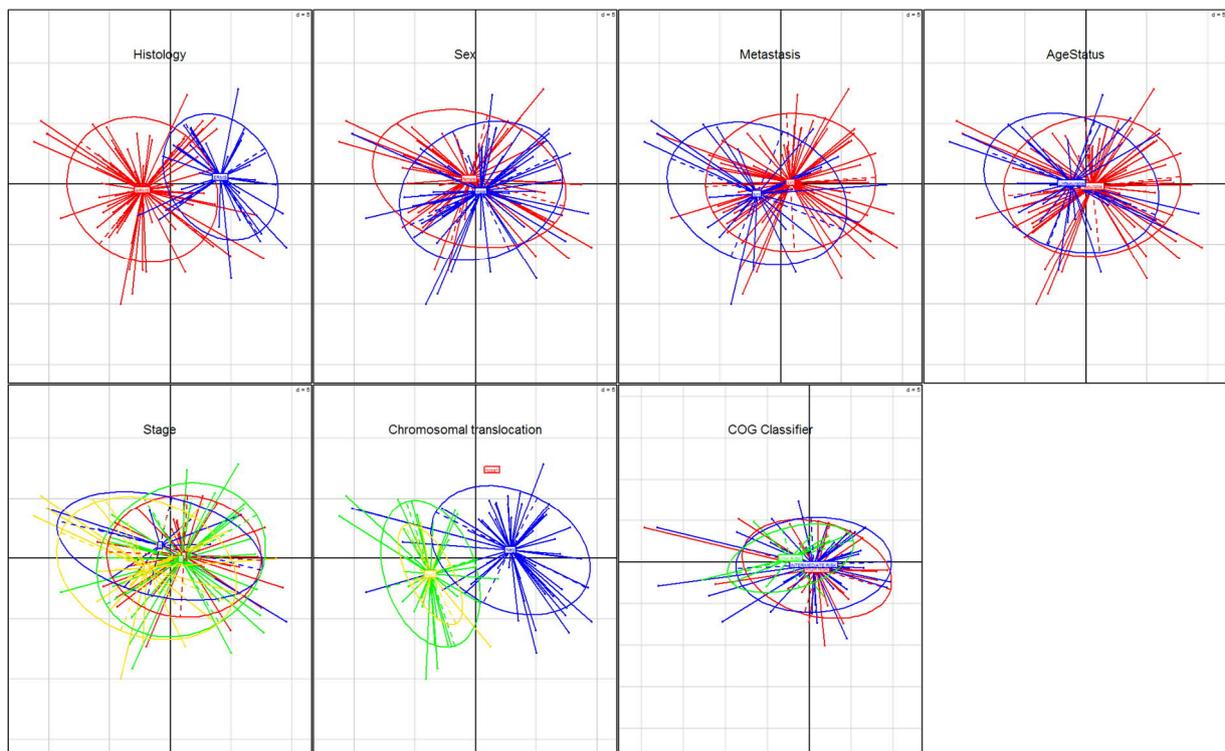


Figure 22 : Discrimination par analyse ACP des échantillons de RMS en fonction de critères cliniques.

La discrimination par analyse ACP fait uniquement ressortir une différence entre le type histologique (ARMS et ERMS) et la présence de la translocation PAX/FOXO1.

Les gènes avec une corrélation supérieure à 0.6 sont BCL2L13, COL6A1, CYLD, DAPK1, EIF4EBP1, FASN, GAS2, HDLBP, KHSRP, LRP1, MAP3K14, SMAD6, IKBKG, SMAD5, TFAM.

Lors de cette analyse, il est plus difficile de regrouper les gènes en voies de signalisation spécifiques aux sous types de RMS, à l'exception de la voie TGF β représentée par les effecteurs SMAD5 et SMAD6.

De nombreux candidats ont été identifiés dans ces analyses transcriptomiques et les données sont en cours d'intégration afin de préparer une publication. Nous avons décidé de focaliser la suite de ma thèse sur la voie de signalisation de ANT1 et du mPTP.

II. Etude du rôle du transporteur mitochondrial ANT1 dans la résistance à la mort cellulaire dans les RMS

1. Intégration des études large échelle et choix du gène candidat SLC25A4

i. Introduction : présentation du transporteur mitochondrial ANT1

ANT1 est l'isoforme musculaire de la famille des adénine nucléotide translocases (ANT). Elle est donc supposée avoir un rôle métabolique : exporter l'ATP produit par phosphorylation oxydative de la matrice mitochondriale vers l'espace inter membranaire avec l'importation concomitante d'ADP de l'espace intermembranaire vers la matrice. D'autre part, en conditions de stress, ANT1 pourrait être impliquée dans l'ouverture du mPTP et déclencher le processus de perméabilisation de la membrane mitochondriale, qui conduit de manière irréversible à la mort cellulaire (**Figure 17**).

Les cellules musculaires ont la particularité d'être de grandes consommatrices d'ATP, notamment pour pouvoir se contracter. L'isoforme ANT1 joue un rôle crucial dans le transfert rapide et massif d'ATP nécessaire à la contraction musculaire.

ii. Choix du transporteur ANT1

Comme indiqué en introduction, notre postulat de base était qu'une approche comparative entre les RMS, cancers du lignage musculaire et les dystrophies musculaires, pathologies dégénératives du muscle pourrait nous permettre d'identifier des gènes impliqués dans la survenue de ces cancers.

Dans le cadre des approches large échelle entreprises, plusieurs anomalies affectant des protéines partenaires fonctionnelles de ANT1 ont été identifiées. Ainsi, l'inactivation des gènes HK1, HK2, VDAC3, CKMT1, COX7C par siARN suffit à restaurer la sensibilité des cellules de RMS à un stress de type carence en sérum. A noter que des siARN ciblant SLC25A4 n'étaient pas représentés dans cette banque, et que l'impact de l'inactivation de ce gène n'a donc pas été évalué dans le cadre de l'approche « puces de cellules ». De plus, les gènes/transcrits codant COX7C, VDAC1, HK1 sont significativement sous-exprimés dans les

RMS par rapport aux muscles squelettiques sains d'après l'étude transcriptomique GSE28511. Des altérations du profil d'expression de SLC25A4 ont été corrélées à plusieurs pathologies musculaires, chez l'Homme ou dans des modèles animaux [115] [116]. Chez la souris, l'inactivation de ANT1 se traduit par un ensemble d'anomalies présentant les caractéristiques physiologiques, histologiques et biochimiques des myopathies et des cardiomyopathies. Ainsi, une déficience du complexe III de l'OXPPOS, une hypertrophie cardiaque, une augmentation du nombre de mitochondrie et des fibres musculaires de type 1 histologiquement anormales, une élévation des taux d'acide lactique et citrique et, enfin, une intolérance à l'exercice ont été observés dans ce modèle murin [153]. L'isoforme ANT1 est minoritaire dans les cancers et est très peu étudiée, contrairement à l'isoforme ANT2 dont le rôle oncogénique a été établi dans plusieurs cancers. Quelques études ont montré qu'une surexpression de ANT1 dans des modèle murins de xénogreffes notamment d'adénocarcinome de sein était suffisante pour induire la régression tumorale en déclenchant l'apoptose par activation de la dimérisation de BAX [154].

Compte-tenu i) des altérations observées dans le cadre des approches large échelle sur des partenaires fonctionnelles de ANT1 et ii) du rôle spécifique de ANT1 dans le muscle squelettique et de son implication dans des pathologies musculaires, nous avons décidé de définir le rôle de ANT1 dans la tumorigenèse des RMS.

2. Caractérisation et impact d'altérations du profil d'expression du gène SLC25A4 dans la survenue de RMS.

L'étude du rôle d'ANT1 dans les RMS, qui a fait l'objet de l'essentiel de mon travail de thèse est résumée ci-dessous. Les sections introduction, résultats et matériel et méthodes de la publication en cours de finalisation sont présentées ci-après de manière plus détaillée.

a. Analyse du profil d'expression de SLC25A4 dans les RMS

Nous avons utilisé les bases de données transcriptomiques GSE28511 et E-TABM-1202 décrites précédemment en nous focalisant uniquement sur le profil d'expression de SLC25A4 et des protéines partenaires fonctionnelles d'ANT1 (COX7C, HK1, HK2, SLC25A5, VDAC1, VDAC2 et VDAC3).

L'étude GSE28511 nous a permis de mettre en évidence une altération du profil d'expression de l'ensemble des protéines étudiées entre les muscles squelettiques et les échantillons tumoraux (**Figure 23**). L'expression des gènes COX7C, HK1, HK2, SLC25A4, VDAC1, VDAC2 ET VDAC3 est significativement plus faible dans les échantillons tumoraux par rapport aux tissus sains. Seule l'expression de SLC25A5 est significativement plus haute dans les RMS: ces observations sont le point de départ de la construction de mon article.

Nous avons confirmé par RT-QPCR que l'expression de SLC25A4 est significativement plus faible dans une cohorte de RMS (n=67) obtenue via les centres de ressources biologiques du

Centre Léon Bérard et de l'Hôpital Femme Mère Enfant par rapport à des échantillons de muscles adultes sains, de muscles foetaux et de muscles dystrophiques.

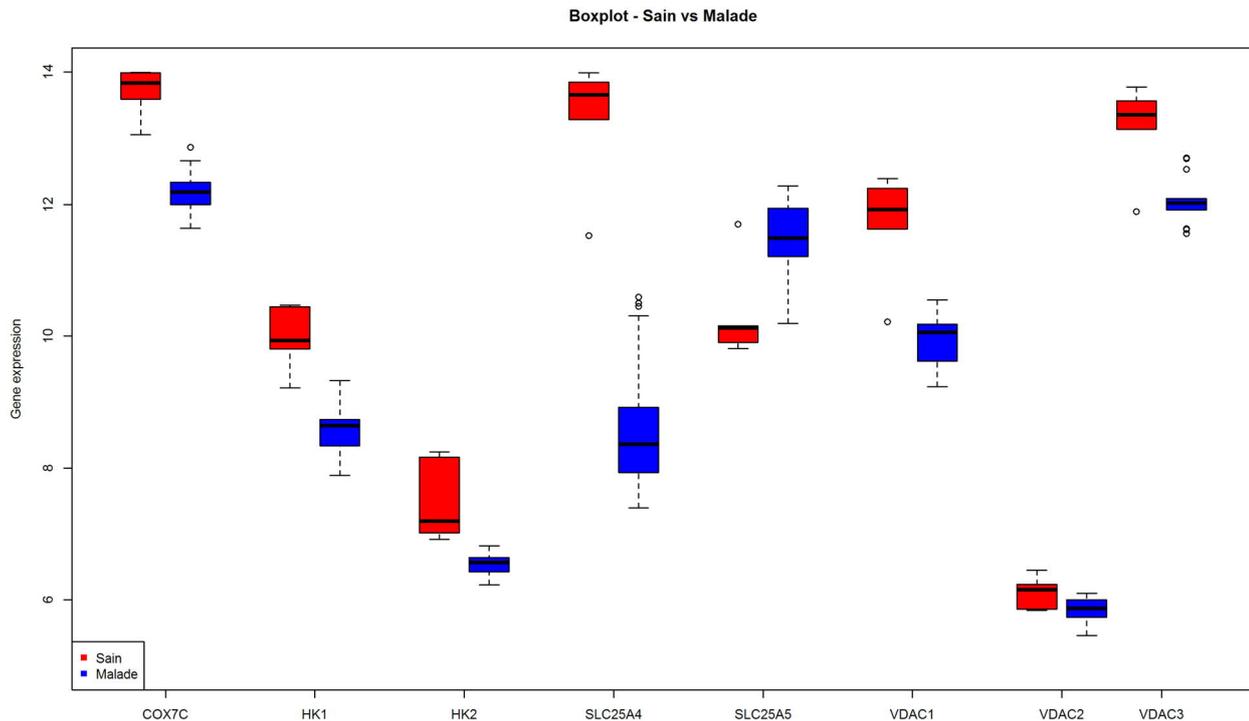


Figure 23: Comparaison de l'expression des gènes du complexe ANT1 entre échantillons tumoraux et sains.

L'expression de SLC25A4/ANT1 et de 7 de ses partenaires ont été évaluées à l'aide des données transcriptomiques du jeu de données GSE285111. Les boxplots avec moyenne (barre horizontale) et min-max (barres d'erreurs) sont représentés.

Nous avons aussi interrogé la base de données E-TABM-1202 pour définir si l'expression de SLC25A4 et de ses partenaires protéiques pouvait être associée à des caractéristiques cliniques.

L'analyse différentielle univariée fait ressortir des différences d'expression significatives pour les gènes COX7C, HK1, SLC25A4 et VDAC3 entre les patients RMS fusion négatif et les RMS fusions positif. La probabilité d'être un RMS fusion positif est multipliée par 9,9 pour COX7C, 4,6 pour HK1, 2,7 pour SLC25A4 et 3,9 pour VDAC3 lorsque leur expression respective augmente de 1 sur l'échelle Log2, c'est à dire lorsque la mesure de l'expression double. L'analyse différentielle multivariée montre des différences d'expression significatives pour les gènes COX7C, HK1, VDCA3 et HK2. La probabilité d'être un RMS fusion positif est multipliée par 26,7 pour COX7C, 27,2 pour HK1, 10,6 pour VDAC3 et 0,38 pour HK2 lorsque la mesure de l'expression double (**Figure 24**).

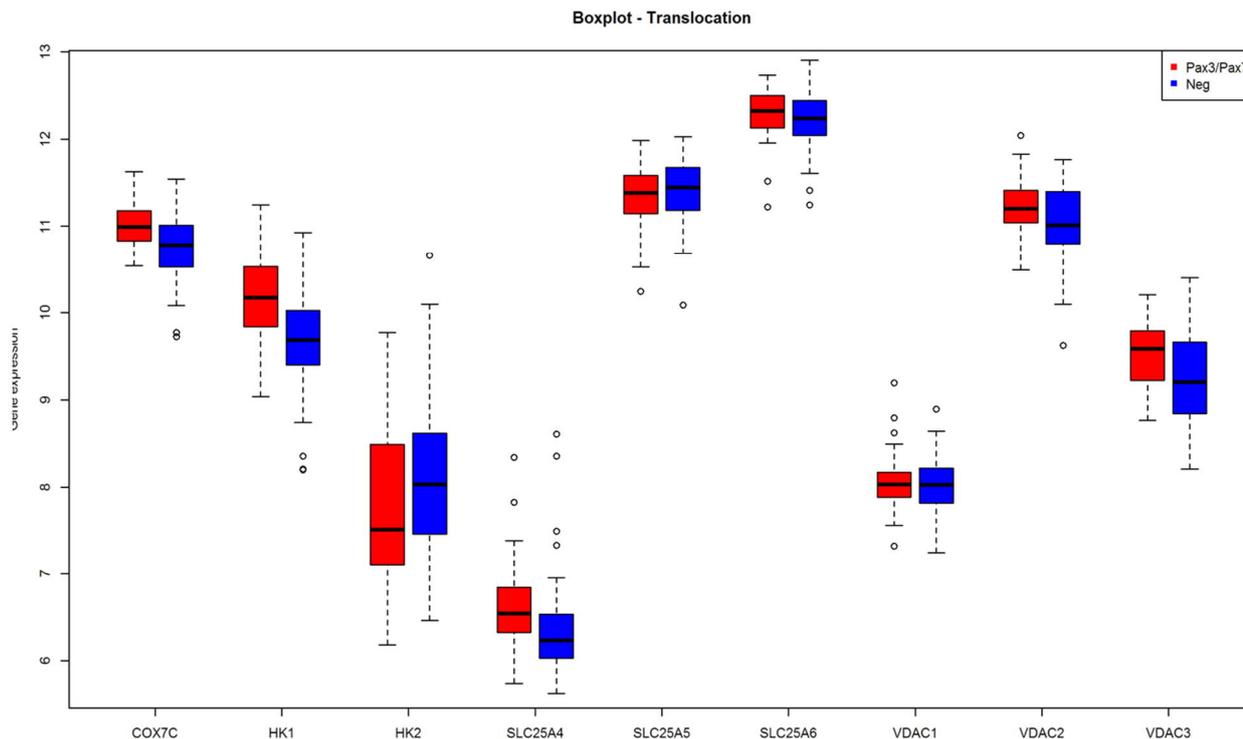


Figure 24 : Comparaison de l'expression des gènes du complexe ANT1 dans les RMS fusion négatif vs RMS fusion positif à partir de la base de données E-TABM-1202.

L'expression de SLC25A4/ANT1 et de 7 de ses partenaires ont été évaluées à l'aide des données transcriptomiques du jeu de données E-TABM-1202. Les boxplots avec moyenne (barre horizontale) et min-max (barres d'erreur) sont représentées.

>>> Nous avons donc émis l'hypothèse que des modifications du niveau d'expression de SLC25A4 pourraient avoir un impact sur le potentiel oncogénique des cellules tumorales de RMS.

b. Impact du niveau d'expression d'ANT1 sur la prolifération cellulaire.

i. Etablissement de modèles cellulaires

Pour évaluer l'impact de l'expression d'ANT1 dans les RMS, deux types de modèles cellulaires ont été mis en place à partir de deux lignées de RMS (CCL-136 et ACC-489). Des stratégies de CRISPR-Cas9 et utilisant le système Tet-On ont permis respectivement l'inactivation ou la surexpression conditionnelle de l'expression du gène SLC25A4 de manière inductible dans le temps, en réponse à la doxycycline (DOX).

ii. Modulation de l'expression de ANT1 et prolifération cellulaire

Grâce notamment aux constructions cellulaires CRISPR-Cas9 décrites ci-dessus, nous avons montré que la diminution d'ANT1 augmente la prolifération de la lignée CCL-136, mais n'a pas d'impact sur la lignée ACC-489. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'expression du gène SLC25A4 est deux fois plus importante dans les CCL-136 par rapport aux ACC-489, et que l'extinction de son expression est beaucoup plus efficace dans les ACC-489. On peut donc penser que les ACC-489 ont déjà atteint un seuil minimal optimal de prolifération au regard de l'expression d'ANT1.

iii. Impact du niveau d'expression d'ANT1 sur le métabolisme cellulaire

Des études métabolomiques et de Seahorse ont été réalisées en collaboration avec l'équipe des Dr Fauvelle (Institut des Neurosciences, Grenoble) et du Dr Carré (Centre de recherche en cancérologie de Marseille), nous indiquant que la modulation de l'expression d'ANT1 dans les CCL-136 s'accompagne de modifications métaboliques, susceptibles d'expliquer l'effet observé sur la prolifération.

c. Impact du niveau d'expression d'ANT1 sur la mort cellulaire

i. Impact du niveau de l'expression d'ANT1 en conditions basales sur la survie cellulaire

Les constructions cellulaires inductibles par la DOX permettent de moduler l'expression d'ANT1 de façon graduelle en fonction de la concentration de DOX. Pour l'ensemble des tests cellulaires réalisés, nous avons choisi de moduler l'expression d'ANT1 à des seuils n'affectant pas la survie cellulaire en conditions basales, afin de rester dans des gammes d'expression physiologique, même si ces niveaux sont difficiles à déterminer.

ii. Niveau d'expression d'ANT1 et résistance au stress oxydatif

ANT1 est supposé jouer un rôle dans la régulation du stress oxydatif. Nous avons donc cherché à définir l'impact de la modulation de son expression sur un stress induit par traitement au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans les deux lignées cellulaires, nous avons observé que la réexpression d'ANT1 suffit à augmenter la sensibilité des cellules tumorales à ce composé.

iii. Impact du niveau d'expression d'ANT1 sur la résistance aux traitements

Nous avons également cherché à définir l'impact d'ANT1 sur la réponse à deux chimiothérapies, la vincristine et le paclitaxel, plus représentatifs des traitements actuels dans les RMS. Les conclusions sont identiques à ce que l'on a pu observer avec le traitement au peroxyde d'hydrogène, avec une potentialisation de la réponse à ces drogues lorsqu'ANT1 est ré-exprimé dans les cellules.

d. Impact de la réexpression d'ANT1 *in vivo* sur la croissance tumorale

Nous avons montré que la réexpression d'ANT1 dans des modèles murins immunodéprimés de xénogreffe sous cutanée à partir des lignées de RMS suffit à freiner la croissance tumorale *in vivo*, suggérant qu'un niveau élevé d'ANT1 puisse avoir un effet suppresseur de tumeurs.

Article

Low expression of ANT1 confers selective advantages to rhabdomyosarcoma tumor cells.

Vial J, Basset F*, Fagault S*, Creveaux M, Richert I, Neves D, Rossi M, Rieusset J, Fauvelle F, Sujobert P, Bouquet F, Carré M, Weber K, Castets M.

ABSTRACT

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most frequent form of pediatric soft-tissue sarcoma. It is divided into 2 main subtypes: ERMS (embryonal) and ARMS (alveolar). Current treatments are based on chemotherapy, surgery and radiotherapy. 5-year survival rate remains of 70% since 2000, despite several clinical trials.

RMS cells derive from muscle lineage precursors. During myogenesis, primitive myoblasts differentiation into myotubes requires a metabolic switch to support the increased energetic demand of contractile muscle. This process is notably supported by expression of genes involved in oxydative phosphorylation, such as SLC25A4.

This gene encodes a mitochondrial protein named ANT1, which has a functional duality as it is involved both in metabolism via regulation of ATP release from mitochondria to cytosol, but also in apoptosis as part as the mPTP (mitochondria Permeability Transition Pore) leading to the release of cytochrome c under stress. By bioinformatic analysis of transcriptomic databases, we observed that ANT1 expression is low in RMS. To deal with this result in depth, we designed modified RMS cells inactivated for ANT1 using CRISPR/CAS9 technology or overexpressing this protein, using a Tet-On system. Using these models, we show that loss of ANT1 expression favors RMS cells proliferation until a minimal threshold, by modifying tumor cell metabolism, and confers them resistance to death notably upon chemotherapeutic treatments. Reciprocally, reexpression of ANT1 at physiological level is sufficient to sensitize tumor cell to these drugs and to prevent tumor growth in a xenograft murine model of RMS.

INTRODUCTION

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most frequent form of paediatric soft tissue sarcoma, accounting for 5% of solid paediatric tumors (1, 2). Aggressive first-line treatment generally combines chemotherapy (combination of vincristine, dactinomycin and cyclophosphamide) and secondary surgery, often associated with radiotherapy. However, 5-years survival rate of patients with metastases is less than 20%. Molecular basis of RMS remain unclear, notably in the sizeable fraction of translocation negative tumors. In particular, if overall survival has been correlated with the expression of Bcl family members in patients and resistance to apoptosis linked to failure of conventional therapies in RMS cell lines, characterization of cell death pathways altered in this cancer is still lacking [6].

RMS share features with cells of the muscle lineage and it is thought to arise from malignant transformation of muscle precursors (2). ERMS tumors histologically resemble embryonic muscle. The term “Embryonal” was indeed used to underline the fact that tumor cells look like developing skeletal myocytes (2). ERMS cells seem to present various degree of myogenic differentiation, ranging from small round cells to larger oblong ones, sometimes having a strap-like appearance for the most differentiated ones, occasionally with cross striations and multinucleation (2). Besides these morphological observations supporting myoblast-like nature of tumor cells, RMS expression signatures are also characterized by widespread expression of adult or embryonic muscle specific markers such as Myogenin, Desmin or MyoD for example (3-5). Due to its specificity, nuclear expression of Myogenin is notably routinely used in RMS differential diagnosis (6). In ARMS, expression of PAX-FOXO1 fusion proteins was shown to be sufficient to drive expression of myogenic markers such as MyoD and Myogenin, which is reminiscent of the myogenesis genetic program driven by Pax3/7 transcription factors during development (2). Finally, even if the precise cellular origin of RMS is still a matter of debate, some arguments support a myogenic progenitor cell origin of RMS: expression of SV40 early region and H-ras, combined with *p53* inactivation in adult human skeletal myoblast is for instance sufficient to give rise to tumors resembling ERMS (7).

Recently, the notion that molecular pathogenesis of myogenic cancers, and notably RMS, could share similarities with muscular dystrophies has begun to emerge (4). Increased propensity to develop RMS has been reported in some murine models of dystrophies (4, 8, 9). This is thought to result from induction of inflammation, fibrosis and oxidative stress that accompanies both tumor development and muscular dystrophies.

Interestingly, some of the molecules described as deregulated in dystrophies have also been connected to RMS occurrence and reciprocally. It was notably very recently shown that intragenic deletions in *dystrophin*, mutated in DMD and BMD, are one of the underlying causes of tumor escape in RMS (4, 8, 9). DUX4, whose gain of expression is now recognized to be largely responsible for FSHD (Facio-Scapulo Humeral Dystrophy), has also been reported to be altered by a t(4;22)(q35;q12) chromosomal translocation in a case of RMS (10) and DUX4-related proteins have been shown to be expressed in human RMS cell lines (11). Reciprocally, significant enrichment of cancer-related genes has been observed among those altered in FSHD myoblasts and myotubes, thereby suggesting that pathogenesis of dystrophies and cancers could indeed be driven by modifications of a common set of genes (10). Altogether, these observations strongly suggest that: (i) an overlap exists between the molecular pathogenesis involved in RMS and in muscular dystrophies; (ii) molecular abnormalities can possibly be identical or opposite. Identification of the intersection in defects existing in both types of disorders -*via* design of a comparative approach- could then efficiently highlight alterations causally involved in their etiology.

We then made the hypothesis that genes involved in cell survival/death imbalance in muscular dystrophies etiology could then play a role in RMS tumorigenesis. We decided to focus on the role that ANT1 (Adenine Nucleotide Translocator 1) could play in these cancers. ANT1 is the heart and muscle-specific isoform of the Adenine Nucleotide Translocator mitochondrial inner membrane proteins family, whose expression is altered in FSHD (Facio-Scapulo Humeral Dystrophy) and in two other syndromes with muscular defects (12-14). ANT1 regulates ADP/ATP exchange across the mitochondrial inner membrane, and opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), being as such involved both in cell death and metabolism regulation.

Here, we show that ANT1 is expressed at low levels in RMS tumors. Using inducible CRISPR-Cas9 and Tet-On strategy, we observed that modulation of ANT1 level of expression both impacts cell proliferation, via metabolism modifications, and sensitivity to stress. Restoration of ANT1 expression is sufficient to increase tumor cell death in response to chemotherapies, and to slow down tumor growth *in vivo*. Thereby, alterations in ANT1 expression in RMS could impact the cell death/survival balance and increase oncogenic properties of RMS tumoral cells.

RESULTS

Expression of ANT1 is low in RMS samples.

Alterations of ANT1 expression level have been reported in several disorders and notably associated with muscular defects. In the inner mitochondrial membrane, ANT1 is part of multiproteic complexes, including proteins involved in ATP/ADP export and metabolism (COX7C, HK1, HK2) and/or in mPTP opening (VDAC1/2/3). To analyse the expression level of ANT1 in RMS, we first performed a bioinformatic analysis of the publicly available GSE28511 dataset, dedicated to the comparison of normal skeletal muscle tissue (n=6) versus RMS (n=8 ERMS and n=10 ARMS). We observed that the expression of ANT1 encoding gene, SLC25A4, is significantly lower in RMS than in non-tumoral skeletal muscle, and this is also the case of its partners (Figure 1A). Reciprocally, the level of expression of ANT2 encoding gene, SLC25A5, is increased in tumors, as previously reported in other cancers (15, 16). We confirmed this result by Q-RT-PCR, ANT1 expression level being significantly lower in RMS samples than in adult, fetal and dystrophic muscles (Figure 1B). ANT1 expression was slightly but significantly higher in Pax3/7-FOXO1 fusion-positive RMS as compared to fusion-negative tumors in two independent transcriptomic datasets (Figure 1C). Thus, ANT1 expression appears to be low in RMS samples and could be correlated to the Pax3/7-FOXO1 translocation status.

Decrease in ANT1 expression favors tumor cell proliferation until a minimal threshold.

To assess the impact of ANT1 expression level on tumor cells, we first screened ANT1 expression in different cell lines by Q-RT-PCR (Figure 2A). We observed that ANT1 expression level is higher in the ERMS CCL-136 cell line. We then decided to start studying impact of ANT1 silencing in these cells. We set up a stable doxycycline-inducible CRISPR-Cas9 system that leads to a reduction in ANT1 expression of 80% (Figure S1B), without impact on ANT2 expression (Figure S1C). We observed that decrease in ANT1 expression in these cells is associated to a 42.5% increase in the number of viable cells in normal growth conditions (Figure 2B). Cell number was respectively increased by 2.8, 2.1 and 1.85, 24h, 48h and 72h post-silencing as measured by WST1 assay (Figure 2C). Similar result was observed after silencing of ANT1 by siRNA in immortalized myoblasts (Figure S2A). This phenotype does not result from a decrease in cell death as shown in Figure 2D, suggesting that this most likely results from increase in cell proliferation rate. Interestingly, decrease of ANT1 expression level has no impact on cell proliferation in normal growth conditions in

ACC-489 ARMS cells, whose basal ANT1 level is half as CCL-136 (Figure S1D-E). Since ANT1 is known to play a role in metabolism regulation through control of ADP/ATP exchange, we wondered whether metabolic changes may be associated with modulation of its expression level. Metabolomic analysis revealed significant decrease in ATP, Threonine, Glycine, Glutathion and Alanine in ANT1 CRISPR-Cas9 cells, whereas expression levels of Scyllo-inositol, Choline and Glycerophosphocholine are significantly increased (Figure 2E). Decrease of ANT1 expression is associated with an increase in oxygen consumption rate (OCR, Figure 2G) and a decrease in extracellular acidification rate (ECAR), which is a marker of glycolysis rate (Figure 3F). CRISPR-Cas9 ANT1 RMS cells are more sensitive to the glycolysis inhibitor 2-Deoxyglucose (Figure 2H).

Altogether, these data suggest that low ANT1 expression until a minimal threshold level likely favors tumor cell proliferation by promoting oncogenic metabolic switch.

Low levels of ANT1 favors resistance of tumor cells to death induced by stress and chemotherapies

ANT1 was shown to play a role in cell death induction, as part of the mPTP. Opening of this mitochondrial pore indeed leads to mitochondrial membrane permeabilisation and to the release of apoptotic factors such as cytochrome c in the cytoplasm.

Since ANT1 was shown to play a role in oxidative stress response (17), we decided to study impact of modulation of its expression level in response to H₂O₂ treatment. Silencing of ANT1 is associated with an increase in the viable CCL-136 cells number (Figure 3A) and to a decrease in the fraction of apoptotic cells (Figure 3B). We designed Tet-On inducible stable CCL-136 and ACC-489 cell lines to define the impact of restoration of ANT1 expression on cell death (Figures S2A-F). Whereas ANT1 re-expression at physiological level has no impact on cell death in normal growth conditions (not shown), it is sufficient to drive increase sensitivity to H₂O₂ treatment both in CCL-136 and ACC-489 cell lines (Figure 3C-D and Figure S2G-H). Interestingly, the level of thiols in the free reduced state is significantly higher in ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells than in control ones (Figure 3E), suggesting that the system involved in detoxification of reactive oxygen species is more efficient in the ANT1 silenced cells, which could explain their decreased sensitivity to H₂O₂ treatment. Reciprocally, the level of thiols in the free reduced state is significantly lower in ANT1 Tet-On CCL-136 cells (not shown), which could explain their higher sensitivity to H₂O₂ treatment. We then assessed impact of ANT1 expression modulation on sensitivity to chemotherapies. As shown on Figures 3F-G, decrease and upregulation of ANT1 expression

are respectively associated with prevention and promotion of upward sensitivity to chemotherapies treatments, as exemplified with Paclitaxel. Same results were obtained with vincristine (not shown). To go one step further, we set up RMS spheroid models using both control and Tet-On ACC-489 RMS cells. We observed that reexpression of ANT1 in this 3D-system is also sufficient to decrease resistance to chemotherapies (Figure 3H, left panel), likely via apoptosis induction since it is associated with an increase in caspase-3 activity (Figure 3H, right panel). Altogether, these results suggest that ANT1 could modulate RMS tumor cell ability to survive to stress, by yet unknown mechanisms that could both include regulation of apoptosis induction and oxidative stress response.

Restoration of ANT1 expression is sufficient to slow down RMS tumor growth in vivo.

Since ANT1 expression level is low in human RMS biopsies and since its reexpression is associated with increased sensitivity to stress *in vitro*, we decided to study its impact on tumor growth *in vivo*. To do so, we designed a murine xenograft model. ACC-489 RMS control and ANT1-Tet-On cells were grafted in immunocompromised mice. When tumors reach 200 mm³, ANT1 expression was induced by treating mice with doxycycline. As shown on Figure 4C, ANT1 expression was significantly increased after doxycycline treatment in tumors derived from ANT1-Tet-On cells as compared to control ones. Then, we evaluated impact of ANT1 reexpression on tumor growth and observed that it is sufficient to significantly slow down tumor growth *in vivo* from the second day (Figure 4A).

Then, ANT1 could act as a tumor suppressor at a certain threshold, likely by promoting tumor cell death.

FIGURES LEGENDS

Figure 1 : Expression of ANT1 is low in RMS samples.

(A) Bioinformatic analysis of the expression of SLC25A4 and of some of its partners in a cohort of non-tumoral muscle (n=6), ERMS (n=8) and ARMS (n=10) from the GSE28511 transcriptomic dataset. *: $p < 0.05$, two-sided Mann-Whitney U-test. (B) Quantification of SLC25A4 expression by Q-RT-PCR, relatively to *HPRT* housekeeping gene in RMS biopsies (n=67), normal adult muscle (n=5), foetal muscle (n=9), and in biopsies from patients with muscle weakness (BD: Becker Dystrophy, DMD: Duchenne Muscular Dystrophy, n=5 each). *: $p < 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test. (C) Bioinformatic analysis of the expression of SLC25A4 in a cohort of RMS biopsies including ERMS (n=36) here pooled with fusion-negative ARMS (n=20) on one side and fusion-positive ARMS (n=44) on the other side, from the E-TABM-1202 transcriptomic dataset. *: $p < 0.05$, U-test. (D) Bioinformatic analysis of the expression of SLC25A4 in a cohort of RMS biopsies including ERMS (n=36) here pooled with fusion-negative ARMS (n=7) on one side and fusion-positive ARMS (n=29) on the other side, from the Cufflinks transcriptomic dataset by Khan lab. *: $p < 0.05$, two-sided Mann-Whitney U-test.

Figure 2 : Decrease in ANT1 expression favors tumor cell proliferation until a minimal threshold.

(A) Quantification of SLC25A4 expression by Q-RT-PCR, relatively to *HPRT* housekeeping gene in ERMS cell lines (CCL-136 and CCL-250), and ARMS cell lines (ACC-489 and ACC-592). Results are presented as means \pm std ; n=3. (B) Increase in viable cells concentration in ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells, 48 hours after silencing of ANT1 expression by doxycycline treatment. Results are presented as means \pm std ; n=3. *: $p \leq 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test. (C) Increase in cell proliferation as measured by WST1 assay in ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells, at different time points after silencing of ANT1 expression by doxycycline treatment. Results are presented as means \pm std ; n=3. *: $p \leq 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test. (D) Absence of changes in apoptosis cell rate in ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells, 48 hours after silencing of ANT1 expression by doxycycline treatment. Mitochondrial membrane polarization (polarized) is used as a marker of the fraction of viable cells, whereas cells engaged in the apoptotic process correspond to the depolarized and DAPI positive cells. Results are presented as means \pm std ; n=3. *: $p \leq 0.05$;

two-sided Mann-Whitney U-test. (E) Changes in metabolites abundance in ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells as compared to control ones. Threo: Threonine, Gly: Glycine, GSH: Glutathion, Ala: Alanine, GPC: Glycerophosphocholine, Scyllo: Scylloinositol, Chol: Choline. Results are presented as means \pm std of the ratio between metabolites abundance in ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells as compared to control ones ; n=5. (F) Extracellular Acidification Rate Rate (ECAR) in ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells as compared to control ones, as a hallmark of glycolysis. Results are presented as means \pm std ; n=3. (G) Oxygen Consumption Rate (OCR) measured by Seahorse in ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells as compared to control ones. O: Olygomycine, R: Rotenone. Results are presented as means \pm std ; n=3. (H) Increase in cell growth inhibition in ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells treated with the glycolysis inhibitor 2-deoxyglucose, as compared to control cells. Results are presented as means \pm std ; n=3. *: $p\leq 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test.

Figure 3 : Low levels of ANT1 favors resistance of tumor cells to death induced by stress and chemotherapies

(A) Increase in viable cells concentration in ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells treated during 6 hours by H₂O₂, 48 hours after silencing of ANT1 expression by doxycycline treatment, compared to control cells. Results are presented as means \pm std ; n=3. *: $p\leq 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test. (B) Decreased sensitivity to death of ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells treated during 6 hours by H₂O₂, 48 hours after silencing of ANT1 expression by doxycycline treatment, compared to control cells. Mitochondrial membrane polarization (polarized) is used as a marker of the fraction of viable cells, whereas cells engaged in the apoptotic process correspond to the depolarized and DAPI positive cells. Results are presented as means \pm std; n=3. *: $p\leq 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test. (C) Decrease in viable cells concentration in ANT1 Tet-On CCL-136 cells treated during 6 hours by H₂O₂, 24 hours after induction of ANT1 expression by doxycycline treatment, compared to control cells. Results are presented as means \pm std ; n=3. *: $p\leq 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test. (D) Increased sensitivity to death of ANT1 Tet-On CCL-136 cells treated during 6 hours by H₂O₂, 24 hours after silencing of ANT1 expression by doxycycline treatment, compared to control cells. Mitochondrial membrane polarization (polarized) is used as a marker of the fraction of viable cells, whereas cells engaged in the apoptotic process correspond to the depolarized and DAPI positive cells. Results are presented as means \pm std ; n=3. *: $p\leq 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test. (E) Increase in the fraction of cells with thiols in the free reduced state in ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells in normal growth conditions, 48 hours

after silencing of ANT1 expression by doxycycline treatment, compared to control cells. PI: propidium iodide, used as a marker of cell death. Results are presented as means \pm std ; n=3. *: $p\leq 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test. (F) Decreased sensitivity of ANT1 CRISPR-Cas9 CCL-136 cells to 24 hours of Paclitaxel treatment, 48 hours after silencing of ANT1 expression by doxycycline treatment, compared to control cells (WST1 assay). Results are presented as means \pm std ; n=3. *: $p\leq 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test. (G) Increased sensitivity of ANT1 Tet-On CCL-136 cells to 24 hours of Paclitaxel treatment, 24 hours after silencing of ANT1 expression by doxycycline treatment, compared to control cells (WST1 assay). Results are presented as means \pm std ; n=3. *: $p\leq 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test. (H) Left panel: increased sensitivity of ANT1 Tet-On ACC-489 3D spheroids to Paclitaxel treatment, compared to control 3D structures (Cell Titer Glow assay). Results are presented as means \pm std ; n=5. *: $p\leq 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test. Right Panel: increase in Caspase-3 activity in ANT1 Tet-On ACC-489 3D spheroids after Paclitaxel treatment, compared to control 3D structures. Spheroids were imaged by SPIM after active Caspase 3 (green) and DAPI (blue) immunostainings. Representative images are shown.

Figure 4 : Restoration of ANT1 expression is sufficient to slow down RMS tumor growth in vivo.

(A) Re-expression of ANT1 after doxycycline administration slows down tumor growth in a murine xenograft model of RMS. SCID mice were engrafted with control or ANT1 Tet-On ACC-489 cells by subcutaneous injection. When tumor size reached around 200mm³, doxycycline was administered to mice to induce ANT1 expression in Tet-On tumors. Results are presented as mean tumor volumes \pm 95%CI; *: $p<0.05$, **: $p\leq 0.01$; two-sided Mann-Whitney U-test. (C) Histological analysis of tumors by Hematoxylin and Eosin staining. (C) Immunoblot showing efficiency of ANT1 re-expression in tumors obtained from ANT1 Tet-On ACC-489 cells after doxycycline injection (n=2), as compared to ANT1 expression level in tumors from control ACC-489 cells (n=2).

Supplementary Figure 1: Efficiency of an inducible CRISPR-Cas9 strategy to silence ANT1 expression in RMS cells and impact on cell growth

(A) Increase in viable cells concentration viable cells concentration in myoblasts, 48 hours after silencing of ANT1 using a siRNA strategy. Results are presented as means \pm std ; n=3. *: $p\leq 0.05$; two-sided Mann-Whitney U-test. (B) Efficiency of ANT1 silencing by CRISPR-

Cas9 in CCL-136 cells, 48 hours after doxycycline treatment. Quantification of SLC25A4 expression by Q-RT-PCR, relatively to *HPRT* housekeeping. (C) Specificity of ANT1 silencing by CRISPR-Cas9 in CCL-136 cells, 48 hours after doxycycline treatment. No impact was observed on SLC25A5 expression quantified by Q-RT-PCR, relatively to *HPRT* housekeeping. (D) Efficiency of ANT1 silencing by CRISPR-Cas9 in ACC-489 cells, 48 hours after doxycycline treatment. Quantification of SLC25A4 expression by Q-RT-PCR, relatively to *HPRT* housekeeping. (D) Absence of significant changes in viable cells concentration in ANT1 CRISPR-Cas9 ACC-489 cells, at different time points after silencing of ANT1 expression by doxycycline treatment. Results are presented as means \pm std ; n=3.

Supplementary Figure 2: Efficiency of an inducible Tet-On strategy to induce ANT1 expression in RMS cells and impact on cell growth

(A-C) Efficiency of ANT1 induction by Tet-On system in CCL-136 cells, 48 hours after doxycycline treatment, as shown by quantification of SLC25A4/ANT1 expression by Q-RT-PCR, relatively to *HPRT* housekeeping (A), immunoblot with actin as a control (B), and immunofluorescence showing colocalisation with the cytochrome c mitochondrial marker (C). (D-F) Efficiency of ANT1 induction by Tet-On system in ACC-489 cells, 48 hours after doxycycline treatment, as shown by quantification of SLC25A4/ANT1 expression by Q-RT-PCR, relatively to *HPRT* housekeeping (D), immunoblot with actin as a control (E), and immunofluorescence showing colocalisation with the cytochrome c mitochondrial marker (F). (G) Increased sensitivity to death of ANT1 Tet-On ACC-489 cells treated during 6 hours by H₂O₂, 24 hours after silencing of ANT1 expression by doxycycline treatment, compared to control cells. Mitochondrial membrane polarization (polarized) is used as a marker of the fraction of viable cells, whereas cells engaged in the apoptotic process correspond to the depolarized and DAPI positive cells. Results are presented as means \pm std ; n=3. *: p \leq 0.05; two-sided Mann-Whitney U-test. (H) Decrease in viable cells concentration in ANT1 Tet-On ACC-489 cells treated during 6 hours by H₂O₂, 24 hours after induction of ANT1 expression by doxycycline treatment, compared to control cells. Results are presented as means \pm std ; n=3. *: p \leq 0.05; two-sided Mann-Whitney U-test.

MATERIAL AND METHODS

Patients and RNA samples:

RMS (n=67) on one side and adult (n=5), foetal (n=9), DMD (n=5), BD (n=5) and denervated (n=5) muscle biopsies were respectively collected by Centre Léon Bérard and Hospices Civils de Lyon (France). Tissues banking and researches conducted were performed according to national ethical guidelines. Sections of 10µm in thickness were taken from each paraffin-embedded block, deparaffinized and each sample was retrieved in a 2mL collection tube. Tissues were then lysed in 200µL of ATL buffer (Qiagen) with 2µL Proteinase K (Roche). 1mL of Trizol (Life Technologies) was then added to isolate total RNA, before classical purification using 200µL chloroform and 500µL isopropanol with 1µL of Glycoblu (ThermoFisher). After washing in ethanol 75%, digestion of contaminant genomic DNA was performed 1h at 37°C by resuspending the nucleic acid pellets in 15 µL of 1x buffer containing 0.25 µL of 100 mM DTT, 2 µL of 1M DNase and 1µL of RNAsine. A new step of precipitation by isopropanol/ethanol was then performed again to eliminate DNase and RNA samples were frozen (-80°C) before use.

2D and 3D cell cultures

In vitro studies were conducted using the human CCL-136 and CCL-250 ERMS cells (ATCC), and the ACC-489 and ACC-592 ARMS cells (DSMZ). CCL-136 and ACC-489 cells were routinely maintained under standard conditions (37°C and 5% CO₂ in humidified incubator) respectively in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) or in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) supplemented with 10% FBS. 3D spheroids were obtained by seeding 2500 ACC-489 cells into 96 wells low-attachment plates during 3 days.

Generation of stable cell lines

- CRISPR-Cas9 system

To generate stable knock-down cell lines, a conditionnal crispr Cas9-KRAB system was used. Cas9 and KRAB from *Streptococcus pyogenes* are placed under the control of a tetracycline-inducible promoter in pHAGE TRE dCas9-KRAB plasmid conferring a G418 resistance. Human SLC25A4 coding sequence was cloned at BfuA1 sites in the pLKO.1-puro U6 sgRNA BfuA1 stuffer, conferring puromycine resistance. CCL-136 and ACC-489 cell lines were transduced with both plasmids thanks to a lentiviral transfection and using

lipofectamine, according to manufacturer's instructions. Both vectors are available from Addgene. Stable cell clones were selected for 10 days in G418 and Puromycin-containing medium. All stable knock down cell lines were further tested for SLC25A4 expression in response to doxycycline.

- Tet-On system

To generate inducible stable cell lines, human SLC25A4 coding sequence was cloned at Sall and ClaI sites in the pITR plasmid, a sleeping beauty-based vector allowing the doxycycline inducible expression of SLC25A4, using Zeocin resistance gene and red fluorescent protein (mCherry) as selection markers. CCL-136 and ACC-489 cell lines were transfected with SLC25A4-pITR and a sleeping beauty transposase expression vector (SB100X). pITR vector was a generous gift of Prof. Rolf Marschalek (Goethe-University of Frankfurt, Germany). Stable cell clones were selected for 10 days in zeocin-containing medium. Then control and SLC25A4 stable cell lines were sorted by flow cytometry to select mCherry positive cells, as the stable inducible cells. All the stable inducible cell lines were further tested for SLC25A4 expression in response to doxycycline.

Quantitative RT-PCR:

Total RNA from murine xenografted tumors and cell lines was extracted using the Nucleospin RNAII kit (Macherey- Nagel) and 1µg was reverse-transcribed using the iScript cDNA Synthesis kit (BioRad). Expression of SLC25A4 [forward primer (5'CAAGGGGAT GCTGCCTGACC3') and reverse primer (5'GGACTGCATCATCATTCTACG3')] and of SLC25A5 [forward primer (5'CACTGCAAAGGGAATGCTTCCGG3') and reverse primer (5'GTACATGATGTCAGTTCCTTTGCG3')] were assessed by real-time quantitative RT-PCR on a LightCycler 480 apparatus (Roche) using the LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix, according to manufacturer's instructions (Roche). The ubiquitously expressed HPRT1 [forward primer (5'TGACACTGGCAAAACAATGCA3') and reverse primer (5'GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT3')] was used as internal calibrator.

Viability and Cell Counting :

Stable inducible cells were seeded onto 6-well-plates at a density of 1×10^5 cells/well and induction/expression of ANT1 expression was induced by doxycycline treatment. Cells were collected at different time points as described in figure legends, and eventually treated with H₂O₂ or chemotherapies. NucleoCounter (Chemometec, Allerød, Denmark) was used to

determine cell number and viability according to the procedure provided by the manufacturer, using a technique based on two different dyes, Acridine Orange staining the entire population of cells and DAPI staining the nonviable cells, respectively.

For WST1 assay, cells were seeded into 96-well plates at 8000 cells/well and eventually treated with 2-Deoxyglucose for 24 hours. After 24h, 48 and 72h WST1 assays were performed using Cell Proliferation Reagent WST-1 (Cat No.11644807001; Roche), according to the manufacturer's instructions. Cells were analyzed using a spectrofluorometer (Tecan Infinite® M1000 PRO).

Mitochondrial potential assay :

Stable inducible cells were seeded onto 6-well-plates at a density of 1×10^5 cells/well). After 24h, cells were treated with doxycycline, and subsequently eventually with H₂O₂ or chemotherapies. Cells were then collected, washed with 1ml PBS 1X, and each sample was resuspended in 12.5µl of Solution 7 (Chemometech). After incubation at 37°C for 10 minutes, stained cells were centrifuged at 400g for 5 min at room temperature and the supernatant was then removed completely without disturbing the cell pellet. Cell pellet was rinsed twice in 1 mL PBS 1X and then resuspended in 0.25mL of Solution 8 (Chemometech). Stained cells were analyzed by using NucleoCounter NC-3000 (Chemometec).

Western-blot & Co-immunofluorescence :

Total protein from murine xenografted tumors and cell lines were lysed in 500µL of a pH7.6 solution containing 50mM Hepes-Sodium, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% NP40 in the presence of protease inhibitors (Roche). Protein extracts were then analysed by immunoblot. Briefly, proteins were loaded onto 10% SDS-polyacrylamide gels and blotted onto PVDF sheets (BioRad) using TurboBlot technology (BioRad). Filters were blocked with 10% non-fat dried milk and 5% BSA in PBS/0.1% Tween 20 (PBS-T) for one hour and then incubated overnight with anti-ANT1 (sc-9299, Santa Cruz) or anti-β-actin (mAB1501R, Sigma). After three washes with PBS-Tween 0.1%, filters were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody (1:5000, Jackson ImmunoResearch) for 1 h. Detection was performed using ECL Chemiluminescence System (Pierce). Membranes were imaged on the ChemiDoc Touch Imaging System (Biorad).

Expression of ANT1 and cytochrome c was assessed by co-immunofluorescence on cells fixed 20 minutes in 4% paraformaldehyde and permeabilized in PBS1x/Triton0.2%. ANT1

and cytochrom c expression were analyzed using specific antibodies (respectively sc-9299, Santa Cruz; 1:500 and ab90529, Abcam, 1:500). Fluorescence labelings were obtained using corresponding secondary antibodies coupled to Alexa Fluor-488 or Alexa Fluor-647 at a dilution of 1:500 (Invitrogen).

Metabolic analyses :

Metabolomic analyses were carried in close collaboration with Dr Florence Fauvelle (Institut des Neurosciences, Grenoble) by HRMAS-NMR (High Resolution Magic Angle Spinning-Nuclear Magnetic Resonance) spectroscopy, after cells (1×10^6) washing with D₂O (Deuterium Oxide, Cortecnet) and inclusion in dedicated inserts (Cortecnet).

Real-time metabolic analyses were carried in close collaboration with Dr Manon Carré team (Faculté de pharmacie, Marseille). Simultaneous multiparameter metabolic analysis of live cells was performed in the Seahorse XF24[®] extracellular flux analyzer (Seahorse Bioscience, USA). ACC-489 and CCL-136 cells were seeded in XF24 V7 multi-well plates (15,000 cells per well) for 5 h at 37 °C in 5% CO₂. One hour before recording the glycolytic activity, cell culture medium was replaced with minimal DMEM (0 mM glucose) without phenol red supplemented with 143 mM NaCl, 2 mM glutamine and 1 mM sodium pyruvate, pH 7.4. Extracellular acidification rate (ECAR) was measured under these basal conditions and after sequential injections of glucose (10 mM), of the ATP synthase inhibitor oligomycin (1 μM), and of the glycolysis inhibitor 2-deoxyglucose (100 mM). To record the mitochondrial activity, the same assay medium was used and supplemented with 1 mM sodium pyruvate and 10 mM glucose. Oxygen consumption rate (OCR) was analyzed before and after sequential injections of oligomycin (1 μM), of the electron transport chain uncoupler FCCP (1 μM) and of specific inhibitors of the mitochondrial respiratory chain antimycin A/rotenone (0.5 μM). To normalize OCR and ECAR data to cell number, cells were fixed with glutaraldehyde 1%, stained with violet crystal 0.1% in methanol 20% (Sigma-Aldrich), which was finally solubilized in DMSO to measure dye absorption with a microplate spectrophotometer (600 nm).

Murine Xenograft Model

Five-week-old (20-22g body weight) female SCID mice were obtained from Janvier Labs animal facility. The mice were housed in sterilized filter-topped cages and maintained in a pathogen-free animal facility (ANICAN platform, Cancer Research Center of Lyon). Stable

ACC489 cell lines were implanted by subcutaneous injection of 5×10^6 cells in 100 μ l of growth factors reduced matrigel (Corning) diluted in 100 μ l of PBS into the right flank of the mice. When tumors reached 200 mm³, 1mg of doxycycline in 200 μ l or an equal volume of PPI water for control group was administered per os 3 times per week. Tumor sizes were measured with a calliper. The tumor volume was calculated with the formula $v = 0.5 \times (l \times w^2)$, where v is volume, l is length, and w is width. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations of animal ethics committee (Authorization no CLB_2014_009; accreditation of laboratory animal care by CECCAP, ENS Lyon-PBES, France).

BIBLIOGRAPHY

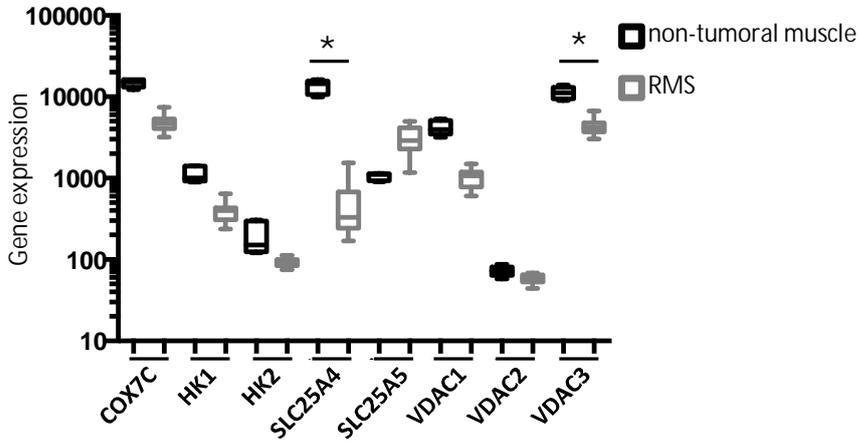
1. Fulda S. Cell death pathways as therapeutic targets in rhabdomyosarcoma. *Sarcoma*. 2012;2012:326210.
2. Saab R, Spunt SL, Skapek SX. Myogenesis and rhabdomyosarcoma the Jekyll and Hyde of skeletal muscle. *Curr Top Dev Biol*. 2011;94:197-234.
3. De Giovanni C, Landuzzi L, Nicoletti G, Lollini PL, Nanni P. Molecular and cellular biology of rhabdomyosarcoma. *Future oncology*. 2009;5(9):1449-75.
4. Fanzani A, Monti E, Donato R, Sorci G. Muscular dystrophies share pathogenetic mechanisms with muscle sarcomas. *Trends Mol Med*. 2013;19(9):546-54.
5. Novak J, Vinklarek J, Bienertova-Vasku J, Slaby O. MicroRNAs involved in skeletal muscle development and their roles in rhabdomyosarcoma pathogenesis. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(11):1739-46.
6. Kumar S, Perlman E, Harris CA, Raffeld M, Tsokos M. Myogenin is a specific marker for rhabdomyosarcoma: an immunohistochemical study in paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol*. 2000;13(9):988-93.
7. Hettmer S, Wagers AJ. Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma. *Nature medicine*. 2010;16(2):171-3.
8. Chamberlain JS, Metzger J, Reyes M, Townsend D, Faulkner JA. Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J*. 2007;21(9):2195-204.
9. Fernandez K, Serinagaoglu Y, Hammond S, Martin LT, Martin PT. Mice lacking dystrophin or alpha sarcoglycan spontaneously develop embryonal rhabdomyosarcoma with cancer-associated p53 mutations and alternatively spliced or mutant Mdm2 transcripts. *Am J Pathol*. 2010;176(1):416-34.
10. Sirvent N, Trassard M, Ebran N, Attias R, Pedeutour F. Fusion of EWSR1 with the DUX4 facioscapulohumeral muscular dystrophy region resulting from t(4;22)(q35;q12) in a case of embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009;195(1):12-8.
11. Kowaljow V, Marcowycz A, Anseau E, Conde CB, Sauvage S, Matteotti C, et al. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord*. 2007;17(8):611-23.

12. Bauer MK, Schubert A, Rocks O, Grimm S. Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *The Journal of cell biology*. 1999;147(7):1493-502.
13. Halestrap AP. Mitochondrial permeability: dual role for the ADP/ATP translocator? *Nature*. 2004;430(7003):1 p following 983.
14. Kaukonen J, Juselius JK, Tiranti V, Kytölä A, Zeviani M, Comi GP, et al. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science*. 2000;289(5480):782-5.
15. Chevrollier A, Loiseau D, Reynier P, Stepien G. Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807(6):562-7.
16. Sharaf el dein O, Mayola E, Chopineau J, Brenner C. The adenine nucleotide translocase 2, a mitochondrial target for anticancer biotherapy. *Current drug targets*. 2011;12(6):894-901.
17. Lena A, Rechichi M, Salvetti A, Vecchio D, Evangelista M, Rainaldi G, et al. The silencing of adenine nucleotide translocase isoform 1 induces oxidative stress and programmed cell death in ADF human glioblastoma cells. *The FEBS journal*. 2010;277(13):2853-67.

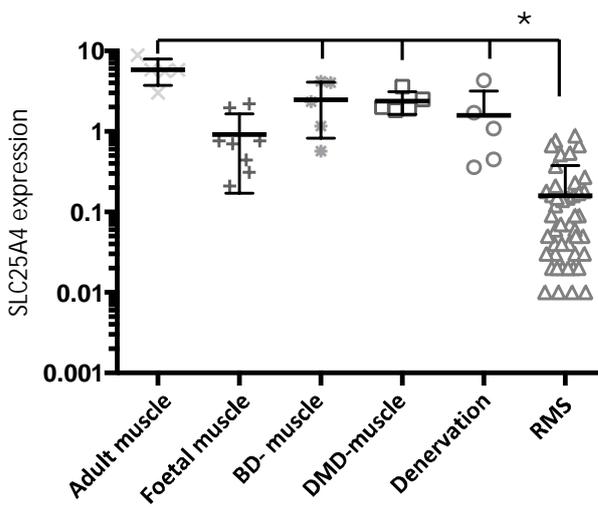
Figures

Figure 1

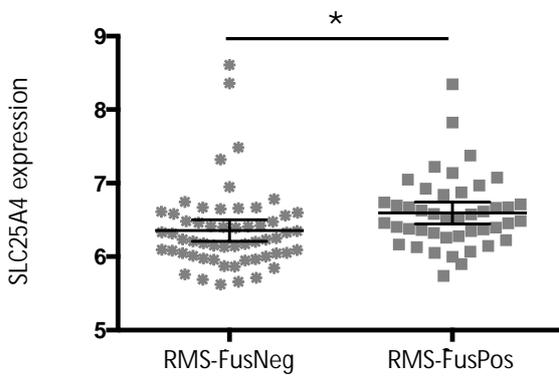
A



B



C



D

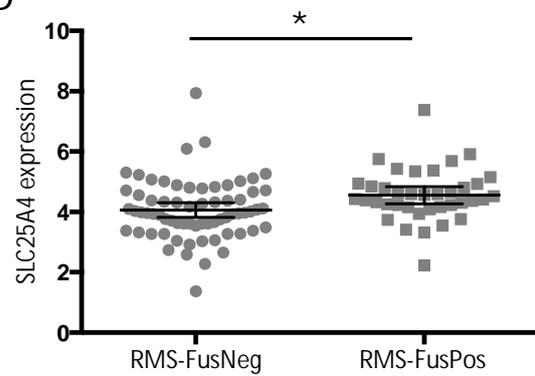


Figure 2

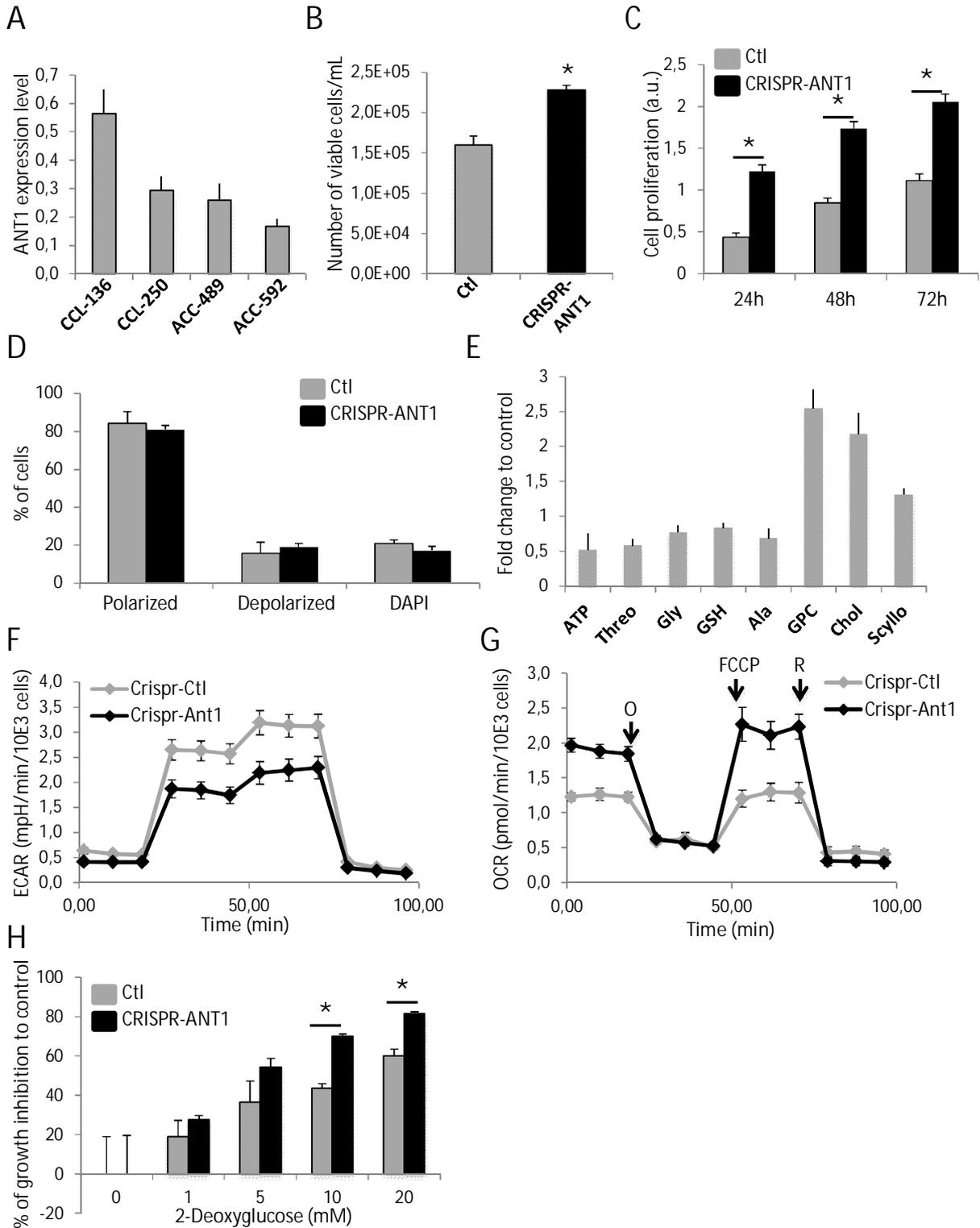


Figure 3

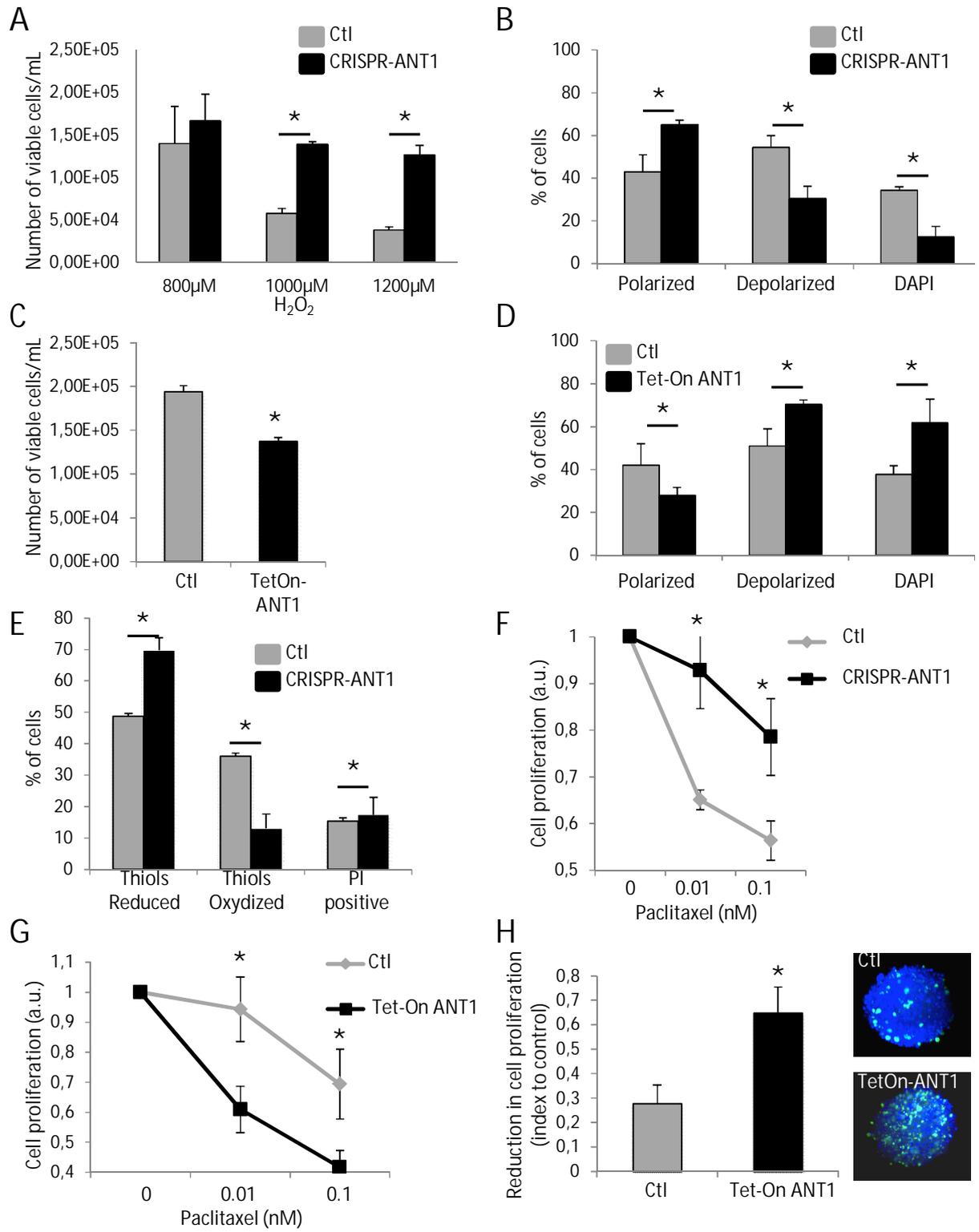
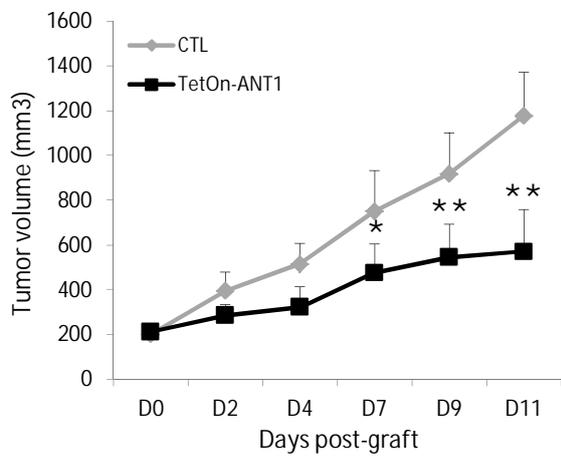
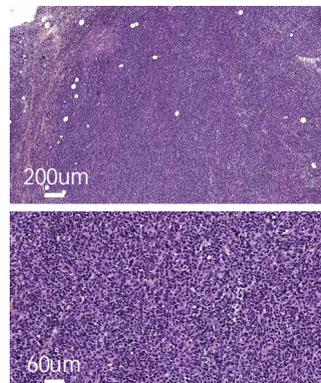


Figure 4

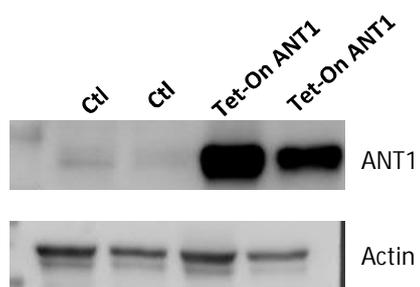
A



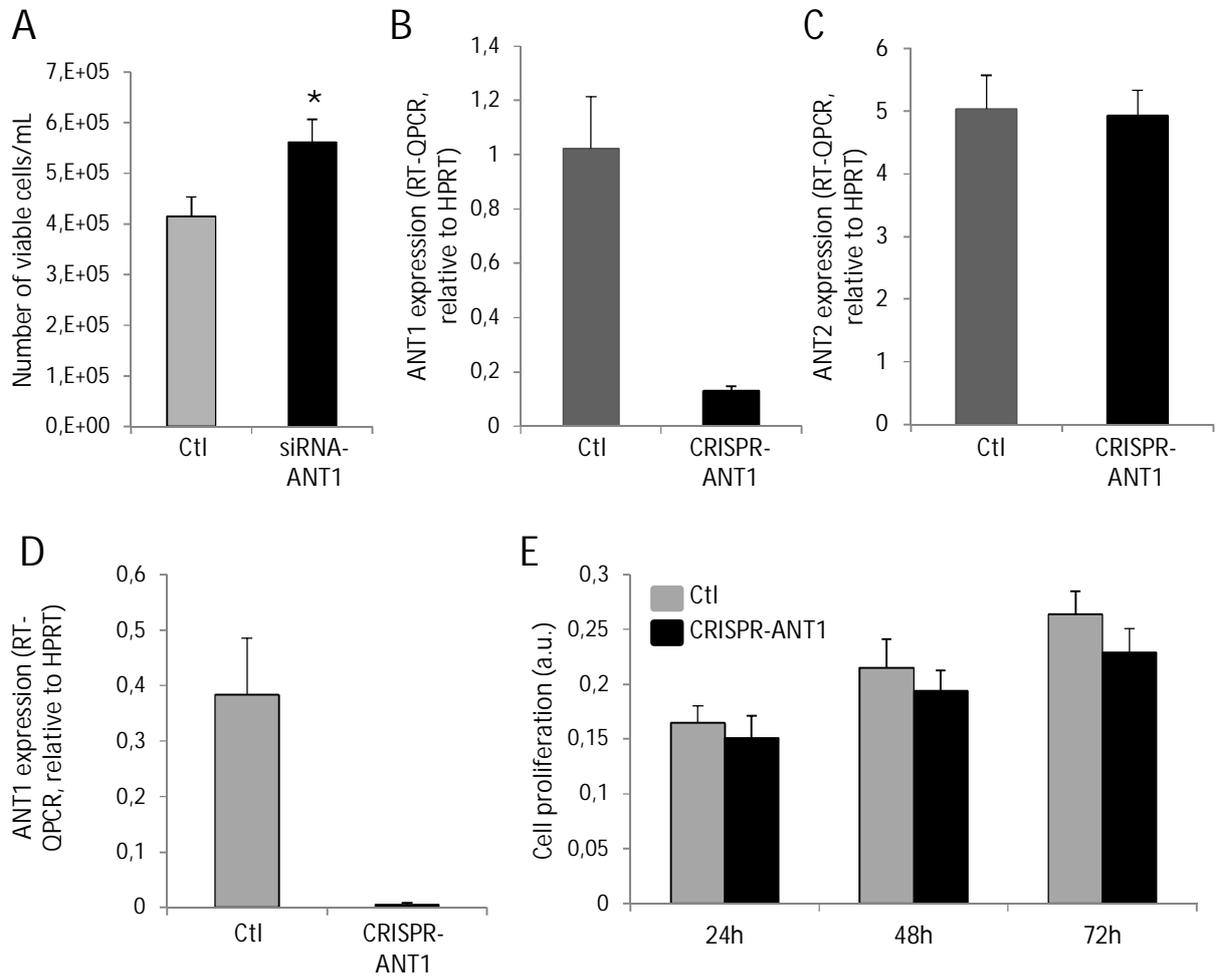
B



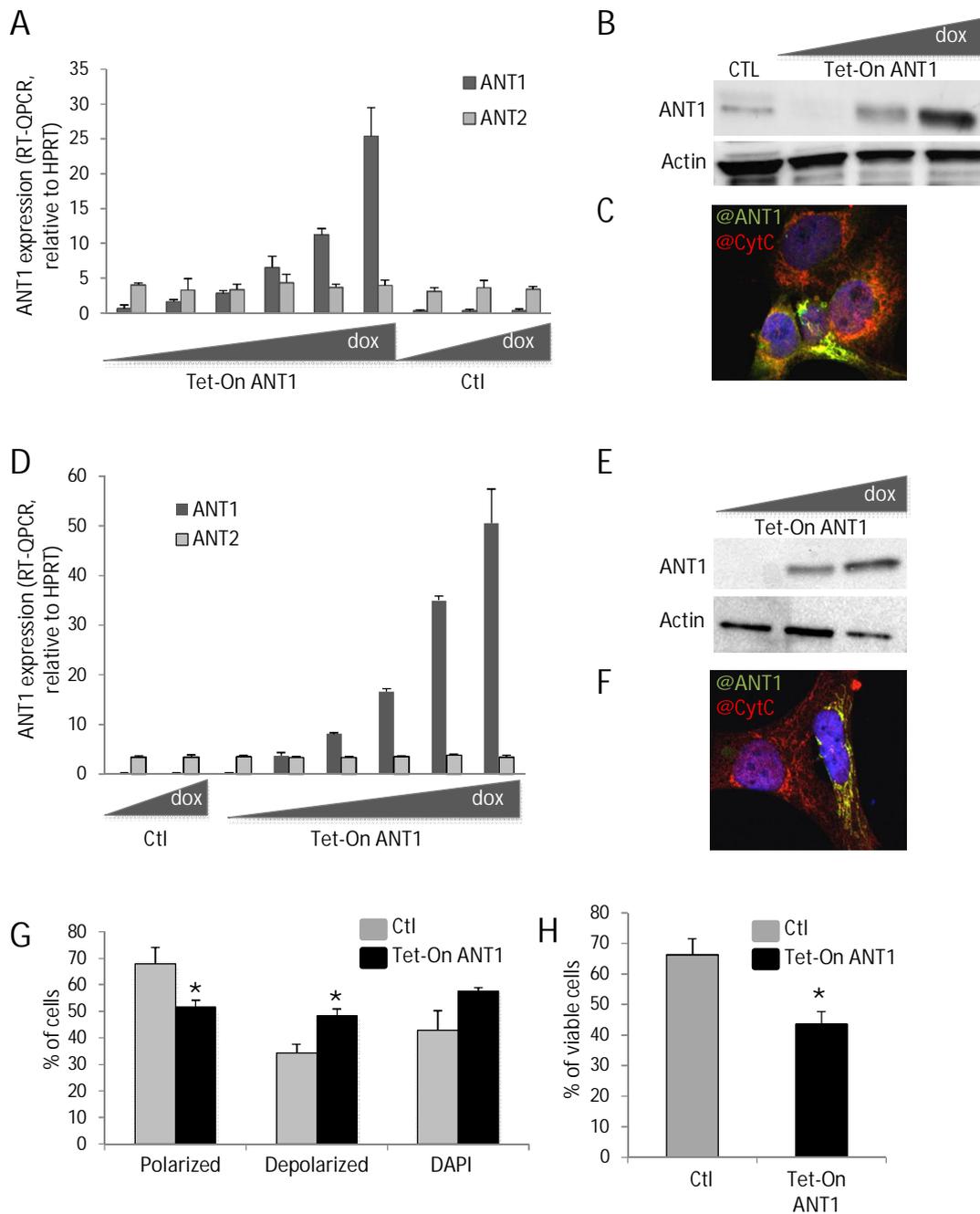
C



Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



Chapitre 3: Discussion

I. Etude du rôle d'ANT1 dans la tumorigenèse des RMS : enjeux et perspectives

Notre approche originale de comparaison entre deux pathologies du lignage musculaire a priori antagonistes (RMS et dystrophies musculaires), nous a permis d'identifier le gène SLC25A4 comme un possible acteur dans la survenue de RMS.

1. Altérations de l'expression d'ANT1 dans les RMS : limites et enjeux
 - a. Utilisation du muscle squelettique comme référence non tumorale : est-ce le plus pertinent des modèles?

Les analyses transcriptomiques, conduites à partir de bases de données déjà existantes (GSE28511 et E-TABM-1202) ou via l'analyse par Q-RT PCR d'une cohorte de RMS au laboratoire, nous ont permis de conclure à l'expression plus faible du gène SLC25A4 dans ce cancer par rapport à des échantillons de tissu musculaire sain ou dystrophique.

L'utilisation de muscle comme référence non tumorale peut être sujette à caution. En effet, les muscles squelettiques non-tumoraux sont majoritairement constitués de cellules déjà différenciées : l'expression plus faible d'ANT1 dans les RMS peut résulter d'un simple différentiel dans le profil de différenciation des cellules contenues dans ce tissu. En ce sens, il est important de noter que les myoblastes (précurseurs des myotubes) ont une expression d'ANT1 plus faible que les myotubes (résultant de la fusion des myoblastes) : plus qu'une perte d'ANT1, les RMS pourraient correspondre au maintien d'un statut embryonnaire. Pour tenter de contourner ce biais, nous avons inclus des muscles fœtaux dans notre étude de Q-RT-PCR, puisqu'il avait été proposé que les muscles fœtaux soient l'équivalent non-tumoral le plus proche des RMS [155]. Nous avons similairement observé que le niveau d'expression de SLC25A4 est significativement réduit dans les tumeurs par rapport à ces tissus. Ceci suggère qu'indépendamment du stade de différenciation, le niveau d'expression de SLC25A4 soit réduit dans les tumeurs. Il conviendrait cependant d'étudier le profil d'expression de ce gène au cours de la transformation tumorale, en comparant par exemple son niveau d'expression dans des myoblastes, avant et après expression de l'oncogène H-ras par exemple, mais également sur des populations de cellules musculaires à différents stades de différenciation (myoblastes versus myotubes versus myofibres)

b. D'une diminution d'expression à l'échelle de l'ARN à un différentiel d'expression au niveau protéique : peut-on extrapoler ?

Nous avons établi par analyses bioinformatiques et confirmé par Q-RT-PCR que l'expression de SLC25A4 était diminuée à l'échelle de l'ARNm dans les RMS. Malheureusement, nous n'avons pas pu conclure sur l'existence de variations au niveau protéique en raison du manque de spécificité des anticorps ciblant ANT1. En effet, aucun anticorps ne permet actuellement de distinguer l'isoforme ANT1 de l'isoforme ANT2, qui est de plus largement majoritaire dans les échantillons tumoraux. ANT2 partage une très grande homologie avec ANT1 (plus de 90% d'identité au niveau peptidique), et les domaines reconnus par les anticorps commerciaux correspondent à des régions identiques entre ces deux transporteurs. En raison de cette limite technique, nous n'avons pas pu évaluer l'expression protéique d'ANT1 par immunohistochimie sur des coupes de RMS. Le développement d'un nouvel anticorps spécifique de l'isoforme 1 à partir de données cristallographiques et des alignements de séquences entre ANT1 et ANT2 serait crucial pour compléter l'étude transcriptomique par une étude de l'expression protéique. De plus, cet outil permettrait d'évaluer le profil d'expression d'ANT1 en fonction de l'hétérogénéité tumorale, afin de définir s'il peut exister un différentiel d'expression en fonction du clone considéré.

c. Altérations quantitatives du profil d'expression de la protéine ANT1 : existe-t-il des anomalies qualitatives?

Il n'a pas été référencé à ce jour de mutation du gène SLC25A4 dans les RMS [156]. Des mutations de SLC25A4 jouent par contre un rôle causal dans la survenue d'un syndrome génétique, l'ophtalmoplégie externe progressive. Cette maladie se caractérise par une paralysie progressant lentement jusqu'à ce que toute motilité oculaire soit perdue. Des fibres rouges-déguenillées et une atrophie musculaire sont observés sur les biopsie de muscles, et sont à rapprocher d'anomalies du fonctionnement mitochondrial caractérisées par une diminution de la fonction d'échange ADP-ATP [157]. En plus des anomalies quantitatives décrites ci-dessus, des mutations impactant la fonction d'échange ADP-ATP d'ANT1 pourrait donc similairement être identifiées dans les tumeurs de RMS. Des analyses transcriptomique et par whole exome sequencing sont en cours au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon sur plus de 400 cas de RMS, adultes et enfants, et les résultats de cette étude nous permettront d'étudier cette question.

d. Perte d'ANT1 : un mécanisme impliqué dans d'autres sarcomes ?

La perte d'expression de SLC25A4, supposée conférer un avantage sélectif aux cellules tumorales de RMS, pourrait également être impliquée dans d'autres cancers et notamment dans d'autres sarcomes. La base de données ATG Sarc [158] permet l'analyse d'expression de différents gènes dans plusieurs types de sarcomes. Nous avons étudié l'implication éventuelle de SLC25A4 dans les sarcomes à génomique complexe (**Figure 25**), les GIST (**Figure 26**) et dans les liposarcomes myxoïdes (**Figure 27**), en corrélant le niveau d'expression de ce gène au niveau de la survie des patients et à l'existence de métastases.

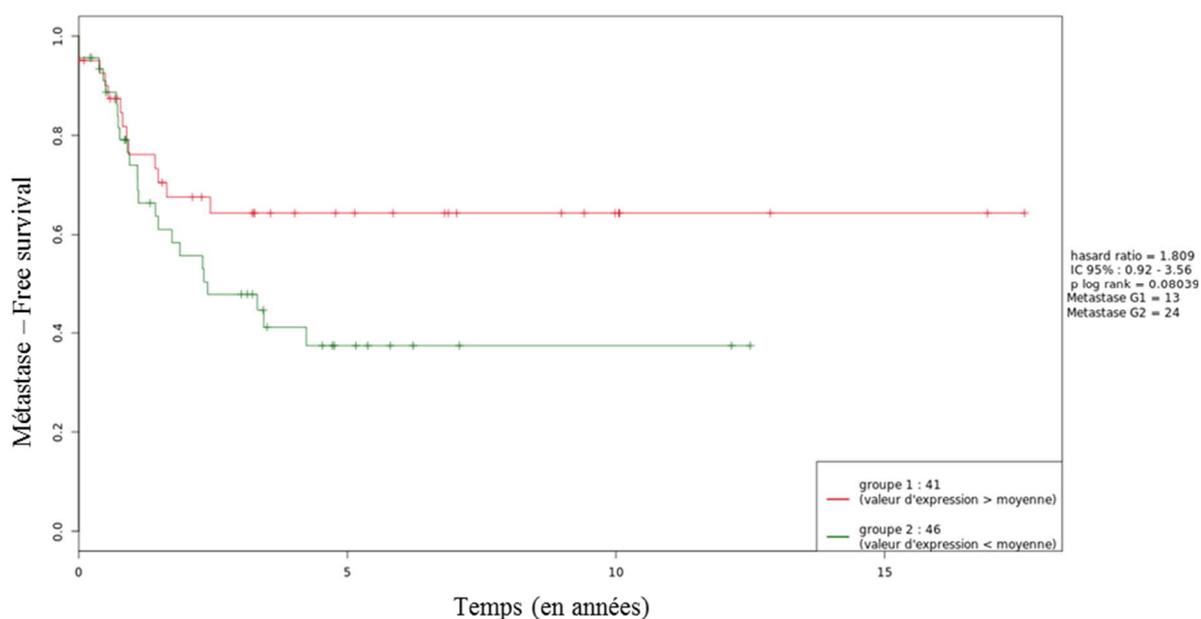


Figure 25: Valeurs du niveau d'expression de SLC25A4 sur la survie sans métastase des patients atteints de sarcomes à génomiques complexes.

Une valeur d'expression de SLC25A4 supérieure à la moyenne semble être de bon pronostic au regard de la survie sans métastase pour les sarcomes à génomiques complexes. L'apparition de métastases est moins fréquente quand l'expression du gène SLC25A4 est supérieure à la moyenne (13/41 contre 24/46).

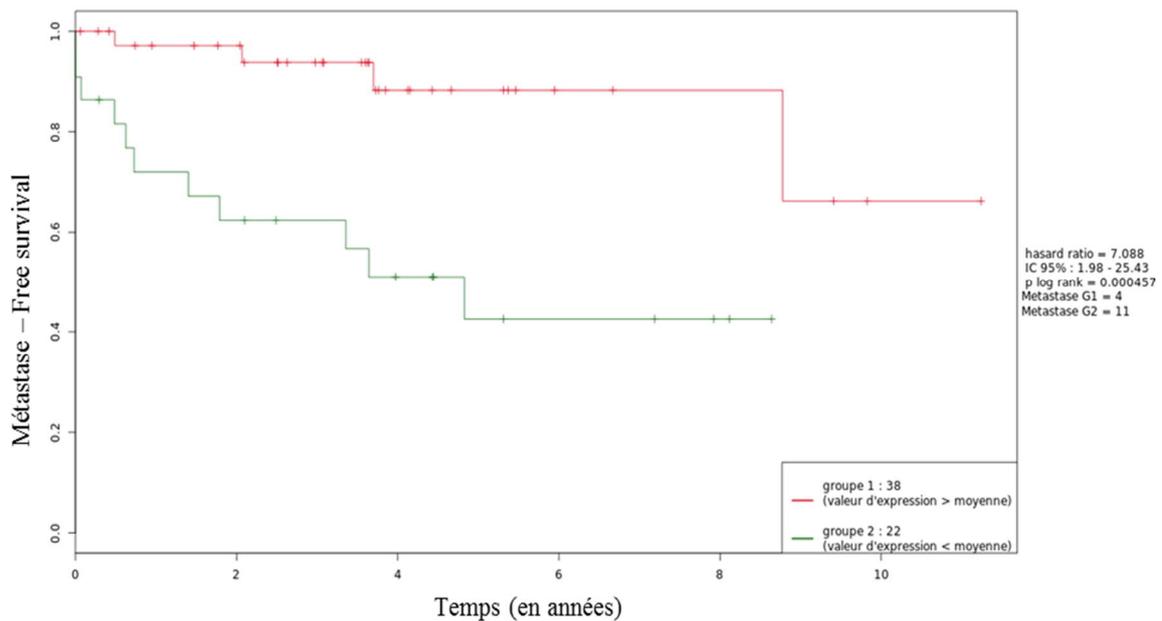


Figure 26: Valeurs du niveau d'expression de SLC25A4 sur la survie sans métastase des patients atteints de GIST.

Une valeur d'expression de SLC25A4 supérieure à la moyenne semble être de bon pronostic au regard de la survie sans métastase pour les GIST. L'apparition de métastase est elle aussi moins fréquente quand l'expression du gène SLC25A4 est supérieure à la moyenne (4/38 contre 11/22).

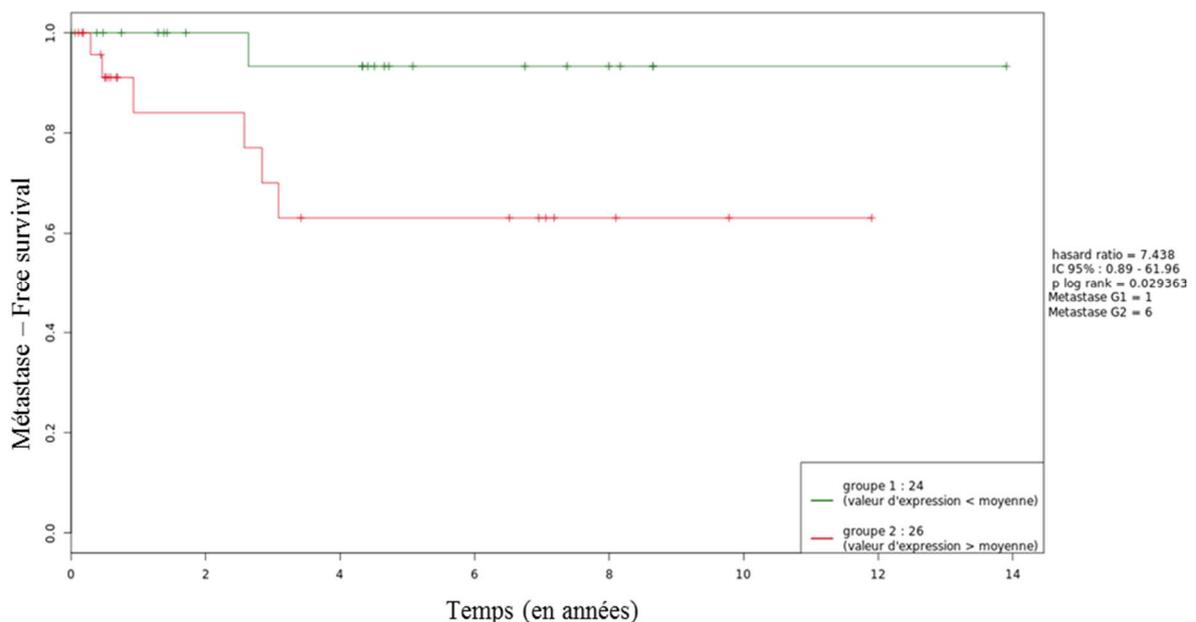


Figure 27: Valeurs du niveau d'expression de SLC25A4 sur la survie sans métastase des patients atteints de liposarcomes myxoides.

Une valeur d'expression de SLC25A4 supérieure à la moyenne semble être de mauvais pronostic au regard de la survie sans métastase pour les liposarcomes myxoides. L'apparition de métastase est elle aussi plus fréquente quand l'expression du gène SLC25A4 est supérieure à la moyenne (1/24 contre 6/26).

L'expression de SLC25A4 est corrélée à un mauvais pronostic dans les liposarcomes myxoïdes alors qu'elle est plutôt de bon pronostic dans les sarcomes à génomique complexe et dans les GIST. Ces données montrent la complexité du système ANT1. En raison de sa dualité de fonction (métabolique et apoptotique), son rôle sur la tumorigénèse peut être diamétralement opposé. Dans le cas des sarcomes à génomiques complexes et des GIST, un niveau élevé d'expression d'ANT1 pourrait constituer un désavantage pour l'échappement tumoral en favorisant l'ouverture du mPTP en conditions de stress ou en réponse aux traitements. Au contraire, dans le cas des liposarcomes myxoïdes, l'effet pourrait être inverse : les tumeurs présentant un haut niveau d'expression d'ANT1 pourraient être plus agressives via la modulation du métabolisme cellulaire. Il pourrait être intéressant de comparer le profil d'expression d'ANT1 entre différents types tumoraux, afin de savoir s'il existe une gamme de valeurs optimales d'expression d'ANT1 associées à l'échappement tumoral, indépendante du type considéré.

2. ANT1 : un acteur de la tumorigénèse dans les RMS

a. Modèles d'étude et limites

Afin de définir l'impact du niveau d'expression d'ANT1 sur les propriétés tumorales des RMS, deux types de construction cellulaire ont été établis à partir de deux lignées de RMS (CCL-136 et ACC-489) :

- Une construction utilisant la technologie Crispr/Cas9 inductible à la DOX permettant la diminution de l'expression d'ANT1 à un temps précis. Cette stratégie inductible a été choisie de manière à contourner l'éventuel effet délétère associé à la diminution trop importante de l'expression de ce gène.
- Une construction utilisant la technologie Tet-On inductible à la DOX, permettant de surexprimer ANT1 de manière contrôlée également et pour les mêmes raisons.

Pour l'ensemble des tests cellulaires réalisés, nous avons choisi de réexprimer ANT1 à un niveau insuffisant pour déclencher la mort des cellules dans des conditions de culture normales de manière à ne pas perméabiliser artificiellement la membrane mitochondriale, et à restaurer une expression « physiologique » de ce transporteur, même si ce niveau est difficile à évaluer.

La stratégie d'inactivation d'ANT1 par CRISPR-Cas9 dans des lignées tumorales est discutable, car elle conduit à réduire le niveau d'expression d'ANT1 dans des cellules ayant déjà a priori sélectionné cet avantage. Cette construction aurait pu être réalisée sur des myoblastes immortalisés. Un modèle cellulaire de ce type nous avait été fourni par l'équipe du Dr R.Mounier, mais ce modèle ayant déjà été sélectionné à de nombreuses reprises au

cours du processus d'immortalisation, la mise en place de la stratégie CRISPR-Cas9 s'est avérée impossible.

Malgré leurs limites, les modèles établis permettent d'étudier l'impact de la modulation de l'expression d'ANT1 sur des caractéristiques des cellules tumorales permettant ainsi de conclure sur le possible rôle d'ANT1 dans les RMS.

b. ANT1 et résistance à la mort cellulaire

Nous avons montré que le niveau d'expression d'ANT1 modulait la résistance des cellules tumorales à certains stress et également à des traitements de chimiothérapies.

ANT1 pourrait donc jouer un rôle dans la résistance à la mort cellulaire. Plusieurs questions mériteraient d'être posées, afin de définir si le niveau d'expression d'ANT1 module uniquement la réponse à certains stress (chimiothérapie, stress oxydatif...) comme évalué dans le cadre de ma thèse, ou régule plus généralement le niveau de sensibilité à d'autres stimuli (hypoxie, carence en facteurs de croissance, dommages à l'ADN...).

De plus, mes travaux n'ont que partiellement permis de répondre à la question du mécanisme par lequel ANT1 participe à la transduction des signaux de mort. Deux possibilités existent notamment et ne sont pas mutuellement exclusives:

- ANT1, de part sa capacité à réguler la perméabilité mitochondriale pourrait réguler l'induction de l'apoptose. Il a été démontré qu'ANT1 régule l'ouverture du mPTP, l'ouverture de ce pore conduisant au relargage de molécules pro-apoptotiques, et notamment du cytochrome c. Le cytochrome c une fois libéré va se lier à APAF-1 et la Caspase 9 pour former l'apoptosome et ainsi déclencher l'apoptose. Cette mort cellulaire peut être bloquée par un inhibiteur des caspases comme le Z-vad. Nous avons obtenu des résultats préliminaires sur les cellules CCL-136 suggérant que ce composé chimique puisse bloquer l'induction de l'apoptose par ANT1, suggérant de fait que la capacité d'ANT1 à induire la mort cellulaires se fasse par activation de l'apoptose.
- Les cellules cancéreuses sont caractérisées par un stress oxydatif chronique élevé. Elles produisent de forte quantité de ROS ceci permettant, entre autres, d'accroître leur capacité proliférative. Ce niveau de ROS est contrebalancé par l'activation des systèmes de détoxification. Le rapport entre les thiols réduits et les thiols oxydés est un marqueur du statut REDOX de la cellule, c'est à dire de la balance entre ces deux systèmes. Si le rapport est en faveur des formes réduites notamment par exemple pour le glutathion, cela signifie que la cellule détoxifie efficacement les ROS qu'elle produit, malgré son caractère tumoral. Si au contraire le rapport est en faveur des formes oxydées, cela signifie que les ROS générés sont capable d'oxydés les thiols réduits et que le système de détoxification est saturé (**Figure 28**).

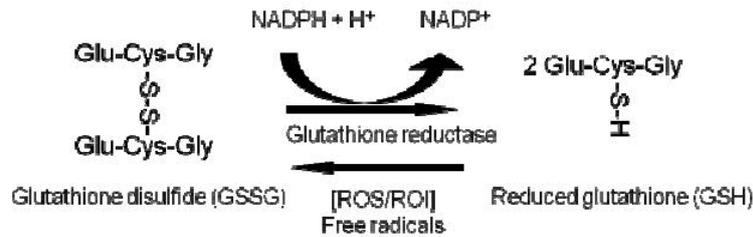


Figure 28: Cycle rédox du glutathion.

La glutathione réductase réduit le GSSG en GSH. Quand la cellule rencontre des radicaux libres, l'antioxydant GSH réduit les radicaux libres, devenant ainsi eux-mêmes oxydés en GSSG.

Nous avons observé que la baisse du niveau d'ANT1 était associée à la prédominance de thiols sous forme réduite (GSH), malgré l'augmentation de la consommation d'oxygène mesurée au Seahorse. Le système de détoxification des ROS pourrait donc être boosté dans ces cellules, ce qui pourrait expliquer en partie la plus grande résistance observée à l' H_2O_2 . Au contraire dans le cas d'une surexpression d'ANT1, le statut REDOX de la cellule est « switché » vers thiols oxydés, indiquant que le système de détoxification est dépassé. Or, certaines voies de mort cellulaire alternatives décrites récemment pourraient résulter de dommages produits par les ROS en excès. C'est notamment le cas de la ferroptose : la surproduction de ROS peut conduire à la peroxydation massive des lipides désorganisant les membranes lipidiques et conduisant à la mort cellulaire par cette voie. Les mécanismes de la ferroptose sont encore mal connus mais il est établi qu'elle est dépendante du fer et serait induite lorsque le système de détoxification contrôlé par la Glutathione peroxydase 4 (GPx4) n'est plus suffisamment efficace. Conformément à cette hypothèse, nous avons obtenu des résultats préliminaires pour la lignée ACC-489, qui présente une expression faible de GPx4 : la mort induite par surexpression de ANT1 en présence d' H_2O_2 est bloquée par l'inhibiteur spécifique de la ferroptose, la ferrostatine-1 (Figure 29).

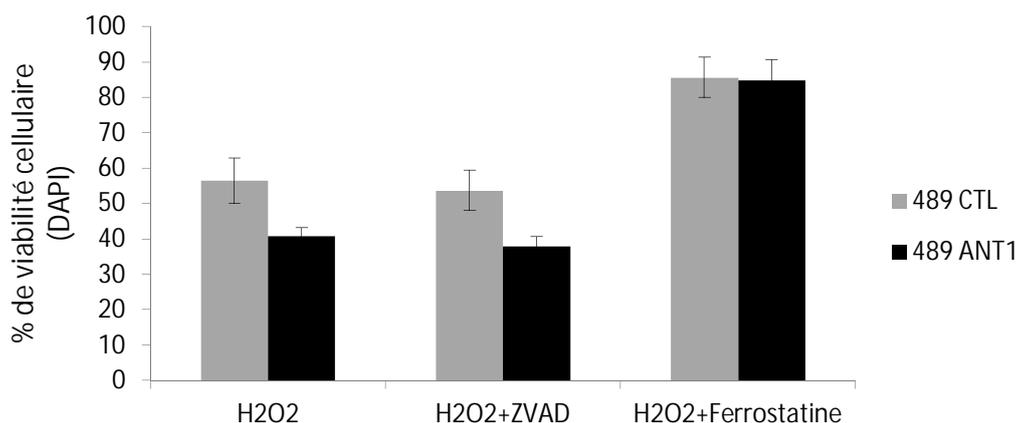


Figure 29: La mort cellulaire induite par surexpression d'ANT1 est bloquée par la ferrostatine-1

La mort cellulaire induite par surexpression d'ANT1 est bloquée par l'inhibiteur de ferroptose, la ferrostatine-1, mais pas par blocage de l'apoptose par le ZVAD. Les résultats sont les moyennes +/- écarts-type, n=3.

D'autres expériences sont actuellement en cours de réalisation pour valider cette hypothèse, notamment à l'aide d'un marqueur fluorescent spécifique de la peroxydation des lipides : le Bodipy 581/591 C11. Ce marqueur émet un signal fluorescent spécifique rouge en absence de peroxydation des lipides, mais la longueur d'onde «shifte» vers une fluorescence verte en cas de peroxydation. Ces expériences nous permettront de définir la voie de mort induite par ANT1 dans les différents types cellulaires, et nous corrélons ce résultat au niveau d'expression de GPx4, qui pourrait être un élément clé sur le plan mécanistique.

c. ANT1 et modulation du métabolisme cellulaire

Les cellules cancéreuses possèdent un métabolisme particulier. Historiquement, le postulat de base était que la cellule cancéreuse présentait une glycolyse exacerbée au détriment de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Cependant, contrairement à ce qui fut initialement proposé notamment par Warburg, la mitochondrie n'est pas défaillante dans les cellules tumorales et peut participer activement à la tumorigenèse, ce qui permet à la cellule d'avoir une plasticité métabolique [159]. En effet, une tumeur ne serait pas de type glycolytique ou OXPHOS, mais plutôt glycolytique et OXPHOS, lui permettant de s'adapter à différents stress, différentes conditions de culture et ainsi de choisir la voie métabolique la plus adaptée en fonction des conditions environnantes pour soutenir sa prolifération.

Les modifications métaboliques observées lors de la modulation de l'expression d'ANT1 sont complexes. La lignée CCL-136 possède un métabolisme basal plus orienté vers la glycolyse que la lignée ACC-489. Dans les 2 lignées, la diminution du niveau d'expression de ANT1 se traduit par une augmentation de la respiration mitochondriale, ce qui est plutôt contre-intuitif vu sous l'angle de l'effet Warburg d'une part et compte-tenu de l'impact positif observé sur la prolifération d'autre part. Ces résultats ont été obtenus *in-vitro* en culture 2D en milieu riche en oxygène, ils ne sont donc peut-être pas complètement représentatifs conditions existantes *in vivo* dans les tumeurs. Ils sont néanmoins en train d'être recoupés et intégrés aux données obtenues par l'approche métabolomique. L'impact de la modulation de l'expression d'ANT1 sur l'utilisation des voies de glutaminolyse et des acides gras devra notamment être évalué.

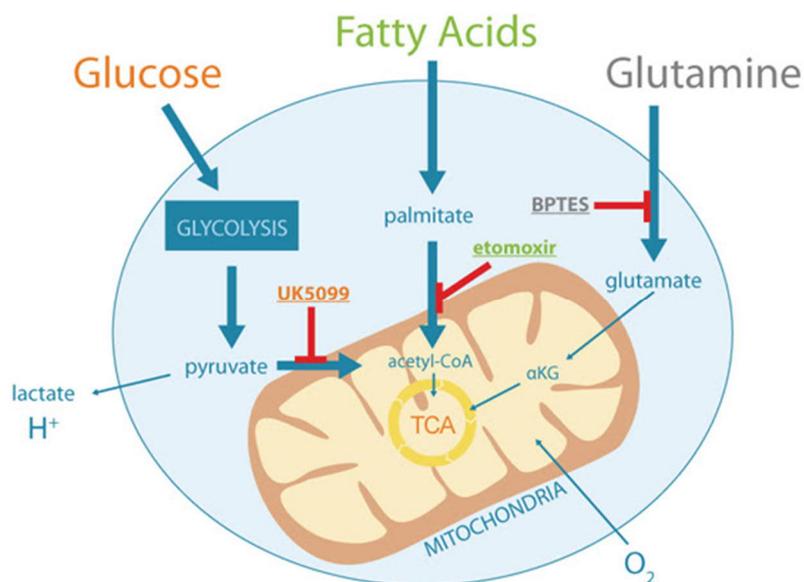


Figure 30: Voies métaboliques alternatives potentiellement utilisées par les cellules tumorales pour produire de l'ATP lors de la modulation de l'expression d'ANT1.

3. ANT1 : un candidat pour une thérapie génique anticancéreuse ?

La thérapie génique a été initialement conçue comme une approche thérapeutique destinée aux maladies monogéniques (liée à la dysfonction d'un seul gène), délivrant aux cellules un gène "sain" capable de suppléer le gène déficient.

En cancérologie, cette approche est étudiée mais de manière moins importante qu'en génétique humaine. Elle a cependant connu un renouveau récent, avec l'avènement des CAR-T cells : des lymphocytes T de patients atteints de leucémies B sont prélevés chez un patient et génétiquement modifiés pour les armer d'un récepteur chimérique (CAR). Ce récepteur reconnaît l'antigène CD19 présents sur les cellules malignes, ce qui permet de les éliminer une fois que les CAR-T sont réinjectés au patient. On peut aussi citer l'exemple du GendicineTM qui est le premier médicament qui a été mis sur le marché, en Chine, en 2003. Il s'agit d'un adénovirus exprimant le gène p53, qui est indiqué dans le traitement de cancers de la tête et du cou [160].

Cette technologie pourrait être utilisée plus largement en cancérologie pédiatrique. L'idée serait d'induire l'expression d'un gène de manière spécifique dans les cellules tumorales ou perturbant spécifiquement le fonctionnement de ces dernières. Il y a donc deux paramètres à prendre en compte : comment cibler spécifiquement les cellules tumorales à l'aide de vecteurs adaptés et/ou comment perturber spécifiquement le fonctionnement des cellules tumorales sans impacter celui des cellules saines.

La première difficulté associée au développement de la thérapie génique est la pénétration des gènes modifiés dans les cellules tumorales du patient. Le vecteur viral est le plus utilisé en raison des propriétés du virus à rentrer facilement dans les cellules, et 75% des essais cliniques de thérapie génique utilisent des vecteurs viraux.

Les débuts de la thérapie génique ont été marqués par quelques accidents liés à l'utilisation de vecteurs viraux. Ceux-ci ont entraîné des réactions inflammatoires incontrôlables ou provoqué des cancers liés à l'intégration du gène thérapeutique à proximité d'oncogènes. De nouvelles générations de vecteurs ont été mises au point, et les vecteurs adéno-associés et lentiviraux ont été remplacés les premiers vecteurs adénoviraux et gamma-rétroviraux.

Il existe deux sortes de vecteurs viraux :

- Les vecteurs viraux intégratifs : ils insèrent leur ADN (qui contient le gène thérapeutique) dans le génome de l'hôte. En conséquence, le gène thérapeutique est transmis aux cellules filles en cas de divisions cellulaires. C'est le cas des vecteurs lentiviraux, dérivés de virus humains comme le VIH mais rendus inoffensifs.
- Les vecteurs viraux non intégratifs : le gène thérapeutique demeure dans la cellule sans s'intégrer au génome de l'hôte. Quand il s'agit de faire pénétrer un transgène dans des cellules qui ne se divisent plus (cellules post-mitotiques), les vecteurs non intégratifs sont privilégiés car ils sont considérés comme plus sûrs *in vivo*. Avec ces vecteurs, le gène thérapeutique reste dans la cellule de l'hôte, mais sans s'insérer dans son génome. Il s'exprime pendant la durée de vie de la cellule et disparaît avec la mort de celle-ci.

Dans tous les cas, les vecteurs utilisés font l'objet d'une ingénierie importante pour annuler leur potentiel toxique et leur capacité de réplication, pour les diriger plus spécifiquement et, lorsque cela est nécessaire, pour les rendre les plus silencieux possibles vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte afin de permettre une correction thérapeutique à long terme [161].

Des virus destinés à la thérapie génique avec un tropisme pour les cellules musculaires ont été développés notamment par le Généthon. Leur utilisation pourrait donc être possible dans les RMS. Pour tester cette hypothèse, nous établissons actuellement une collaboration avec l'équipe du Dr Ana Buj-Bello au Généthon. L'idée est de réaliser dans un premier temps des xéno greffes en sous cutanée de cellules de RMS, puis en orthotopique, et de définir la spécificité des adénovirus à tropisme musculaire pour les cellules tumorales de RMS, à l'aide d'un système rapporteur GFP. En fonction des résultats de cette étude princeps, nous évaluerons l'efficacité anti-tumorale et la spécificité de ciblage d'un système basé sur la réexpression d'ANT1 dans les cellules tumorales, sous le contrôle du promoteur d'ANT2, activé dans les tumeurs.

II. Cartographie des voies de mort cellulaire : intérêts et perspectives

Le début de ma thèse a été dédié à l'initiation d'une cartographie des points de blocage des voies de mort cellulaire dans le RMS. Cette étude est en cours de finalisation en lien avec le service de biostatistiques du Pr Maucort-Boulch. Il est important de noter que la taille limitée

des cohortes associée à l'hétérogénéité et la diversité des patients compliquent l'interprétation statistique des données.

Deux stratégies sont en cours pour contourner cette difficulté :

- agréger des jeux de données différents, à condition d'avoir un accès aux données brutes pour pouvoir homogénéiser la normalisation de ces données.
- utiliser des études indépendantes pour valider les conclusions entre études. Pour prendre un exemple précis, les résultats obtenus à partir de l'étude E-TABM-1202 seront recoupés et validés avec l'étude récente de l'équipe de Skapek sur les RMS [162].

Cette approche basée sur l'analyse descriptive du niveau d'expression des gènes impliqués dans le contrôle de l'équilibre vie/mort est complétée par l'analyse fonctionnelle des voies de mort cellulaire, grâce à l'approche crible siARN. L'enjeu est de regrouper les patients atteints de RMS en entités homogènes présentant une signature et une fonctionnalité identique des voies de mort/cellulaire, afin d'orienter la prise en charge thérapeutique des patients atteints de RMS. En effet, des drogues ciblant spécifiquement certains points de blocage de la mort cellulaire comme notamment les «Smac-mimetics» capable d'inhiber la résistance induite par les IAPs [163], ou les inhibiteurs de Bcl-2 [164] capables d'inhiber l'expression de ces protéines anti-apoptotiques, ont été développés. La cartographie des voies de mort cellulaire pourrait permettre de définir des groupes de patients éligibles à l'une ou l'autre thérapie.

Au-delà des voies de mort per se, l'idée est aussi de définir les groupes de patients présentant une activation anormale de voies de survie, comme la voie PI3K/AKT/mTOR, qui a été identifiée dans le cadre de nos analyses.

Enfin, au-delà d'ANT1, cette approche pourrait nous permettre de définir d'autres gènes potentiellement impliqués dans la tumorigenèse dans les RMS, et en particulier des gènes impliqués dans la myogenèse et/ou la survenue de dystrophies musculaires. La voie des Sestrines pourrait par exemple être étudiée. Les Sestrines (SESN) sont une famille de protéines dont trois membres sont présents chez les mammifères (SESN 1, 2, 3) [165]. Elles exercent notamment des fonctions de protection antioxydante et de contrôle du métabolisme via l'inhibition de la voie mTOR. L'expression des SESN1 et 2 est induite par la protéine antitumorale p53 [166]. La SESN2, qui est aussi régulée en condition d'hypoxie par le facteur de transcription HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), permettrait de protéger de nombreux organes contre diverses agressions liées au stress oxydant et au vieillissement [167]. Leurs altérations dans les RMS pourraient avoir un effet oncogénique double, le premier en permettant aux cellules tumorales de supporter l'augmentation des ROS, le deuxième en inhibant la voie mTOR qui pourrait jouer un rôle dans l'induction dans la mort cellulaire en inhibant la stabilité du complexe AKT [168].

CONCLUSION :

En conclusion, mon projet de thèse a ouvert la voie à l'établissement d'une cartographie de l'état de fonctionnalité des voies mort cellulaire, qui pourrait s'avérer bénéfique pour les patients si elle permet d'orienter leur prise en charge thérapeutique. Cette étude sera finalisée au cours des prochains mois. Elle a d'ores et déjà permis d'identifier ANT1 comme étant impliqué dans le maintien et l'agressivité des cellules tumorales de RMS, ouvrant la voie à des perspectives thérapeutiques par ciblage chimique de ce transporteur voire potentiellement par thérapie génique.

ANNEXE

Annexe 1: Liste des gènes inclus dans les analyses transcriptomiques réalisées en collaboration avec LBBE Biométrie et Biologie Evolutive Laboratoire de Biostatistique Santé des Hospices Civils de Lyon

A

ABL1, ACHE, ADAMTSL1, ADAMTSL2, ADAMTSL3, ADAMTSL4, AGER, AIFM1, AIFM2, AK2, AKT1, ALDH7A1, ANXA1, APAF1, ARC, ATF6, AVEN

B

BAD, BAG1, BAG3, BAG4, BAI1, BAIAP3, BAK1, BAX, BBC3, , BCL10, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L10, BCL2L11, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L14, BCL2L2, BCLAF1, BFAR, BID, BIK, BIRC2, BIRC3, BIRC5, BIRC6, BIRC7, BLK, BMF, BNIP1, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BOK, BRAF, BTF3P11

C

C1D, CALR, CAPNS1, CARD6, CARD8, CASP1, CASP10, CASP12, CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CCAR1, CD151, CD27, CD40, CD40LG, CD70, CDKN2A, CFLAR, CIAPIN1, CIDEA, CIDEB, CKMT1A /// CKMT1B, COL6A1, COX7C, CRADD, CSE1L, CYCS, CYLD, CYP11B2

D,E,F

DACH1, DAP, DAPK1, DAXX, DEFB4A /// DEFB4B, DFFA, DFFB, DIABLO, DMPK, DNAJA3, DNPEP, EBP, EIF2S1, EIF4EBP1, EMD, ENDOG, FADD, FAP, FAS, FASLG, FASN, FBXO42, FOS, FOXO3

G,H,I

GADD45A, GAS2, GZMB, HAS2, HDAC4, HDLBP, HGD, HK1, HK2, HRK, HSPA1A /// HSPA1B, HTRA2, IAPP, ICAM3, ICAM5, IGF1R, IKBKB, IKBKG, IL1R1, IL1R2, IRAK1, ITGA7, ITGB6

J,K,L

JUN, KDELR3, KHSRP, KLHL41, LAMA2, LAMP1, LARP6, LIPC, LRP1, LTA, LTBR

M,N,O

MADD, MALT1, MAP3K14, MAP3K5, MAPK1, MAPK8, MAT1A, MAT2A, MCL1, MED12, MIR29A /// MIR29B1, MIR29B2 /// MIR29C, MOAP1, MYD88, NAIP, NCOA3, NDN, NKX3-1, NLRP1, NLRP3, NOD1, NOL3, OPA1

P,R

PANX1, PANX3, PARP1, PIDD1, PIK3CA, PIK3CG, PITX1, PITX2, PLAGL1, PLD3, PMAIP1, PPP1R13B, PRKCD, PRKD1, PRPS1, PRSS21, PTRH2, PYCARD, RAB3C, RIPK1, RIPK2, RIPK3, RNF34, RRAD

S

SEMA3C, SERP1, SERP3, SESN1, SESN2, SESN3, SH3GLB1, SLC25A26, SLC25A31, SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5, SMAD6, SMAD7, SMAD9, SMYD1, SNAP23

T

TANK, TFAM, TFF1, TBRG4, TGFB1, TGFB1I1, TGFB2, TGFB1, TGFB1R1, TGFB2R2, TLR3, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF11B, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF25, TNFRSF6B, TNFRSF9, TNFSF10, TNFSF14, TNFSF8, TOLLIP, TP53, TP53BP2, TP73, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4

U,V,W,X

USP8, VDAC1, VDAC2, VDAC3, WSB2, XAF1, XIAP

Bibliographie

- [1] « Les cancers de l'enfant », *Institut Curie*. [En ligne]. Disponible sur: <https://curie.fr/dossier-pedagogique/les-cancers-de-lenfant>. [Consulté le: 26-déc-2018].
- [2] « Article - Bulletin épidémiologique hebdomadaire ». [En ligne]. Disponible sur: http://invs.santepubliquefrance.fr/beh/2013/43-44-45/2013_43-44-45_6.html. [Consulté le: 14-janv-2019].
- [3] E. Tai, L. Beaupin, et A. Bleyer, « Clinical Trial Enrollment Among Adolescents With Cancer: Supplement Overview », *Pediatrics*, vol. 133, n° Supplement 3, p. S85-S90, juin 2014.
- [4] « Données globales d'épidémiologie des cancers - Epidémiologie des cancers ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Donnees-globales>. [Consulté le: 15-févr-2019].
- [5] « The History of Childhood Cancer Research », *St. Baldrick's Foundation*. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.stbaldricks.org/blog/post/the-history-of-childhood-cancer-research>. [Consulté le: 07-janv-2019].
- [6] E. J. Chow *et al.*, « Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort », *The Lancet Oncology*, vol. 17, n° 5, p. 567-576, mai 2016.
- [7] D. K. Shakir et K. I. Rasul, « Chemotherapy Induced Cardiomyopathy: Pathogenesis, Monitoring and Management », *J Clin Med Res*, vol. 1, n° 1, p. 8-12, avr. 2009.
- [8] N. M. Archer *et al.*, « An Increased Risk of Second Malignant Neoplasms After Rhabdomyosarcoma: Population-Based Evidence for a Cancer Predisposition Syndrome? », *Pediatr Blood Cancer*, vol. 63, n° 2, p. 196-201, févr. 2016.
- [9] J. Y. C. Hui, « Epidemiology and Etiology of Sarcomas », *Surg. Clin. North Am.*, vol. 96, n° 5, p. 901-914, oct. 2016.
- [10] Z. Burningham, M. Hashibe, L. Spector, et J. D. Schiffman, « The Epidemiology of Sarcoma », *Clin Sarcoma Res*, vol. 2, p. 14, oct. 2012.
- [11] F. CDM, B. JA, H. PCW, et M. F, *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. .
- [12] « Surveillance, Epidemiology, and End Results Program », *SEER*. [En ligne]. Disponible sur: <https://seer.cancer.gov/index.html>. [Consulté le: 20-déc-2018].
- [13] « Key Statistics for Bone Cancer ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.cancer.org/cancer/bone-cancer/about/key-statistics.html>. [Consulté le: 20-déc-2018].
- [14] J. F. Shern *et al.*, « Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors », *Cancer Discov*, vol. 4, n° 2, p. 216-231, févr. 2014.
- [15] S. Kohsaka *et al.*, « A recurrent neomorphic mutation in MYOD1 defines a clinically aggressive subset of embryonal rhabdomyosarcoma associated with PI3K/AKT pathway mutations », *Nat Genet*, vol. 46, n° 6, p. 595-600, juin 2014.
- [16] H. Kaseb et H. M. Babiker, « Cancer, Rhabdomyosarcoma », in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2018.
- [17] R. Dagher et L. Helman, « Rhabdomyosarcoma: An Overview », *The Oncologist*, vol. 4, n° 1, p. 34-44, janv. 1999.

- [18] N. J. Sebire et M. Malone, « Myogenin and MyoD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas », *J Clin Pathol*, vol. 56, n° 6, p. 412-416, juin 2003.
- [19] « Allelotype of pediatric rhabdomyosarcoma | Oncogene ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/1201302>. [Consulté le: 06-déc-2018].
- [20] S. Makawita, M. Ho, A. D. Durbin, P. S. Thorner, D. Malkin, et G. R. Somers, « Expression of insulin-like growth factor pathway proteins in rhabdomyosarcoma: IGF-2 expression is associated with translocation-negative tumors », *Pediatr. Dev. Pathol.*, vol. 12, n° 2, p. 127-135, avr. 2009.
- [21] M. R. Stratton, C. Fisher, B. A. Gusterson, et C. S. Cooper, « Detection of point mutations in N-ras and K-ras genes of human embryonal rhabdomyosarcomas using oligonucleotide probes and the polymerase chain reaction », *Cancer Res.*, vol. 49, n° 22, p. 6324-6327, nov. 1989.
- [22] D. N. Shapiro, J. E. Sublett, B. Li, J. R. Downing, et C. W. Naeve, « Fusion of PAX3 to a Member of the Forkhead Family of Transcription Factors in Human Alveolar Rhabdomyosarcoma », *Cancer Res*, vol. 53, n° 21, p. 5108-5112, nov. 1993.
- [23] K. M. Kelly, R. B. Womer, P. H. Sorensen, Q. B. Xiong, et F. G. Barr, « Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma. », *JCO*, vol. 15, n° 5, p. 1831-1836, mai 1997.
- [24] « Pleomorphic Rhabdomyosarcoma in Adults: A Clinicopathologic Study of 38 Cases with Emphasis on Morphologic Variants and Recent Skeletal Muscle-Specific Markers | Modern Pathology ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/3880357>. [Consulté le: 06-déc-2018].
- [25] R. B. Raney *et al.*, « Rhabdomyosarcoma and Undifferentiated Sarcoma in the First Two Decades of Life: A Selective Review of Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group Experience and Rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V », *Journal of Pediatric Hematology/oncology*, vol. 23, n° 4, p. 215-220, mai 2001.
- [26] A. S. Pappo *et al.*, « Survival after relapse in children and adolescents with rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group », *J. Clin. Oncol.*, vol. 17, n° 11, p. 3487-3493, nov. 1999.
- [27] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « The hallmarks of cancer », *Cell*, vol. 100, n° 1, p. 57-70, janv. 2000.
- [28] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « Hallmarks of cancer: the next generation », *Cell*, vol. 144, n° 5, p. 646-674, mars 2011.
- [29] P. H. Clarke et S. Clarke, « Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena », *Anatomy and Embryology*, vol. 193, n° 2, févr. 1996.
- [30] L. Gomez et F. H. Pike, « THE HISTOLOGICAL CHANGES IN NERVE CELLS DUE TO TOTAL TEMPORARY ANÆMIA OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM », *J Exp Med*, vol. 11, n° 2, p. 257-265, mars 1909.
- [31] J. F. R. Kerr, « History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept », *Toxicology*, vol. 181-182, p. 471-474, déc. 2002.
- [32] J. U. Schweichel et H. J. Merker, « The morphology of various types of cell death in prenatal tissues », *Teratology*, vol. 7, n° 3, p. 253-266, juin 1973.
- [33] G. Kroemer *et al.*, « Classification of cell death », *Cell Death Differ*, vol. 16, n° 1, p. 3-11, janv. 2009.
- [34] L. Galluzzi et G. Kroemer, « Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis », *Cell*, vol. 135, n° 7, p. 1161-1163, déc. 2008.

- [35] R. S. Hotchkiss, A. Strasser, J. E. McDunn, et P. E. Swanson, « Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts », *N Engl J Med*, vol. 361, n° 16, p. 1570-1583, oct. 2009.
- [36] G. Häcker, « The morphology of apoptosis », *Cell Tissue Res.*, vol. 301, n° 1, p. 5-17, juill. 2000.
- [37] M. MacFarlane et A. C. Williams, « Apoptosis and disease: a life or death decision », *EMBO Rep*, vol. 5, n° 7, p. 674-678, juill. 2004.
- [38] G. S. Salvesen, « Caspases and apoptosis », *Essays Biochem.*, vol. 38, p. 9-19, 2002.
- [39] L. E. French et J. Tschopp, « Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors », *Cell Death and Differentiation*, vol. 10, n° 1, p. 117-123, janv. 2003.
- [40] C. Scaffidi *et al.*, « Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways », *EMBO J.*, vol. 17, n° 6, p. 1675-1687, mars 1998.
- [41] « The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy | Nature Reviews Cancer ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/nrc2465#f1>. [Consulté le: 10-janv-2019].
- [42] C. Borner, « The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions », *Mol. Immunol.*, vol. 39, n° 11, p. 615-647, janv. 2003.
- [43] M. O. Hengartner, « The biochemistry of apoptosis », *Nature*, vol. 407, n° 6805, p. 770-776, oct. 2000.
- [44] A. M. Cuervo, « Autophagy: in sickness and in health », *Trends Cell Biol.*, vol. 14, n° 2, p. 70-77, févr. 2004.
- [45] G. Kroemer et B. Levine, « Autophagic cell death: the story of a misnomer », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 9, n° 12, p. 1004-1010, déc. 2008.
- [46] P. Codogno, « L'autophagie : un mécanisme de survie et de mort cellulaire », *Journal de la Société de Biologie*, vol. 199, n° 3, p. 233-241, 2005.
- [47] E. H. Baehrecke, « Autophagic programmed cell death in *Drosophila* », *Cell Death Differ.*, vol. 10, n° 9, p. 940-945, sept. 2003.
- [48] W. Bursch, K. Hochegger, L. Torok, B. Marian, A. Ellinger, et R. S. Hermann, « Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments », *J Cell Sci*, vol. 113, n° 7, p. 1189-1198, avr. 2000.
- [49] Y. Tsujimoto et S. Shimizu, « Another way to die: autophagic programmed cell death », *Cell Death Differ.*, vol. 12 Suppl 2, p. 1528-1534, nov. 2005.
- [50] Y. Liu et B. Levine, « Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy », *Cell Death and Differentiation*, vol. 22, n° 3, p. 367-376, mars 2015.
- [51] D. R. Green et F. Llambi, « Cell Death Signaling », *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 7, n° 12, déc. 2015.
- [52] D.-W. Zhang *et al.*, « RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis », *Science*, vol. 325, n° 5938, p. 332-336, juill. 2009.
- [53] A. Degterev *et al.*, « Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins », *Nat. Chem. Biol.*, vol. 4, n° 5, p. 313-321, mai 2008.
- [54] Z. Su, Z. Yang, Y. Xu, Y. Chen, et Q. Yu, « Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis », *Mol. Cancer*, vol. 14, p. 48, févr. 2015.
- [55] E. Lachaier *et al.*, « La ferroptose, une nouvelle forme de mort cellulaire applicable au traitement médical des cancers », *médecine/sciences*, vol. 30, n° 8-9, p. 779-783, août 2014.
- [56] W. S. Yang et B. R. Stockwell, « Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation », *Trends Cell Biol.*, vol. 26, n° 3, p. 165-176, mars 2016.

- [57] J. A. Montero et J. M. Hurlé, « Sculpturing digit shape by cell death », *Apoptosis*, vol. 15, n° 3, p. 365-375, mars 2010.
- [58] M. Chautan, G. Chazal, F. Cecconi, P. Gruss, et P. Golstein, « Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway », *Current Biology*, vol. 9, n° 17, p. 967-S1, sept. 1999.
- [59] J. T. Opferman, « Apoptosis in the development of the immune system », *Cell Death Differ.*, vol. 15, n° 2, p. 234-242, févr. 2008.
- [60] N. Holler *et al.*, « Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule », *Nat. Immunol.*, vol. 1, n° 6, p. 489-495, déc. 2000.
- [61] S. B. P. Chargé et M. A. Rudnicki, « Cellular and molecular regulation of muscle regeneration », *Physiol. Rev.*, vol. 84, n° 1, p. 209-238, janv. 2004.
- [62] T. M. Mayhew, R. Myklebust, A. Whybrow, et R. Jenkins, « Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine », *Histol. Histopathol.*, vol. 14, n° 1, p. 257-267, 1999.
- [63] C. Penalzo, L. Lin, R. A. Lockshin, et Z. Zakeri, « Cell death in development: shaping the embryo », *Histochem. Cell Biol.*, vol. 126, n° 2, p. 149-158, août 2006.
- [64] N. Mazarakis, A. Edwards, et H. Mehmet, « Apoptosis in neural development and disease », *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, vol. 77, n° 3, p. F165-F170, nov. 1997.
- [65] N. S. Wilcox, J. Rui, M. Hebrok, et K. C. Herold, « Life and death of β cells in Type 1 diabetes: A comprehensive review », *J. Autoimmun.*, vol. 71, p. 51-58, 2016.
- [66] M. Zatz et A. Starling, « Calpains and disease », *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, n° 23, p. 2413-2423, juin 2005.
- [67] M. Sandri *et al.*, « Caspase 3 Expression Correlates With Skeletal Muscle Apoptosis in Duchenne and Facioscapulo Human Muscular Dystrophy. A Potential Target for Pharmacological Treatment? », *J Neuropathol Exp Neurol*, vol. 60, n° 3, p. 302-312, mars 2001.
- [68] R. A. Knight et G. Melino, « Cell death in disease: from 2010 onwards », *Cell Death Dis*, vol. 2, n° 9, p. e202, sept. 2011.
- [69] M. Elgendy, C. Sheridan, G. Brumatti, et S. J. Martin, « Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival », *Mol. Cell*, vol. 42, n° 1, p. 23-35, avr. 2011.
- [70] R. K. Amaravadi *et al.*, « Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma », *J. Clin. Invest.*, vol. 117, n° 2, p. 326-336, févr. 2007.
- [71] X. Li *et al.*, « TLR9-ERK-mTOR signaling is critical for autophagic cell death induced by CpG oligodeoxynucleotide 107 combined with irradiation in glioma cells », *Sci Rep*, vol. 6, p. 27104, 02 2016.
- [72] « Métabolisme des glucides – Cours Pharmacie ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.cours-pharmacie.com/biochimie/metabolisme-des-glucides.html>. [Consulté le: 23-janv-2019].
- [73] P. Mitchell, « Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism », *Nature*, vol. 191, n° 4784, p. 144-148, juill. 1961.
- [74] O. Warburg, « On the origin of cancer cells », *Science*, vol. 123, n° 3191, p. 309-314, févr. 1956.
- [75] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, et C. B. Thompson, « Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation », *Science*, vol. 324, n° 5930, p. 1029-1033, mai 2009.

- [76] S. Weinhouse, « Studies on the Fate of Isotopically Labeled Metabolites in the Oxidative Metabolism of Tumors », *Cancer Res*, vol. 11, n° 8, p. 585-591, août 1951.
- [77] P. M. Herst et M. V. Berridge, « Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1767, n° 2, p. 170-177, févr. 2007.
- [78] J. W. Locasale et L. C. Cantley, « Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth », *Cell Metab*, vol. 14, n° 4, p. 443-451, oct. 2011.
- [79] T. Liu *et al.*, « Glucose transporter 1-mediated glucose uptake is limiting for B-cell acute lymphoblastic leukemia anabolic metabolism and resistance to apoptosis », *Cell Death Dis*, vol. 5, p. e1470, oct. 2014.
- [80] J. Razungles, V. Cavaillès, S. Jalaguier, et C. Teyssier, « L'effet Warburg - De la théorie du cancer aux applications thérapeutiques en cancérologie », *Med Sci (Paris)*, vol. 29, n° 11, p. 1026-1033, nov. 2013.
- [81] S. Mathupala, Y. Ko, et P. Pedersen, « Hexokinase II: Cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria », *Oncogene*, vol. 25, n° 34, p. 4777-4786, août 2006.
- [82] A. Wolf *et al.*, « Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme », *J. Exp. Med.*, vol. 208, n° 2, p. 313-326, févr. 2011.
- [83] J. R. Cantor et D. M. Sabatini, « Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces », *Cancer Discov*, vol. 2, n° 10, p. 881-898, oct. 2012.
- [84] Z. Wang, H. Y. Jeon, F. Rigo, C. F. Bennett, et A. R. Krainer, « Manipulation of PK-M mutually exclusive alternative splicing by antisense oligonucleotides », *Open Biol*, vol. 2, n° 10, p. 120133, oct. 2012.
- [85] S. Y. Lunt *et al.*, « Pyruvate kinase isoform expression alters nucleotide synthesis to impact cell proliferation », *Mol Cell*, vol. 57, n° 1, p. 95-107, janv. 2015.
- [86] « HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517405>. [Consulté le: 23-janv-2019].
- [87] C. V. Dang, A. Le, et P. Gao, « MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities », *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, n° 21, p. 6479-6483, nov. 2009.
- [88] C. J. David, M. Chen, M. Assanah, P. Canoll, et J. L. Manley, « HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer », *Nature*, vol. 463, n° 7279, p. 364-368, janv. 2010.
- [89] « The fundamental role of the p53 pathway in tumor metabolism and its implication in tumor therapy. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22307140?dopt=Abstract>. [Consulté le: 23-janv-2019].
- [90] K. Bensaad *et al.*, « TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis », *Cell*, vol. 126, n° 1, p. 107-120, juill. 2006.
- [91] F. Schwartzenberg-Bar-Yoseph, M. Armoni, et E. Karnieli, « The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression », *Cancer Res.*, vol. 64, n° 7, p. 2627-2633, avr. 2004.
- [92] J. M. Herrmann et J. Riemer, « The intermembrane space of mitochondria », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 13, n° 9, p. 1341-1358, nov. 2010.
- [93] A. Boveris et B. Chance, « The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen », *Biochem. J.*, vol. 134, n° 3, p. 707-716, juill. 1973.

- [94] D. C. Wallace, « Mitochondrial diseases in man and mouse », *Science*, vol. 283, n° 5407, p. 1482-1488, mars 1999.
- [95] T. Finkel et N. J. Holbrook, « Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing », *Nature*, vol. 408, n° 6809, p. 239-247, nov. 2000.
- [96] R. B. Hamanaka et N. S. Chandel, « Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes », *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 35, n° 9, p. 505-513, sept. 2010.
- [97] S. Pervaiz et M.-V. Clément, « A permissive apoptotic environment: function of a decrease in intracellular superoxide anion and cytosolic acidification », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 290, n° 4, p. 1145-1150, févr. 2002.
- [98] M. B. Hampton et S. Orrenius, « Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis », *FEBS Lett.*, vol. 414, n° 3, p. 552-556, sept. 1997.
- [99] M. Crompton, « The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death », *Biochem. J.*, vol. 341 (Pt 2), p. 233-249, juill. 1999.
- [100] G. N. Landis et J. Tower, « Superoxide dismutase evolution and life span regulation », *Mech. Ageing Dev.*, vol. 126, n° 3, p. 365-379, mars 2005.
- [101] A. R. Crofts et J. B. Chappell, « Calcium ion accumulation and volume changes of isolated liver mitochondria. Reversal of calcium ion-induced swelling », *Biochem J.*, vol. 95, n° 2, p. 387-392, mai 1965.
- [102] R. A. Haworth et D. R. Hunter, « The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 195, n° 2, p. 460-467, juill. 1979.
- [103] M. Crompton, A. Costi, et L. Hayat, « Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. », *Biochem J.*, vol. 245, n° 3, p. 915-918, août 1987.
- [104] A. P. Halestrap, S. J. Clarke, et S. A. Javadov, « Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection », *Cardiovasc. Res.*, vol. 61, n° 3, p. 372-385, févr. 2004.
- [105] M. Crompton, H. Ellinger, et A. Costi, « Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. », *Biochem J.*, vol. 255, n° 1, p. 357-360, oct. 1988.
- [106] C. P. Baines *et al.*, « Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death », *Nature*, vol. 434, n° 7033, p. 658-662, mars 2005.
- [107] T. Nakagawa *et al.*, « Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death », *Nature*, vol. 434, n° 7033, p. 652-658, mars 2005.
- [108] I. Szabó et M. Zoratti, « The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore », *FEBS Lett.*, vol. 330, n° 2, p. 201-205, sept. 1993.
- [109] C. P. Baines, R. A. Kaiser, T. Sheiko, W. J. Craigen, et J. D. Molkentin, « Voltage-Dependent Anion Channels are Dispensable for Mitochondrial-Dependent Cell Death », *Nat Cell Biol.*, vol. 9, n° 5, p. 550-555, mai 2007.
- [110] E. Pebay-Peyroula, C. Dahout-Gonzalez, R. Kahn, V. Trézéguet, G. J.-M. Lauquin, et G. Brandolin, « Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside », *Nature*, vol. 426, n° 6962, p. 39-44, nov. 2003.
- [111] C. Gallerne *et al.*, « The fourth isoform of the adenine nucleotide translocator inhibits mitochondrial apoptosis in cancer cells », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 42, n° 5, p. 623-629, mai 2010.

- [112] C. Brenner *et al.*, « Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator », *Oncogene*, vol. 19, n° 3, p. 329-336, janv. 2000.
- [113] M. K. Bauer, A. Schubert, O. Rocks, et S. Grimm, « Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis », *J. Cell Biol.*, vol. 147, n° 7, p. 1493-1502, déc. 1999.
- [114] R. A. Haworth et D. R. M. Hunter, « Control of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by High-Affinity ADP Binding at the ADP/ATP Translocase in Permeabilized Mitochondria », *J Bioenerg Biomembr*, vol. 32, n° 1, p. 91-96, janv. 2000.
- [115] J. E. Kokoszka *et al.*, « The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore », *Nature*, vol. 427, n° 6973, p. 461-465, janv. 2004.
- [116] C. Brenner, K. Subramaniam, C. Pertuiset, et S. Pervaiz, « Adenine nucleotide translocase family: four isoforms for apoptosis modulation in cancer », *Oncogene*, vol. 30, n° 8, p. 883-895, févr. 2011.
- [117] J. Karch *et al.*, « Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice », *Elife*, vol. 2, p. e00772, août 2013.
- [118] « The mitochondrial effects of small organic ligands of BCL-2: sensitization of BCL-2-overexpressing cells to apoptosis by a pyrimidine-2,4,6-trione ... - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16481323>. [Consulté le: 25-janv-2019].
- [119] D. S. Hawkins, A. A. Gupta, et E. R. Rudzinski, « What is new in the biology and treatment of pediatric rhabdomyosarcoma? », *Curr. Opin. Pediatr.*, vol. 26, n° 1, p. 50-56, févr. 2014.
- [120] M. A. Arnold et F. G. Barr, « Molecular diagnostics in the management of rhabdomyosarcoma », *Expert Rev Mol Diagn*, vol. 17, n° 2, p. 189-194, févr. 2017.
- [121] E. Missiaglia *et al.*, « PAX3/FOXO1 fusion gene status is the key prognostic molecular marker in rhabdomyosarcoma and significantly improves current risk stratification », *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, n° 14, p. 1670-1677, mai 2012.
- [122] P. Hingorani *et al.*, « Clinical Application of Prognostic Gene Expression Signature in Fusion Gene-Negative Rhabdomyosarcoma: A Report from the Children's Oncology Group », *Clin Cancer Res*, vol. 21, n° 20, p. 4733-4739, oct. 2015.
- [123] N. P. Agaram, C.-L. Chen, L. Zhang, M. P. LaQuaglia, L. Wexler, et C. R. Antonescu, « Recurrent MYOD1 mutations in pediatric and adult sclerosing and spindle cell rhabdomyosarcomas: evidence for a common pathogenesis », *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 53, n° 9, p. 779-787, sept. 2014.
- [124] M. Lagha *et al.*, « Pax3 regulation of FGF signaling affects the progression of embryonic progenitor cells into the myogenic program », *Genes Dev.*, vol. 22, n° 13, p. 1828-1837, juill. 2008.
- [125] P. Zhao *et al.*, « Fgfr4 is required for effective muscle regeneration in vivo. Delineation of a MyoD-Tead2-Fgfr4 transcriptional pathway », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 1, p. 429-438, janv. 2006.
- [126] E. Davicioni, F. G. Finckenstein, V. Shahbazian, J. D. Buckley, T. J. Triche, et M. J. Anderson, « Identification of a PAX-FKHR gene expression signature that defines molecular classes and determines the prognosis of alveolar rhabdomyosarcomas », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 14, p. 6936-6946, juill. 2006.
- [127] K. Baird *et al.*, « Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology », *Cancer Res.*, vol. 65, n° 20, p. 9226-9235, oct. 2005.

- [128] J. G. Taylor *et al.*, « Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models », *J. Clin. Invest.*, vol. 119, n° 11, p. 3395-3407, nov. 2009.
- [129] L. Pazzaglia *et al.*, « Genetic and molecular alterations in rhabdomyosarcoma: mRNA overexpression of MCL1 and MAP2K4 genes », *Histol. Histopathol.*, vol. 24, n° 1, p. 61-67, 2009.
- [130] D. M. Steinert *et al.*, « Expression of Bax and Bcl-2 in human rhabdomyosarcoma: Correlation with survival in 64 patients », *JCO*, vol. 23, n° 16_suppl, p. 9041-9041, juin 2005.
- [131] P. M. Armistead *et al.*, « Expression of receptor tyrosine kinases and apoptotic molecules in rhabdomyosarcoma: correlation with overall survival in 105 patients », *Cancer*, vol. 110, n° 10, p. 2293-2303, nov. 2007.
- [132] S. Fulda, « Cell Death Pathways as Therapeutic Targets in Rhabdomyosarcoma », *Sarcoma*, 2012. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/sarcoma/2012/326210/>. [Consulté le: 11-janv-2019].
- [133] « Sensitizing osteosarcoma stem cells to doxorubicin-induced apoptosis through retention of doxorubicin and modulation of apoptotic-related proteins. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25818183>. [Consulté le: 08-févr-2019].
- [134] A. Fanzani, E. Monti, R. Donato, et G. Sorci, « Muscular dystrophies share pathogenetic mechanisms with muscle sarcomas », *Trends in Molecular Medicine*, vol. 19, n° 9, p. 546-554, sept. 2013.
- [135] C. De Giovanni, L. Landuzzi, G. Nicoletti, P.-L. Lollini, et P. Nanni, « Molecular and cellular biology of rhabdomyosarcoma », *Future Oncol*, vol. 5, n° 9, p. 1449-1475, nov. 2009.
- [136] « MicroRNAs involved in skeletal muscle development and their roles in rhabdomyosarcoma pathogenesis - Novák - 2013 - Pediatric Blood & Cancer - Wiley Online Library ». [En ligne]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pbc.24664>. [Consulté le: 06-févr-2019].
- [137] S. Kumar, E. Perlman, C. A. Harris, M. Raffeld, et M. Tsokos, « Myogenin is a specific marker for rhabdomyosarcoma: an immunohistochemical study in paraffin-embedded tissues », *Mod. Pathol.*, vol. 13, n° 9, p. 988-993, sept. 2000.
- [138] R. Saab, S. L. Spunt, et S. X. Skapek, « Myogenesis and rhabdomyosarcoma the Jekyll and Hyde of skeletal muscle », *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 94, p. 197-234, 2011.
- [139] S. Hettmer et A. J. Wagers, « Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma », *Nat. Med.*, vol. 16, n° 2, p. 171-173, févr. 2010.
- [140] J. S. Chamberlain, J. Metzger, M. Reyes, D. Townsend, et J. A. Faulkner, « Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma », *FASEB J.*, vol. 21, n° 9, p. 2195-2204, juill. 2007.
- [141] K. Fernandez, Y. Serinagaoglu, S. Hammond, L. T. Martin, et P. T. Martin, « Mice lacking dystrophin or alpha sarcoglycan spontaneously develop embryonal rhabdomyosarcoma with cancer-associated p53 mutations and alternatively spliced or mutant Mdm2 transcripts », *Am. J. Pathol.*, vol. 176, n° 1, p. 416-434, janv. 2010.
- [142] N. Sirvent, M. Trassard, N. Ebran, R. Attias, et F. Pedeutour, « Fusion of EWSR1 with the DUX4 facioscapulohumeral muscular dystrophy region resulting from t(4;22)(q35;q12) in a case of embryonal rhabdomyosarcoma », *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 195, n° 1, p. 12-18, nov. 2009.

- [143] V. Kowaljow *et al.*, « The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 17, n° 8, p. 611-623, août 2007.
- [144] A. E. H. Emery, « The muscular dystrophies », *Lancet*, vol. 359, n° 9307, p. 687-695, févr. 2002.
- [145] J. B. Miller et M. Girgenrath, « The role of apoptosis in neuromuscular diseases and prospects for anti-apoptosis therapy », *Trends Mol Med*, vol. 12, n° 6, p. 279-286, juin 2006.
- [146] M. Sandri et U. Carraro, « Apoptosis of skeletal muscles during development and disease », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 31, n° 12, p. 1373-1390, déc. 1999.
- [147] « Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy. - PubMed - NCBI ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714187>. [Consulté le: 06-févr-2019].
- [148] J. G. Tidball, D. E. Albrecht, B. E. Lokensgard, et M. J. Spencer, « Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle », *J. Cell. Sci.*, vol. 108 (Pt 6), p. 2197-2204, juin 1995.
- [149] J. E. Davies et D. C. Rubinsztein, « Over-expression of BCL2 rescues muscle weakness in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, n° 6, p. 1154-1163, mars 2011.
- [150] « Deathbase: Cell Death / Apoptosis Database ». [En ligne]. Disponible sur: <http://deathbase.org/>. [Consulté le: 08-févr-2019].
- [151] G. Siciliano *et al.*, « Autosomal dominant external ophthalmoplegia and bipolar affective disorder associated with a mutation in the ANT1 gene », *Neuromuscul. Disord.*, vol. 13, n° 2, p. 162-165, févr. 2003.
- [152] I. M. L. W. Körver-Keularts *et al.*, « Two Novel Mutations in the SLC25A4 Gene in a Patient with Mitochondrial Myopathy », *JIMD Rep*, vol. 22, p. 39-45, mars 2015.
- [153] B. H. Graham, K. G. Waymire, B. Cottrell, I. A. Trounce, G. R. MacGregor, et D. C. Wallace, « A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator », *Nat. Genet.*, vol. 16, n° 3, p. 226-234, juill. 1997.
- [154] J.-Y. Jang, Y. Choi, Y.-K. Jeon, K. C. Y. Aung, et C.-W. Kim, « Over-expression of Adenine Nucleotide Translocase 1 (ANT1) Induces Apoptosis and Tumor Regression in vivo », *BMC Cancer*, vol. 8, p. 160, juin 2008.
- [155] P. N. Tonin, H. Scoble, H. Shimada, et W. K. Cavenee, « Muscle-specific gene expression in rhabdomyosarcomas and stages of human fetal skeletal muscle development », *Cancer Res.*, vol. 51, n° 19, p. 5100-5106, oct. 1991.
- [156] Cosmic, « SLC25A4 Gene - COSMIC ». [En ligne]. Disponible sur: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=SLC25A4#tissue>. [Consulté le: 19-févr-2019].
- [157] H. Kawamata, V. Tiranti, J. Magrané, C. Chinopoulos, et G. Manfredi, « adPEO mutations in ANT1 impair ADP-ATP translocation in muscle mitochondria », *Hum Mol Genet*, vol. 20, n° 15, p. 2964-2974, août 2011.
- [158] « ATG Sarc ». [En ligne]. Disponible sur: https://atg-sarc.sarcomabcb.org/atg_sarc.php?g=SLC25A4. [Consulté le: 13-févr-2019].
- [159] M. Ždravčić, I. Marchiq, M. M. C. de Padua, S. K. Parks, et J. Pouyssegur, « Metabolic Plasticity in Cancers—Distinct Role of Glycolytic Enzymes GPI, LDHs or Membrane Transporters MCTs », *Front Oncol*, vol. 7, déc. 2017.
- [160] W.-W. Zhang *et al.*, « The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic », *Hum. Gene Ther.*, vol. 29, n° 2, p. 160-179, 2018.

- [161] « Thérapie génique », *Inserm - La science pour la santé*. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/therapie-genique>. [Consulté le: 13-févr-2019].
- [162] « Integrative Bayesian Analysis Identifies Rhabdomyosarcoma Disease Genes: Cell Reports ». [En ligne]. Disponible sur: [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(18\)30901-X](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(18)30901-X). [Consulté le: 18-févr-2019].
- [163] M. Gyrð-Hansen et P. Meier, « IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, n° 8, p. 561-574, août 2010.
- [164] M. H. Kang et C. P. Reynolds, « Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy », *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, n° 4, p. 1126-1132, févr. 2009.
- [165] A. V. Budanov, J. H. Lee, et M. Karin, « Stressin' Sestrins take an aging fight », *EMBO Mol Med*, vol. 2, n° 10, p. 388-400, oct. 2010.
- [166] A. V. Budanov et M. Karin, « p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling », *Cell*, vol. 134, n° 3, p. 451-460, août 2008.
- [167] A. V. Budanov *et al.*, « Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability », *Oncogene*, vol. 21, n° 39, p. 6017-6031, sept. 2002.
- [168] M. W. Khan, B. T. Layden, et P. Chakrabarti, « Inhibition of mTOR complexes protects cancer cells from glutamine starvation induced cell death by restoring Akt stability », *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, vol. 1864, n° 6 Pt A, p. 2040-2052, 2018.

Résumé

Dérégulations de la mort cellulaire dans les rhabdomyosarcomes : étude du rôle du transporteur mitochondrial ANT1

Le rhabdomyosarcome (RMS) est la forme la plus fréquente de sarcome des tissus mous chez l'enfant. On distingue 2 sous-types principaux: ERMS (embryonnaire) et ARMS (alvéolaire). Les traitements actuels sont basés sur la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie. Le taux de survie à 5 ans reste de 70% depuis 2000, malgré plusieurs essais cliniques. Il est donc essentiel de pouvoir mieux comprendre leurs bases moléculaires pour pouvoir dans l'avenir mieux les soigner. Mon projet de thèse s'est inscrit dans cette perspective, en cherchant à mieux définir les mécanismes à l'origine de la résistance à la mort cellulaire dans ces cancers.

Les cellules tumorales de RMS proviennent de précurseurs du lignage musculaire. Au cours de la myogenèse, la différenciation des myoblastes primitifs en myotubes nécessite un « switch » métabolique pour répondre à la demande énergétique accrue associée à la contraction musculaire. Ce processus est notamment soutenu par l'expression de gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative, tels que SLC25A4.

Ce gène code pour une protéine mitochondriale nommée ANT1, qui présente une dualité fonctionnelle. En effet, elle intervient à la fois dans la régulation du métabolisme énergétique en régulant l'export d'ATP de la mitochondrie vers le cytosol, mais également dans l'induction de la mort cellulaire en participant à l'ouverture du pore de transition de perméabilité (mPTP) conduisant à la libération du cytochrome c en conditions de stress. Par analyse bioinformatique de bases de données transcriptomiques, nous avons observé que l'expression de SLC25A4 est diminuée dans les RMS. Afin d'étudier le rôle causal de cette altération dans la survenue de RMS, des modèles cellulaires de RMS génétiquement modifiés permettant la surexpression ou l'inactivation d'ANT1 de manière inductible ont été établis. A l'aide de ces modèles, nous avons montré que la perte d'ANT1 favorise un « switch » métabolique dans les cellules tumorales de RMS et/ou diminue la sensibilité à des stress de type chimiothérapie, selon le contexte cellulaire. Réciproquement, sa réexpression sensibilise les cellules à ces traitements in vitro, et suffit à freiner la croissance tumorale in vivo. Ces résultats indiquent que la perte d'ANT1 peut constituer un nouveau mécanisme oncogénique dans les cellules tumorales, et favoriser notamment la résistance aux chimiothérapies.

Mots Clés

ANT1, rhabdomyosarcome, stress oxydatif, oncologie, métabolisme

Abstract

Deregulation of cell death in rhabdomyosarcoma: analysis of the role of the mitochondrial transporter ANT1

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most frequent form of pediatric soft-tissue sarcoma. It is divided into 2 main subtypes: ERMS (embryonal) and ARMS (alveolar). Current treatments are based on chemotherapy, surgery and radiotherapy. 5-year survival rate remains of 70% since 2000, despite several clinical trials. There is then an urgent need to improve the understanding of their molecular etiology to improve their therapeutic management. My PhD project forms part of this perspective, by seeking to better define mechanisms triggering resistance to cell death in these cancers.

RMS cells derive from muscle lineage precursors. During myogenesis, primitive myoblasts differentiation into myotubes requires a metabolic switch to support the increased energetic demand of contractile muscle. This process is notably supported by expression of genes involved in oxidative phosphorylation, such as SLC25a4.

This gene encodes a mitochondrial protein named ANT1, which has a functional duality as it is involved both in metabolism via regulation of ATP release from mitochondria to cytosol, but also in apoptosis as part as the mPTP (mitochondria Permeability Transition Pore) leading to the release of cytochrome c under stress. By bioinformatic analysis of transcriptomic databases, we observed that SLC25A4 expression is downregulated in RMS. To deal with this result in depth, we designed modified RMS cells inactivated for ANT1 using CRISPR/CAS9 technology or overexpressing this protein, using a Tet-On system. Using these models, we have shown that loss of ANT1 favors a metabolic switch in RMS tumor cells and/or promotes resistance to death notably upon chemotherapeutic treatments, according to the cell context. Reciprocally, its reexpression sensitizes cells to these treatments in vitro and brakes tumor growth in vivo. These results indicate that ANT1 loss may constitute a new oncogenic mechanism in tumor cells, and may notably favor resistance to chemotherapies.

Keywords

ANT1, rhabdomyosarcoma, oxidative stress, oncology, Metabolism