



Conséquences fonctionnelles de la relation entre le métabolisme des acides aminés et la régulation de l'expression des gènes au cours de la réponse cellulaire aux thérapies anti-cancéreuses

Fabien Aubé

► To cite this version:

Fabien Aubé. Conséquences fonctionnelles de la relation entre le métabolisme des acides aminés et la régulation de l'expression des gènes au cours de la réponse cellulaire aux thérapies anti-cancéreuses. Biologie cellulaire. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2022. Français. NNT : 2022ENSL0061 . tel-03935442

HAL Id: tel-03935442

<https://theses.hal.science/tel-03935442>

Submitted on 11 Jan 2023

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.



Numéro National de Thèse : 2022ENSL0061

THESE

en vue de l'obtention du grade de Docteur, délivré par
l'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Soutenue publiquement le 19/12/2022, par :
Fabien Aubé

Conséquences fonctionnelles de la relation entre le métabolisme des acides aminés et la régulation de l'expression des gènes au cours de la réponse cellulaire aux thérapies anti-cancéreuses

Devant le jury composé de :

EYMIN Béatrice, Directrice de Recherche INSERM – IAB, Grenoble
DUTERTRE Martin, Chargé de Recherche INSERM – Institut Curie, Orsay
CAMMAS Anne, Chargée de Recherche INSERM – CRCT, Toulouse
MOLLEREAU Bertrand, Professeur des Universités – ENS de Lyon
AUBOEUF Didier, Directeur de Recherche INSERM – LBMC, Lyon

Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directeur de Thèse

Avant-propos

Après une classe préparatoire BCPST, j'ai rejoint l'école d'ingénieur de VetAgro Sup (Clermont-Ferrand), en option Génétique, Ecophysiologie et Productions Végétales, avec pour but de travailler dans le secteur privé sur la production d'OGM. Après un stage de fin d'études très intéressant réalisé à Biogemma (filiale OGM de Limagrain), je me retrouve confronté au peu d'opportunités d'emploi qu'offre ce secteur, et finis par trouver mon premier emploi quelques mois plus tard : un CDD d'un an en tant qu'ingénieur d'études à l'INRA de Versailles qui débutera en février 2014.

Durant cette année, j'ai appris toutes les bases de la biologie moléculaire et développé des outils bio-informatiques permettant de prédire les séquences cibles des protéines de liaison aux ARN mitochondriaux. Cette année de travail fût très prolifique puisqu'elle m'a permis d'obtenir trois articles (Wang *et al.* 2017, 2018; Chardon *et al.* 2020). Je remercie encore Hakim Mireau qui a été un mentor exceptionnel. Hélas par manque de moyens mon contrat n'a pas pu être prolongé et je me suis donc retrouvé au chômage.

Après quelques mois de recherche, j'ai envoyé une candidature spontanée à Didier Auboeuf et j'ai finalement rejoint son équipe en mai 2015 pour travailler sur l'épissage alternatif au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse (Tranchevent *et al.* 2017). J'ai ensuite commencé à travailler sur les facteurs d'épissage et les biais de compositions des exons qu'ils régulent (Fontrodona *et al.* 2019; Lemaire *et al.* 2019). Au cours de ces années j'ai également pu travailler avec d'autres équipes du LBMC et du CIRI, menant à de nouvelles publications (Mangeot *et al.* 2019; Mercier *et al.* 2020).

J'ai ensuite eu l'opportunité de débiter ma thèse dans la continuité de ces travaux en octobre 2019, suite à l'obtention d'un appel à projet de la région conjointement avec Erytech Pharma, que je remercie également. Les travaux présentés ci-après s'inscrivent donc dans ce contexte.

Remerciements

Résumé

Selon la métaphore de « programmes génétiques » communément utilisée, les cellules s'adaptent à des fluctuations environnementales au travers de voies de signalisation plus ou moins complexes préprogrammées dans leurs génomes, conduisant à une description cloisonnée des activités cellulaires. Pourtant, les différentes activités cellulaires sont intimement liées et interdépendantes. J'ai analysé la réponse d'un modèle cellulaire, une lignée dérivée d'un mélanome, exposée à des inhibiteurs de la croissance cellulaire dirigés contre les protéines BRAF et MEK. Les résultats obtenus montrent que ces inhibiteurs diminuent la biodisponibilité de certains acides aminés comme le glutamate et l'aspartate. Ceci entraîne l'accumulation de ribosomes sur des ARNm codant pour des protéines enrichies en ces acides aminés, et nous montrons que cet arrêt de traduction entraîne la dégradation de ces ARNm dont la composition est biaisée. Or, les protéines enrichies en glutamate et aspartate sont fréquemment impliquées dans le métabolisme de l'ADN, et en particulier dans sa réparation. Ainsi, via leurs effets sur le métabolisme des acides aminés, des inhibiteurs de croissance cellulaire entraînent l'arrêt de la biosynthèse de protéines enrichies en glutamate et aspartate impliquées dans la réparation de l'ADN. Cette diminution de la biosynthèse des protéines de la réparation de l'ADN dépendante du métabolisme cellulaire est discutée dans le contexte de l'émergence de cellules cancéreuses porteuses de mutations et étant résistantes, c'est-à-dire ne répondant plus à des thérapies anti-cancéreuses comme la combinaison d'inhibiteurs BRAF et MEK souvent utilisée dans le traitement des mélanomes.

Mots clés

Cancer, mélanome, BRAFV600, acides aminés, biais de composition, traduction, TDD, cellules persistantes, résistance aux thérapies, réparation de l'ADN

Abstract

According to the commonly used metaphor of "genetic programs", cells adapt to environmental fluctuations through more or less complex signalling pathways pre-programmed in their genomes, leading to a compartmentalized description of cellular activities. However, the different cellular activities are intimately linked and interdependent. I analysed the response of a cell model, a melanoma-derived cell line, to cell growth inhibitors directed against BRAF and MEK proteins. The results obtained show that these inhibitors decrease the bioavailability of certain amino acids such as glutamate and aspartate. This leads to the accumulation of ribosomes on mRNAs coding for proteins enriched in these amino acids, and we show that this translation arrest leads to the degradation of these mRNAs whose composition is biased. However, proteins enriched in glutamate and aspartate are frequently involved in DNA metabolism, and in particular in its repair. Thus, through their effects on amino acid metabolism, cell growth inhibitors cause the arrest of the biosynthesis of glutamate and aspartate enriched proteins involved in DNA repair. This decrease in the biosynthesis of DNA repair proteins dependent on cell metabolism is discussed in the context of the emergence of cancer cells carrying mutations and being resistant, i.e. no longer responding to anti-cancer therapies such as the combination of BRAF and MEK inhibitors often used in the treatment of melanoma.

Key Words

Cancer, melanoma, BRAFV600, amino acids, composition bias, translation, TDD, persister cells, therapy resistance, DNA repair

Table des matières

Avant-propos	1
Remerciements.....	2
Résumé	3
Table des figures.....	7
Table des abréviations.....	10
Partie 1 : Résistance aux thérapies.....	11
1.1 - Le cancer	11
1.1.1 – Généralités	11
1.1.2 – Initiation	12
1.1.3 – Progression tumorale	15
1.2 – Thérapies.....	23
1.2.1 - Thérapies « classiques ».....	23
1.3 – Résistance aux thérapies ciblées	28
1.3.1 – Provenance de la résistance.....	28
1.3.2 – Résistance et mélanome	32
1.3.3 - Conclusion	38
Partie 2 : Métabolisme et expression des gènes.....	40
2.1 – « Programmes génétiques » et expression des gènes	40
2.1.1 – Les différents niveaux de régulation de l’expression génique.....	40
2.1.2 – Programmes génétiques : une réalité ?	45
2.2 – Métabolisme cellulaire et expression des gènes.....	47
2.2.1 – Métabolisme cellulaire et expression des gènes ?	47
2.2.2 – Métabolisme cellulaire et épigénétique	50

2.2.3 – Métabolisme cellulaire, traduction et TDD	52
2.2.4 – Vers une vision intégrée des différentes activités cellulaires	59
2.2.5 - Conclusion	61
Partie 3 : Objectifs	62
Partie 4 : Résultats (article scientifique).....	63
4.1 - Résumé	63
4.2 - Abstract.....	64
4.3 - Introduction	65
4.4 - Results.....	71
4.5 - Discussion	83
4.6 - Materials and Methods	89
4.7 - References	99
4.8 - Figure legends.....	110
4.9 - Supplementary figures legends	119
Partie 5 : Discussion et perspectives	131
5.1 - Origine de la baisse de biodisponibilité d'acides aminés induite par les inhibiteurs MAPK.....	131
5.2 - TDD et épissage alternatif	136
5.3 - Biais de composition local VS global.....	138
5.4 - La thérapie anticancéreuse induit-elle l'apparition des cellules persistantes et la résistance ?	139
5.5 - Effet spécifique de la thérapie ou réaction générale à un stress ?	142
5.6 - Conclusion.....	143
Références bibliographiques	145

Table des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la voie MAPK dans des cellules normales et dans des cellules portant la mutation BRAFV600.	144
Figure 2 : Quelques exemples de gènes inactivés par des modifications épigénétiques et impliqués dans le développement de certains cancers.....	177
Figure 3 : Les changements biologiques et moléculaires dans la progression tumorale du mélanome.	188
Figure 4: Schéma représentant le gradient hypoxique du micro-environnement tumoral.....	199
Figure 5: Illustration de la perte de potentiel anti-oxydatif dans les cellules cancéreuses via l'effet Warburg.....	20
Figure 6: Le stress oxydatif engendré par les ROS active l'expression des DNMT et HDAC.....	21
Figure 7: Les « hallmarks » du cancer permettant la tumorigenèse et la progression tumorale.....	22
Figure 8 : Illustration des mécanismes d'action des petites molécules inhibitrices (Lee et al. 2018).....	25
Figure 9: Quelques exemples de thérapies ciblées mises en place pour contrer les capacités des cellules cancéreuses.	27
Figure 10: Modèle selon lequel l'apparition d'une population cancéreuse résistante se ferait par sélection Darwinienne d'un clone génétiquement résistant.	28
Figure 11 : Schéma décrivant les possibles modes d'apparition de cellules persistantes finissant par développer des mutations ou non.	30
Figure 12: Schéma illustrant le caractère réversible du phénomène de persistance cellulaire	31
Figure 13 : Liste non exhaustive de causes de résistance génétique et épigénétique aux inhibiteurs de BRAF.	33

Figure 14: L'inhibition de BRAF dans des cellules BRAFV600 promeut l'activation de fibroblastes et le remodelage de la matrice extracellulaire.	36
Figure 15: Des cellules résistantes sont dédifférenciées, et cette résistance peut être inhibée à l'aide de drogues.	37
Figure 16: Quelques exemple de régulations transcriptionnelles, de l'initiation à la terminaison.	42
Figure 17: Les trois voies connues de surveillance des ARNm.	44
Figure 18: Une même réponse observée à l'échelle d'une population de cellule peut avoir des origines différentes.	46
Figure 19: Schéma explicatif du mode de fonctionnement simplifié de l'opéron lactose.	48
Figure 20: Le métabolisme de la glutamine.	49
Figure 21: Les reprogrammations métaboliques et épigénétiques des cellules cancéreuses exercent une régulation réciproque l'une sur l'autre.	51
Figure 22: Table des codons.	52
Figure 23: Schéma de l'initiation coiffe-dépendante de la traduction chez les eucaryotes.	53
Figure 24: Schéma illustrant le cycle d'élongation du ribosome lors de la traduction.	54
Figure 25: Les différents types d'appariements anticodon:codon chez l'Homme.	56
Figure 26: L'optimalité des codons est déterminée par la biodisponibilité en ARNt chargés et de l'efficacité de l'appariement anticodon:codon.	59
Figure 27: Schématisation de l'adaptation métabolique d'une cellule à une perturbation environnementale.	60
Figure 28 : Le catabolisme de la glutamine permet la production d'autres acides aminés et métabolites via la libération de groupements amine.	133
Figure 29 : La déplétion de SLC1A2 en combinaison avec le traitement MAPKi impacte très fortement la prolifération cellulaire.	134

Figure 30: Les déplétions de CTU2 et ADAT2 en combinaison avec le traitement MAPKi impactent modérément la prolifération cellulaire.	135
Figure 31: Répartition des caractéristiques des 72 RBP sous-exprimées suite au traitement MAPKi.....	137
Figure 32: Les ARNm sous-exprimés en réponse aux MAPKi sont spécifiquement enrichis en codons GAU (aspartate) et GAA (glutamate) aux environs des pics de ribosome détectés.....	139
Figure 33: Représentation schématique de la construction utilisée pour monitorer la fréquence de mutation dans les cellules..	141
Figure 34: Représentation de la métaphore de l'adaptation cellulaire et de la persistance.	144

Table des abréviations

A	Adénine
ADN/DNA	Acide DésoxyriboNucléique
ARN/RNA	Acide RiboNucléique
ARN/RNA Pol I, II, III	ARN Polymérases I, II et III
ARNm/mRNA	ARN messenger
ARNt/tRNA	ARN de transfert
ATP	Adénosine TriPhosphate
AU3	codons dont le dernier nucléotide est A ou U
C	Cytosine
COMD	Codon Optimality-Mediated mRNA Decay
CpG	dinucléotide CG méthylé
CUB	Codon Usage Bias
DNMT	DNA Méthyltransferase
G	Guanine
GC3	codons dont le dernier nucléotide est G ou C
HDAC	Histone Dé-ACétylase
HGF	hepatocyte growth factor
I	Inosine
LAM/AML	Leucémie Aigüe Myéloïde
MAFs	Melanoma Associated Fibroblasts
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MBP	Methyl-CpG Binding Protein
MET / EMT	Transition Épithélio-Mésenchymateuse
NGD	No-Go Decay
NMD	Nonsense-Mediated Decay
NSD	Non-Stop Decay
ORF	Open Reading Frame
PTC	Premature Termination Codon
ROS	Reactive Oxygen Species
SAM	S-AdenosylMethionine
siRNA	Small Interfering RNA
SPRR	Small Proline-Rich proteins
T	Thymine
TDD	Translation-Dependant Decay
TMS	Théorie des Mutations Somatiques
U	Uracile
UTR	UnTranslated Region
UV	Ultra-Violet

Partie 1 : Résistance aux thérapies

1.1 - Le cancer

1.1.1 – Généralités

Le cancer représente la seconde source de mortalité au niveau mondial (après les maladies cardio-vasculaires) : une personne sur quatre en moyenne y est confrontée au cours de son existence (JEMAL *et al.* 2019). Le terme « cancer » ne désigne pas une maladie en particulier mais l'ensemble des maladies impliquant une croissance anormale et incontrôlée de cellules pouvant potentiellement envahir d'autres parties du corps. Chaque cancer est différent et on estime ainsi qu'il existe plus de 250 types de cancers répertoriés aujourd'hui (Hassanpour & Dehghani 2017).

Mon travail de thèse s'articule autour d'un modèle de cancer de la peau bien décrit dans la littérature : le mélanome. Le mélanome est une tumeur maligne qui se forme à partir de cellules appelées mélanocytes. Il apparaît le plus souvent sur une partie de peau saine mais peut également se développer à partir d'un grain de beauté (naevus). Bien que représentant une minorité des cancers de la peau (de l'ordre de 5%), c'est de loin le plus agressif (60% de la mortalité des cancers de la peau). Lorsque les premières cellules cancéreuses apparaissent, elles sont peu nombreuses et proches de la surface de la peau, au sein de l'épiderme. : on parle de mélanome *in situ*. Sans traitement, la tumeur progresse vers le derme et l'hypoderme, et on parle alors de mélanome invasif. Des métastases peuvent ensuite se développer à distance de la tumeur primaire, au sein de la peau, des ganglions lymphatiques, des poumons, du foie ou encore du cerveau.

Les facteurs de risques du mélanome sont bien connus et sont environnementaux et génétiques. Le principal facteur de risque environnemental est l'exposition aux UV. Il existe une corrélation entre le nombre et la sévérité des coups de soleils durant l'enfance et la propension à développer un mélanome plus tard, à l'âge adulte. Au niveau génétique, certaines personnes, de par la nature de leur peau, sont plus sensibles que d'autres aux effets

des rayons UV (plus la peau est claire et plus le risque est accru). Le nombre de grains de beauté ainsi que des antécédents familiaux sont également des facteurs aggravants.

Le cancer est une maladie progressive qui peut se décomposer en deux étapes : une étape d'initiation et une étape de progression tumorale.

1.1.2 – Initiation

Les cellules qui composent nos organismes sont souvent présentées comme des machines composées de centaines de milliers de pièces. Il est souvent décrit que via de multiples réactions chimiques complexes et interconnectées, elles font et défont des structures, maintiennent leur métabolisme pour créer de l'énergie et créer des copies - presque- identiques d'elles-mêmes de façon organisée et contrôlée, servant de nouveau matériel pour remplacer des cellules trop vieilles ou réparer des tissus endommagés. Ces réactions chimiques complexes formeraient des réseaux biochimiques superposés et interconnectés : les voies métaboliques.

Il est admis que l'apparition d'une cellule cancéreuse passerait par l'apparition de mutations successives dans des gènes bien spécifiques. Dans 5 à 20% des cas de cancer (Soufir 2011), l'individu naît directement avec de telles mutations, transmises d'un parent lui aussi porteur de la mutation ou bien s'étant produites lors de la gamétogenèse. On parle de mutation innée.

Mais dans la plupart des cas, les mutations associées au cancer apparaissent au cours de la vie : on parle de mutations acquises. Certains facteurs environnementaux (âge, tabac, exposition aux UV, virus,...) peuvent favoriser l'apparition de ces mutations. Le corps humain étant composé de plusieurs centaines de milliards de cellules, la question n'est pas si, mais quand un tel événement surviendra.

Les systèmes de maintenance de l'intégrité du génome et de réparation de l'ADN sont tels que les taux de mutations restent très faibles d'une génération de cellules à une autre. Chez l'Homme, on estime ce taux de mutation à 2.3×10^{-8} par nucléotide et par génération cellulaire (Nachman & Crowell 2000). Des mutations dans des gènes de réparation de l'ADN

ont été identifiées dans de nombreux cas de cancers héréditaires et expliqueraient comment ces cancers apparaissent. Par exemple, des mutations dans les gènes BRCA1, BRCA2, RAD50 ou encore BLM, qui codent pour des protéines impliquées dans la réparation cassures double-brin de l'ADN, prédisposeraient à l'apparition de cancers du sein, des ovaires ou du sang. (Negrini *et al.* 2010).

En plus de cela, l'accumulation de mutations pourrait être accélérée en compromettant les systèmes de surveillance de l'intégrité du génome, dont le « rôle » est de « forcer » les cellules génétiquement endommagées vers la senescence ou l'apoptose (Jackson & Bartek 2009). Des mutations dans le fameux gène gardien du génome TP53 sont souvent retrouvées dans de nombreux cancers (Lane 1992) et la majorité d'entre elles occurrent au niveau de son site de liaison à l'ADN (Olivier *et al.* 2010). Ces mécanismes d'autodestruction ne sont pas infailibles et peuvent eux-mêmes faire l'objet de mutations et devenir obsolètes, et une cellule saine peut ainsi devenir cancéreuse.

La plupart des cellules cancéreuses sont rapidement détectées et détruites par le système immunitaire, mais certaines d'entre-elles y échappent et se multiplient de façon anarchique et forment une masse désorganisée qu'on appelle tumeur.

Lorsque l'on parle de mélanome, on fait le plus souvent référence au mélanome cutané, représentant près de 90% des cas recensés (Bastian 2014). Mais il existe en vérité d'autre types de mélanomes : nodulaire, uvéal ou encore acro-lentigineux. Nous ferons donc référence au mélanome cutané par la suite, qui est le mieux caractérisé et celui ayant servi de modèle pour mes travaux de thèse. Des études génomiques à large échelle ont permis de catégoriser le mélanome en différentes sous-classes, selon la présence de mutations dans des gènes clés. De façon intéressante, tous ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la voie MAPK. En effet, l'activation de la voie de signalisation MAPK est centrale dans la majorité des cas de mélanome, RAS et BRAF étant les oncogènes les plus fortement activés. Cela a pour conséquence d'activer la transcription de gènes responsables de la croissance, de la survie et de la prolifération cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse. Dans des cellules saines,

l'activation de cette voie est dépendante de la liaison de facteurs de croissance extracellulaires à des récepteurs membranaires RTK (récepteurs tyrosine-kinase).

La sous-classe de mélanomes prépondérante est celle possédant des mutations dans le gène BRAF. En effet, environ la moitié des cas de mélanome présentent une forme mutée de ce gène (Davies *et al.* 2002). De façon intéressante, c'est très souvent la même mutation qui ressort dans plus de 80% des cas : au niveau du 600^{ième} codon, la substitution d'une valine (V) par un glutamate (E) ou une lysine (K). Ainsi muté, le gène BRAF (qu'on nommera à présent BRAF^{V600}) peut être activé de façon RAS (et donc RTK) indépendante, induisant une prolifération clonale incontrôlable et conduisant à la formation d'une tumeur (Figure 1, Kakadia *et al.* 2018).

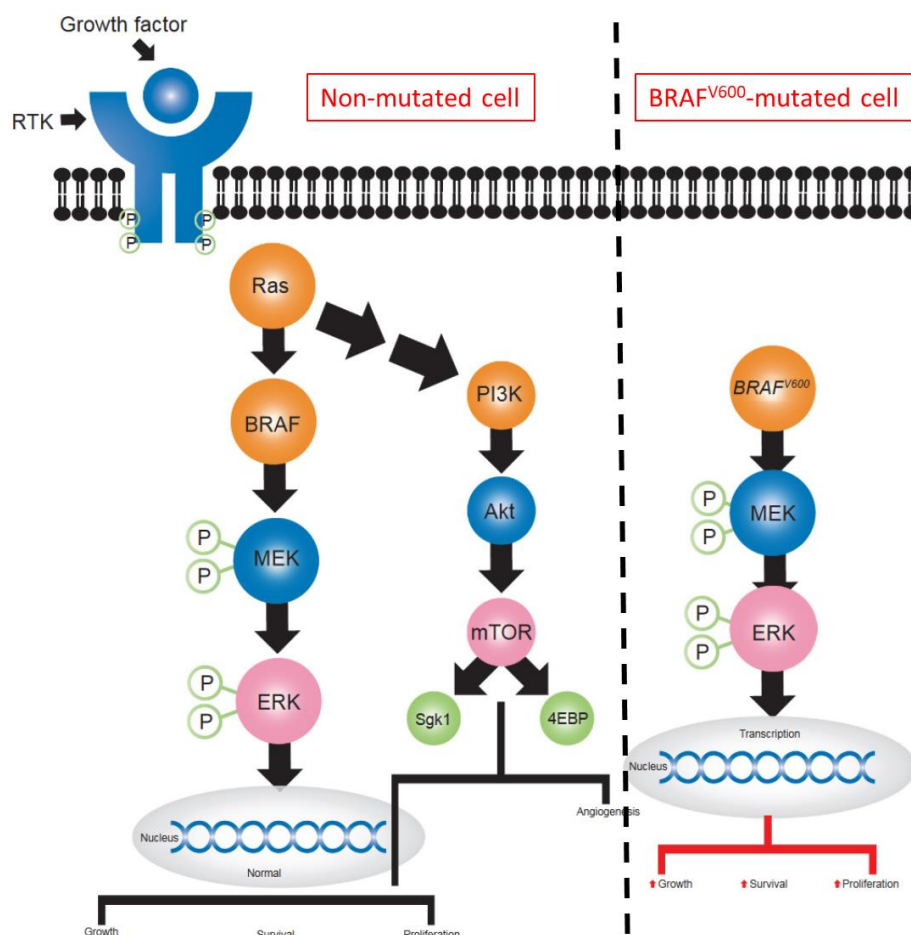


Figure 1 : Représentation schématique de la voie MAPK dans des cellules non cancéreuses (gauche) et dans des cellules cancéreuses portant la mutation BRAFV600 (droite). Dans les cellules mutées, la voie est activée de façon RAS (et donc RTK) indépendante. Adapté de Kakadia *et al.* 2018.

Il est proposé que l'activation incontrôlée de cette voie MAPK signe donc l'étape d'initiation cancéreuse du mélanome. Il s'agirait donc d'un prérequis, mais qui ne serait pas suffisant pour mener à l'apparition d'une tumeur maligne. Nous allons à présent voir que la formation d'une tumeur en un tissu organisé fait intervenir une multitude de mécanismes.

1.1.3 – Progression tumorale

Avant de former une tumeur, les cellules cancéreuses « doivent » acquérir un ensemble de caractéristiques leur permettant d'échapper à la mort cellulaire, de « déjouer » le système immunitaire, de maintenir leur état prolifératif, et d'acquérir un caractère invasif. Étudions à présent plus en détails comment ces capacités peuvent être acquises, en prenant en exemple le mélanome.

1.1.3.1 – Régulations génétiques

L'acquisition des capacités précédemment énumérées ne se fait pas en une fois et dépend d'une succession d'altérations génomiques accumulées au sein de mêmes cellules, mais aussi de modifications de l'expression génique. La progression tumorale se fait en effet en plusieurs étapes d'expansions clonales successives, déclenchées notamment par l'acquisition de génotypes mutants. Il est important de souligner que ces traits doivent être héréditaires entre générations de cellules cancéreuses, mais ne sont pas nécessairement des mutations : ils peuvent par exemple être acquis au travers de mécanismes épigénétiques comme la méthylation de l'ADN ou des modifications d'histones (Berdasco & Esteller 2010).

Comme évoqué précédemment, des bouleversements dans l'expression de gènes notamment via des régulations épigénétiques peuvent également avoir lieu de façon non-mutationnelle. Ces mécanismes épigénétiques sont de deux types complémentaires.

Le premier a lieu au niveau de l'ADN via la méthylation de résidus cytosine qui sont suivis d'une guanosine (on parle de dinucléotide CpG). De nombreux CpG ont été « éliminés » des gènes au cours de l'évolution, mais ils ont cependant été « conservés » au niveau de leurs régions promotrices où ils constituent des régions régulatrices appelées « îlots CpG », et de manière générale, ils ne sont pas méthylés (Herman & Baylin 2003). On trouve également des

îlots CpG en dehors des régions promotrices des gènes (dans des exons, introns ou des régions non codantes), et ils y sont en général méthylés. Cette méthylation est catalysée par une famille d'enzymes ADN méthyltransférases (DNMT).

Des enzymes contenant des domaines de liaison aux CpG méthylés (MBP) « reconnaissent » ces régions de l'ADN méthylées, et avec les DNMT, recrutent d'autres complexes protéiques capables d'apporter des modifications aux histones autour desquelles s'enroule l'ADN. Ces modifications chimiques sont covalentes (méthylation, acétylation, phosphorylation) et sont localisées au niveau N-terminal des sous-unités constituant les histones (H2A, H2B, H3 et H4). Du type et de la localisation de ces modifications découle un changement de conformation de la chromatine qui selon les cas, facilite ou restreint l'accès à l'ADN aux protéines constituant la machinerie transcriptionnelle. De façon schématique, une acétylation des histones est en général corrélée avec une transcription activée, alors que leur déacétylation par des histone déacétylases (HDAC) est plutôt synonyme d'une transcription ralentie (Lund & Van Lohuizen 2004). En somme, la méthylation de l'ADN au niveau de régions promotrices de gènes aura plutôt tendance à réprimer l'expression de ces derniers, via le recrutement de HDAC déacétylant les histones adjacentes.

Ces régulations épigénétiques sont bien connues pour leur rôle central au cours du développement embryonnaire, de la différenciation ou encore au cours de l'organogenèse (Goldberg *et al.* 2007), mais depuis plusieurs années déjà, nous savons que la plupart des types de cancers sont associés à des modifications épigénétiques. En effet, les cellules cancéreuses se distinguent des cellules saines de par leur profil de méthylation opposé : les cellules cancéreuses ont tendance à présenter une hypométhylation au niveau global du génome (de l'ordre de 25% (Wilson *et al.* 2007), mais une hyperméthylation locale au niveau des promoteurs de certains gènes antitumoraux par exemple. Selon le type de tumeur, cette hyperméthylation aberrante peut concerner des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, le maintien de l'intégrité du génome, l'apoptose, la migration et l'invasion cellulaire, ou encore dans la réponse aux facteurs de croissance. Ce sont d'ailleurs dans ces mêmes gènes que l'on retrouve des mutations associées à des cancers (*Figure 2*).

GST	Autres noms	Cancers associés	Mutations génétiques	Altérations épigénétiques	Rôles biologiques physiologiques
APC		Côlon, estomac, foie, pancréas, ...	x	x	Multiples : transduction de signaux, organisation du cytosquelette, adhésion, ...
BRCA1		Sein, ovaire	x	x	Réparation de l'ADN
CDH1	E-cadherin	Estomac, thyroïde, sein	x	x	Adhésion cellulaire
CDKN2A	p16 ^{INK4A}	Multiples	x	x	Cycle cellulaire
DAPK		Lymphomes, ORL	x	x	Apoptose, régulation de la mobilité cellulaire
MLH1		Côlon, estomac, endomètre	x	x	Réparation de l'ADN
MSH2		Côlon, endomètre	x	x	Réparation de l'ADN
MGMT		Multiples	Non décrit	x	Réparation de l'ADN
RAR β		Col utérus, prostate, sein, ...	x	x	Croissance + différenciation cellulaire – apoptose
RASSF1A		Multiples	Non décrit	x	Cycle cellulaire
RBI		Rétinoblastome, poumon	x	x	Cycle cellulaire – apoptose
TP53		Multiples	x	x	Cycle cellulaire – apoptose

Figure 2 : Quelques exemples de gènes inactivés par des modifications épigénétiques et impliqués dans le développement de certains cancers. Adapté de (Kern *et al.* 2007)

Le mélanome est un cancer progressif dont l'évolution se fait par étapes. Le modèle de Clark en décrit les changements histopathologiques : les mélanocytes sains développent progressivement un phénotype malin via l'acquisition de différentes caractéristiques (Clark *et al.* 1989, Figure 3). Des approches protéomiques et transcriptomiques ont permis de mettre en évidence que ces caractéristiques phénotypiques provenaient de dérèglements d'ordre génétique (Alonso *et al.* 2004, Curtin *et al.* 2005) et on peut synthétiser comment certains d'entre eux sont associés à la progression du mélanome (Miller & Mihm 2006, Figure 3).

Ces dérèglements génétiques sont donc primordiaux pour la tumorigenèse, et nous avons vu qu'ils pouvaient être exacerbés par l'environnement dans lequel les individus évoluent. Nous allons à présent voir que le micro-environnement tumoral joue lui aussi un rôle primordial dans la tumorigenèse et la progression tumorale.

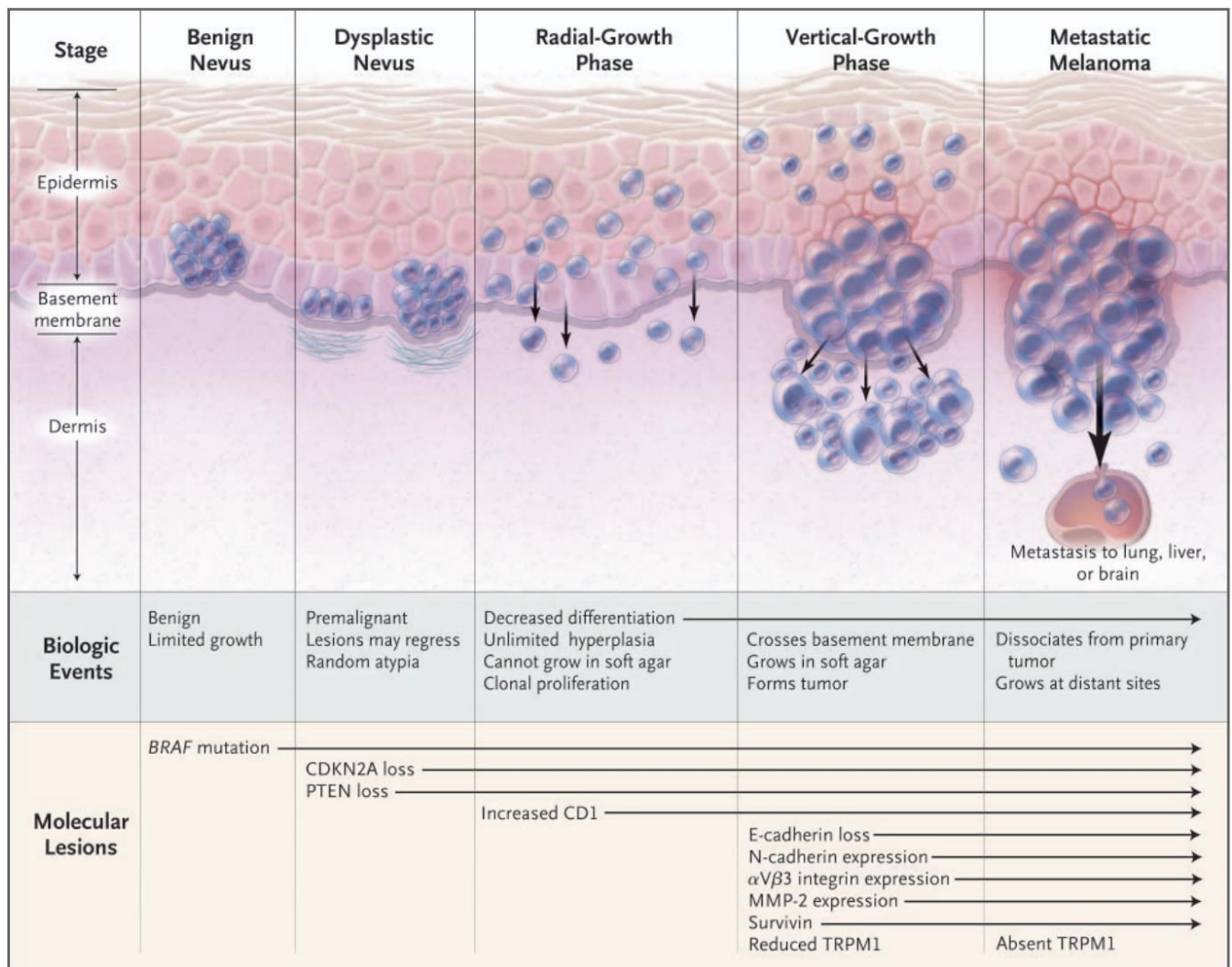


Figure 3 : Les changements biologiques et moléculaires dans la progression tumorale du mélanome.

Au stade du naevus bénin, on observe une mutation de BRAF qui induit une activation de la voie MAPK. Les anomalies cytologiques des nævus dysplasiques reflètent des lésions au sein des voies de l'inhibiteur de la kinase cycline-dépendante 2A (CDKN2A) et de l'homologue de la phosphatase et de la tensine (PTEN). La suite de la progression du mélanome est associée à une diminution de la différenciation et à la baisse de l'expression des marqueurs du mélanome régulés par le facteur de transcription associé à la microphthalmie (MITF). Les phases de croissance verticale et de mélanome métastatique sont remarquables de par leurs changements au niveau de l'adhésion cellulaire. Les changements dans l'expression du gène spécifique aux mélanocytes, la mélastatine 1 (TRPM1), sont en corrélation avec la propension métastatique, mais la fonction de ce gène reste inconnue. D'autres changements incluent la perte de l'E-cadhérine et l'expression accrue de la N-cadhérine, de l'intégrine α V β 3 et de la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP-2). Tiré de Miller & Mihm 2006.

1.1.3.2 – Impact du micro-environnement tumoral

Il est bien établi que le micro-environnement tumoral joue un rôle essentiel dans la tumorigenèse et la progression tumorale en affectant les changements génétiques évoqués précédemment au cœur des cellules cancéreuses. Composé des vaisseaux sanguins alentours, de la matrice extracellulaire, mais aussi de cellules (immunitaires, fibroblastes, autres cellules saines et cancéreuses), il exerce sur la tumeur une pression biochimique (molécules sécrétées,

gradient de concentrations de molécules (Figure 4), accès aux nutriments du sang, hypoxie) mais aussi mécanique selon les propriétés de la matrice extracellulaire (texture, orientation des fibres, tailles des pores, ...) (Spill *et al.* 2016).

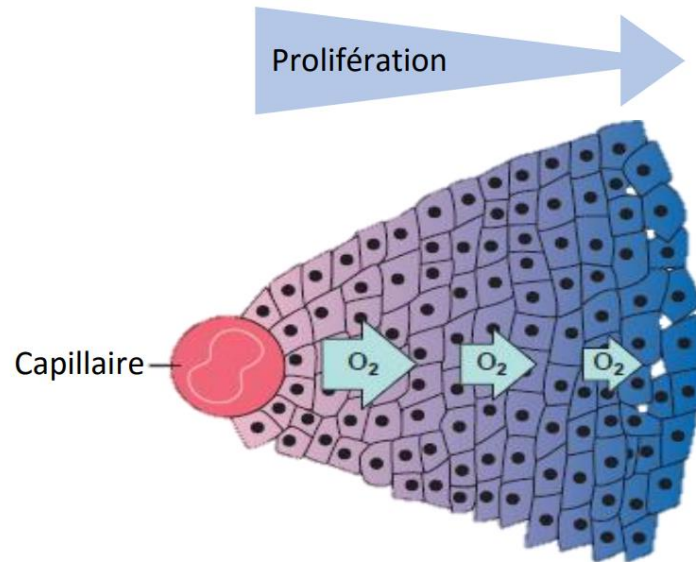


Figure 4: Schéma représentant le gradient hypoxique du micro-environnement tumoral. Plus les cellules sont proches d'un capillaire, plus elles ont accès aux nutriments et au dioxygène apporté par le sang, et plus leur taux de prolifération sera élevé. Tiré de Guillaume 2016.

En se multipliant, la cellule cancéreuse initiale va peu à peu former un tissu de plus en plus hétérogène et complexe. En effet, les cellules internes auront un accès limité aux ressources (nutriments, oxygène) et le système capillaire va vite se retrouver sous-dimensionné pour répondre aux besoins de ces cellules énergivores. Elles auront également plus de difficultés à évacuer les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone accumulé.

Pour répondre à cette problématique, la tumeur va « devoir acquérir » une capacité de néovascularisation. Lors de l'embryogénèse, cela passe par l'assemblage de cellules endothéliales sous forme de tubes (vasculogénèse) et l'éclosion de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux déjà formés (angiogénèse). Chez l'adulte, ce processus est quiescent et ne se manifeste de façon temporaire que lors d'une blessure ou des menstruations. A l'inverse, lors de la progression tumorale, cette angiogénèse n'est pas transitoire et une fois activée, cause la croissance ininterrompue de nouveaux vaisseaux (Hanahan & Folkman 1996). Historiquement, l'angiogénèse était considérée comme une étape tardive intervenant après

la croissance de la tumeur, mais des analyses histologiques de tumeurs détectées à des stades précoces ont révélé qu'elle interviendrait de façon précoce, soulignant son importance dans la progression tumorale (Raica *et al.* 2009).

Comme nous l'avons évoqué, ce micro-environnement est hypoxique, notamment pour les cellules internes, trop éloignées des capillaires apportant le dioxygène. En conséquence de leur métabolisme boosté et de leur accès restreint au dioxygène, les cellules cancéreuses seraient donc plus susceptibles de subir un stress oxydatif. De plus, même en présence de dioxygène, les cellules cancéreuses ont plutôt tendance à reposer sur la glycolyse comme source d'énergie : le glucose est catabolisé en lactate (effet Warburg), tandis que dans les cellules saines, le glucose est métabolisé en pyruvate puis en acétyl-CoA avant de rejoindre le cycle de Krebs (El Sayed *et al.* 2013). Le pyruvate, contrairement au lactate, possède un potentiel anti-oxydant ; les cellules cancéreuses accumulent donc plus d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) que les cellules saines (Figure 5).

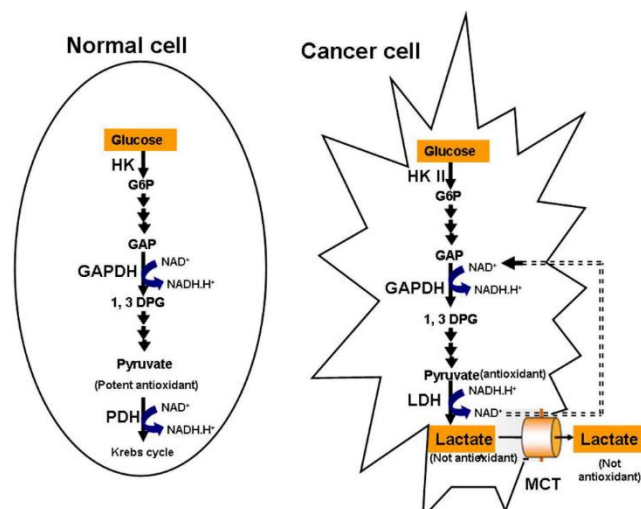
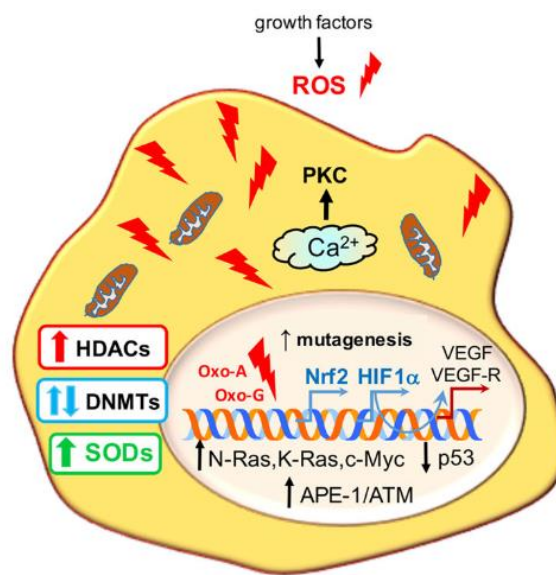


Figure 5: Illustration de la perte de potentiel anti-oxydatif dans les cellules cancéreuses via l'effet Warburg.

Les cellules cancéreuses diffèrent énergétiquement des cellules normales. En ce qui concerne les voies de production d'énergie, les cellules cancéreuses dépendent principalement de la glycolyse cytoplasmique, tandis que les cellules normales dépendent davantage des voies mitochondriales, par exemple la phosphorylation oxydative et le cycle de Krebs. En ce qui concerne la glycolyse elle-même, elle diffère dans les cellules cancéreuses et les cellules normales. Le lactate est produit en aérobiose et extrudé dans les cellules cancéreuses (effet Warburg), alors qu'aucun lactate n'est produit dans les cellules normales qui subissent une glycolyse aérobie. Le lactate n'a pas de fonction antioxydante, ce qui peut diminuer les capacités antioxydantes des cellules cancéreuses, alors que le pyruvate produit dans les cellules normales est un antioxydant puissant. Tiré de El Sayed *et al.* 2013.

HK: hexokinase, HK II: hexokinase type-2, G6P: glucose-6-phosphate, NAD⁺ : Oxidized nicotinamide adenine dinucleotide, NADH.H⁺ : reduced nicotinamide adenine dinucleotide, GAP: glyceraldehyde-3-phosphate, 1,3DPG: 1, 3 diphosphoglycerate, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, MCT: monocarboxylate transporter. LDH: lactate dehydrogenase.

Il a été montré qu'une augmentation intracellulaire modérée du niveau de ROS induit l'expression d'oncogènes et de gènes répresseurs de tumeur, mais également celui des DNMT et HDAC. De plus, le stress oxydatif engendré par les ROS se propage jusque dans le noyau des cellules et endommage l'ADN, augmentant ainsi également le taux de mutations (Figure 6, Perillo *et al.* 2020). Pour finir il a également été montré que de par son caractère hypoxique, le micro-environnement tumoral était favorable à une baisse d'activité des dé-méthylases TET, conduisant à une hyperméthylation du génome (Thienpont *et al.* 2016).



Cancer cell

Figure 6: Le stress oxydatif engendré par les ROS active l'expression des DNMT et HDAC.

Des ROS modérément élevés induisent des oncogènes et inhibent les gènes suppresseurs de tumeurs qui, à leur tour, augmentent la quantité de ROS. La libération de Ca²⁺ induit la PKC, tandis que l'expression des gènes impliqués dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et dans l'établissement d'un système antioxydant boosté est renforcée. Les ROS activent également les HDAC et ont un double effet sur les DNMT, avec des résultats importants pour l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Les bases oxydées déclenchent des mutations et engagent les enzymes de réparation de l'ADN. Tiré de Perillo *et al.* 2020.

Tous ces éléments nous montrent que tout comme l'environnement dans lequel évolue l'individu, le micro-environnement joue un rôle décisif dans la progression tumorale, en favorisant l'instabilité génétique des cellules cancéreuses, leur permettant d'explorer de nouvelles voies et ainsi d'acquérir de nouvelles capacités.

Au fil des années, de nouvelles caractéristiques semblant nécessaires à la progression tumorale ont été découvertes, formant les « hallmarks » du cancer, qui décrivent ainsi l'ensemble des capacités qu'une tumeur « doit » obtenir pour se développer. Ainsi, de nouveaux « hallmarks » sont ajoutés à la liste, année après année (Hanahan & Folkman 1996; Hanahan & Weinberg 2011; Hanahan 2022), montrant à quel point une tumeur est complexe et remarquablement évoluée. Nous reviendrons sur certaines de ces caractéristiques par la suite (celles d'ordre métabolique et génétique qui nous intéressent plus particulièrement, en lien avec le mélanome).

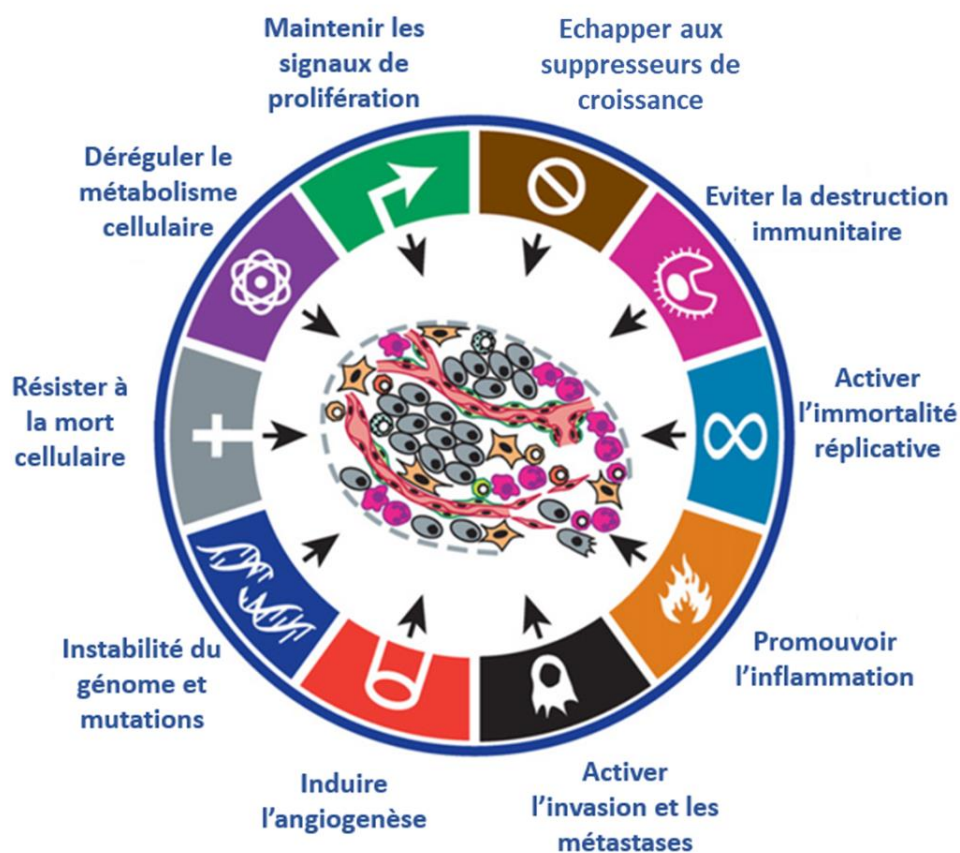


Figure 7: Les « hallmarks » du cancer permettant la tumorigenèse et la progression tumorale. Adapté de Hanahan & Weinberg 2011

1.2 – Thérapies

Nous avons donc vu qu'il existe une multitude de types de cancers, chacun dépendant du type cellulaire affecté et des bouleversements génétiques qui y sont associés. Ainsi, nous allons à présent voir que pour combattre cette maladie, l'Homme a développé une multitude d'approches thérapeutiques, le plus souvent utilisées en combinaisons.

1.2.1 - Thérapies « classiques »

L'évolution des thérapies s'est faite de manière historique, au fur et à mesure des découvertes faites sur les cancers. En effet, comme nous allons le voir, les thérapies sont imaginées en fonction de l'état de l'art.

1.2.1.1 – Actes chirurgicaux

Les premières techniques étaient donc chirurgicales, et ce sont toujours elles qui sont pratiquées en première intention sur les tumeurs solides. La chirurgie a pour but de retirer tout ou partie de la tumeur, selon sa taille, son accessibilité et sa proximité vis-à-vis d'autres organes. Elle peut aussi être pratiquée pour soulager certains symptômes (pression, douleur). Cependant, ce n'est pas une option envisageable pour les cancers métastasés et les cancers liquides (leucémies).

1.2.1.2 – Thérapies par irradiation

La découverte de l'instabilité génomique des cellules cancéreuses a donné naissance à des thérapies par radiation qui ont pour but d'endommager l'ADN des cellules. Elle peut être externe : une machine envoie des radiations de façon précise sur les cellules cancéreuses et selon différents angles. Elle peut également être interne, sous forme solide ou liquide. Une source radioactive solide est placée en contact avec la tumeur (curiethérapie), il s'agit donc d'un traitement local comme la radiothérapie externe. Une source radioactive liquide peut également être utilisée par injection, affectant le corps entier, mais préférentiellement les cellules cancéreuses dont l'ADN est instable. On parle de thérapie systémique. Les thérapies

par irradiation sont souvent utilisées en combinaison avec d'autres thérapies, notamment chirurgicales.

1.2.1.3 – Chimiothérapie

Etant donné que les cellules cancéreuses se développent très rapidement, des thérapies ciblant spécifiquement les cellules prolifératives ont été mises en place. La chimiothérapie peut être utilisée seule ou de façon combinatoire, selon l'état de santé du patient et du type de cancer. Utilisée avant une chirurgie, elle permet de réduire la taille de la tumeur avant une opération, tandis qu'utilisée après une chirurgie, elle permet d'éliminer d'éventuelles traces de cellules cancéreuses sur le site chirurgical ou des métastases. Cependant, la chimiothérapie va également affecter les cellules saines se divisant rapidement, causant de forts effets secondaires (fatigue extrême, chute de cheveux, ...).

1.2.1.4 – Thérapies ciblées

Les années 2000 ont vu l'apparition des premières thérapies ciblées, dans le but de pouvoir traiter de façon plus fine et efficace les cancers, tout en limitant les effets secondaires des radio- ou chimiothérapies. Le principe d'une thérapie ciblée est de contrecarrer l'effet d'une protéine spécifique préalablement identifiée et contrôlant la croissance, la division cellulaire ou encore le caractère invasif des cellules cancéreuses. C'est donc la caractérisation moléculaire des différents types de cancers qui a permis cette avancée (gènes, protéines). Pour cela, des cellules cancéreuses sont prélevées au patient et la présence de ces biomarqueurs est évaluée en laboratoire. Le traitement du patient pourra ainsi être adapté selon la nature des biomarqueurs identifiés : on parle de thérapie ciblée.

La plupart des thérapies ciblées se retrouvent sous la forme d'anticorps monoclonaux ou de petites molécules (drogues) ciblant spécifiquement une protéine. Plus récemment, des approches de thérapie génique ou de vaccins ont également fait leurs preuves.

Les anticorps monoclonaux sont fabriqués en laboratoire et produits par des cellules clonales identiques (bactérie, levure ou cellule de mammifère). Pour ce faire, ces cellules sont exposées à une protéine cible pour déclencher l'équivalent d'une réaction immunitaire et la

production d'anticorps spécifiques contre cette protéine est purifiée. Ils permettent essentiellement de traiter des maladies auto-immunes et certains cancers. Dans ce dernier cas, ils peuvent par exemple bloquer la prolifération cellulaire ou signaler les cellules cancéreuses au système immunitaire en se fixant à des récepteurs membranaires, ou neutraliser des facteurs de croissance extracellulaires. On peut également les conjuguer à d'autres molécules de chimiothérapie ou radioactives, pour délivrer le traitement de façon plus spécifique et au plus proche de la tumeur (augmentation des doses, diminution des effets secondaires). Tout comme les autres traitements, on peut utiliser des anticorps monoclonaux en combinaison avec d'autres approches (National Cancer Institute, 2017).

Les petites molécules possèdent un faible poids moléculaire (< 1kDa) leur permettant de pénétrer à l'intérieur des cellules pour y cibler une protéine spécifique (Nwibo *et al.* 2015). La plupart de ces molécules ont pour but d'inactiver des kinases ou des voies métaboliques. D'autres peuvent cibler le protéasome, déclencher l'apoptose ou inhiber les mécanismes de réparation de l'ADN (Figure 8, Lee *et al.* 2018).

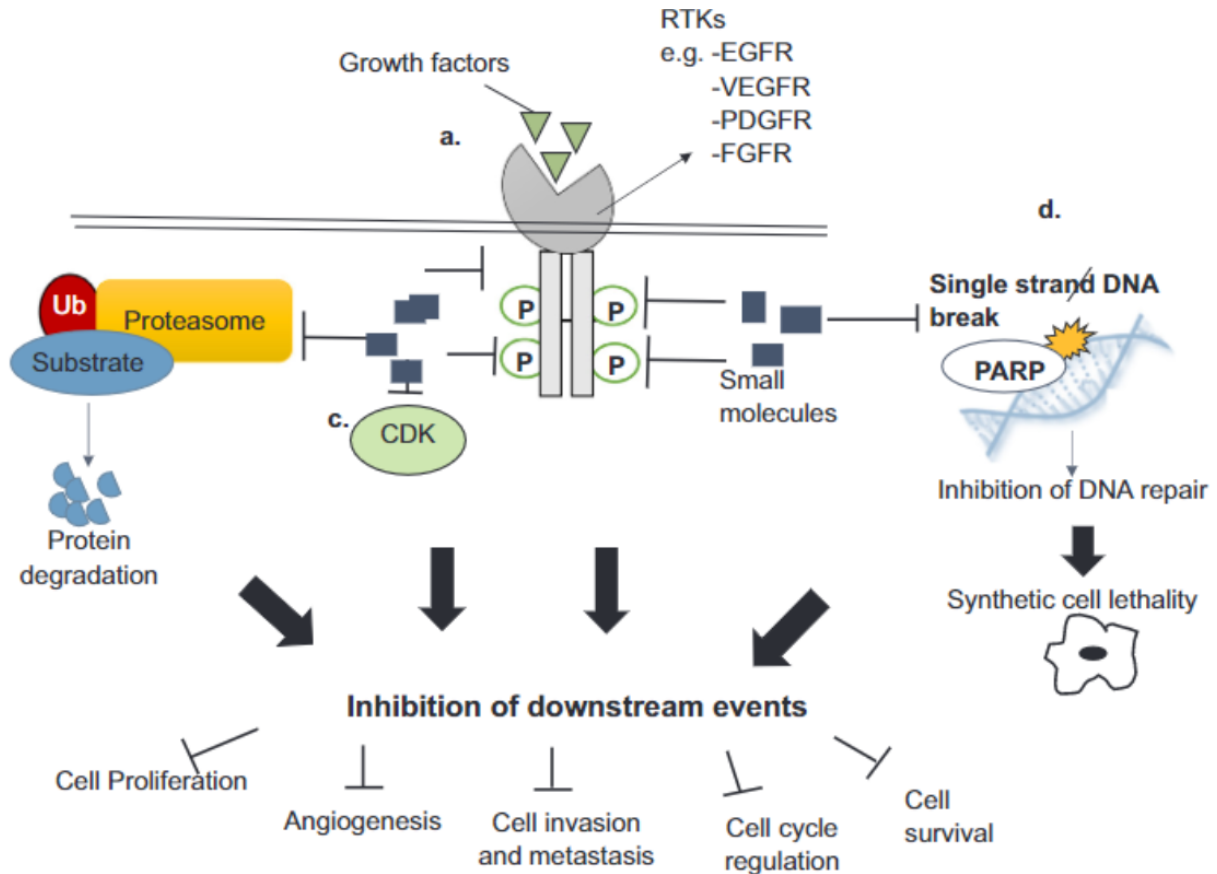


Figure 8 : Illustration des mécanismes d'action des petites molécules inhibitrices (Lee *et al.* 2018).

Les vaccins anticancéreux thérapeutiques ont pour but de déclencher une réaction immunitaire antitumorale. Ils peuvent être générés de façon patient-spécifique à partir de cellules cancéreuses du patient pour diriger cette réponse immunitaire de façon très précise, ou bien en induisant une réponse immunitaire globale qui aurait un effet anti-cancéreux.

Les thérapies géniques consistent quant à elle à tenter d'introduire du matériel génétique (ADN ou ARN) dans les cellules cancéreuses pour les détruire ou restreindre leur croissance. Par exemple un gène muté peut être remplacé par sa version saine, ou encore réprimer l'expression d'un gène donné grâce à des petits ARN interférents (siRNA) (Sadelain 2016).

Intéressons-nous maintenant aux principales thérapies existant pour traiter le mélanome, notre cancer d'intérêt.

1.2.1.5 – Thérapies ciblées et mélanome

Comme évoqué précédemment, les principales altérations génétiques détectées dans les mélanomes concernent des gènes des voies de signalisation MAPK et PI3K, et en particulier le gène BRAF, retrouvé muté dans plus de la moitié des cas de mélanome. Des thérapies ciblées contre ces protéines ont donc vu le jour.

Le premier inhibiteur de BRAF^{V600} approuvé sur le marché est le vémurafénib, capable de bloquer son activité sérine/thréonine kinase, et obtenant un taux de réponse de près de 50%, là où le traitement de référence de l'époque (dacarbazine) en obtenait un de 5% seulement (Chapman *et al.* 2011). Une autre molécule, le dabrafénib, permet d'obtenir des résultats similaires (Hauschild *et al.* 2012), mais avec des effets secondaires réduits. Plus récemment, l'encorafénib a reçu une autorisation de mise sur le marché, préconisé pour le traitement du cancer colorectal métastatique portant la mutation BRAF^{V600}.

Dans certains cas, la tumeur se trouve dans un micro-environnement riche en facteurs de croissance, et la désactivation de BRAF^{V600} n'a que peu d'effet. Ainsi, des inhibiteurs de MEK, directement en aval de BRAF dans la voie de signalisation MAPK, ont été développés. Le tramétinib et le cobimétinib ont été approuvés pour le traitement du mélanome métastatique

en 2013 et 2015, respectivement. Le cobimétinib se lie préférentiellement aux formes phosphorylées de MEK (mais 100 fois plus à MEK1 qu'à MEK2), tandis que le tramétinib se lie aux formes non-phosphorylées de MEK1 et MEK2 sans prévalence (Roskoski 2017). Dans les deux cas, l'activation de MEK1 et/ou de sa forme phosphorylée est réduite, inhibant de ce fait la phosphorylation en aval de ERK, et donc la survie et la prolifération des cellules cancéreuses.

1.2.1.6 – Limites des thérapies actuelles

Comme nous l'avons vu, l'Homme a développé ces dernières décennies une multitude de thérapies ciblées pour combattre tous types de cancers et parvenant parfois à éradiquer toute trace de cellules cancéreuses, même métastasées. Pour cela, des molécules ciblant les différentes caractéristiques clés des cancers ont été développées au cours des 20 dernières années (Figure 9). Mais toutes ces stratégies ont un point faible en commun : chez de nombreux patients, leur effet finit par s'estomper, car les cellules cancéreuses y deviennent résistantes

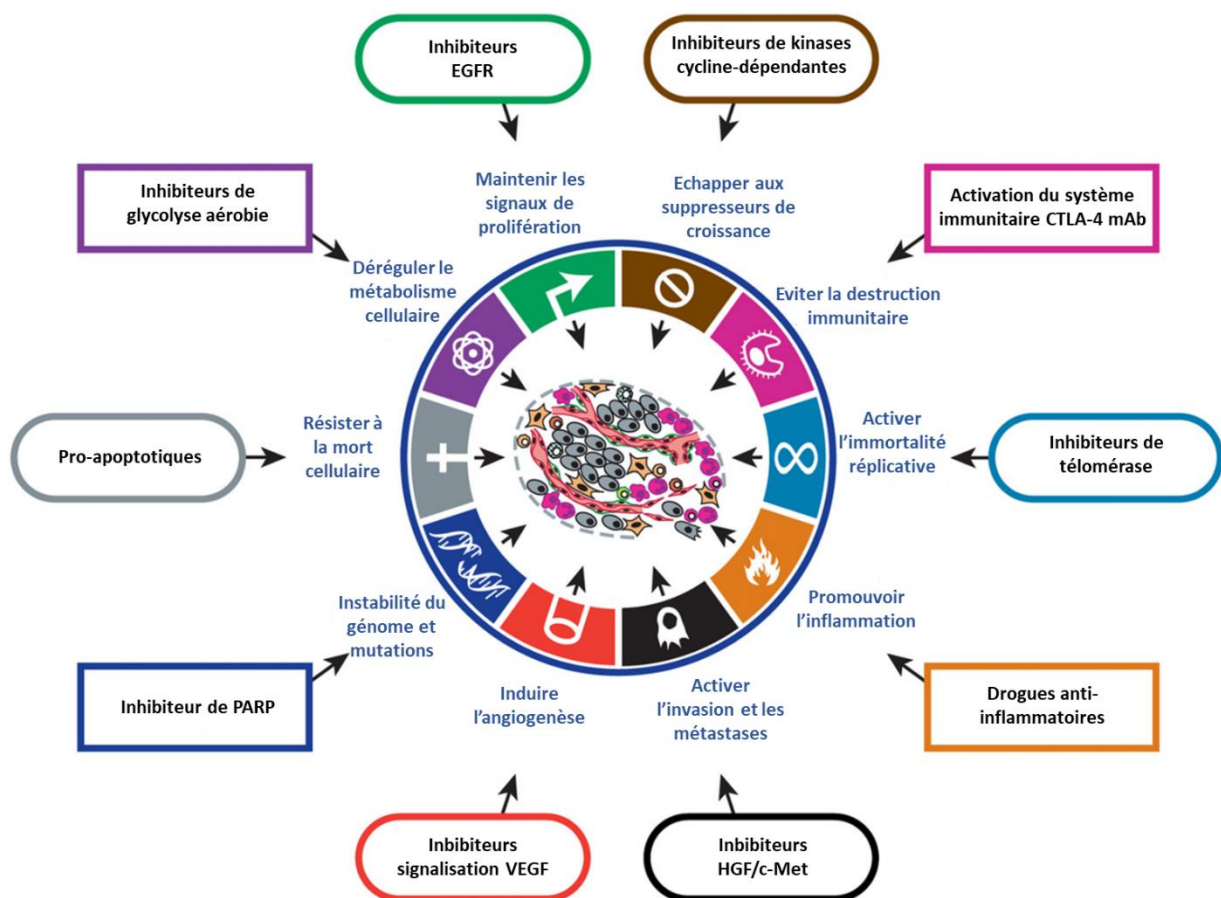


Figure 9: Quelques exemples de thérapies ciblées mises en place pour contrer les capacités des cellules cancéreuses. Adaptation de Hanahan & Weinberg 2011.

1.3 – Résistance aux thérapies ciblées

Lorsque des cellules cancéreuses résistent aux effets de thérapies ciblées, elles se remettent à proliférer et reforment des tumeurs : c'est la rechute. Etudions à présent ces mécanismes de résistance et quelles approches sont employées pour les contourner, avec un focus sur le cas du mélanome.

1.3.1 – Provenance de la résistance

1.3.1.1 – Théorie des mutations somatiques

Il est clairement établi aujourd'hui que la résistance aux thérapies provient de l'hétérogénéité intra-tumorale (Gerlinger *et al.* 2012). Pendant longtemps, il a été considéré que la résurgence d'un cancer provenait uniquement de clones génétiquement résistants possédant des mutations aléatoires leur permettant de survivre à la thérapie, avant même que celle-ci ne soit mise en place (Ding *et al.* 2012, Figure 10). En cancérologie, ce dogme qu'est la théorie des mutations somatiques (TMS) est assez peu contesté et possède de fervent défenseurs (Robert 2022).

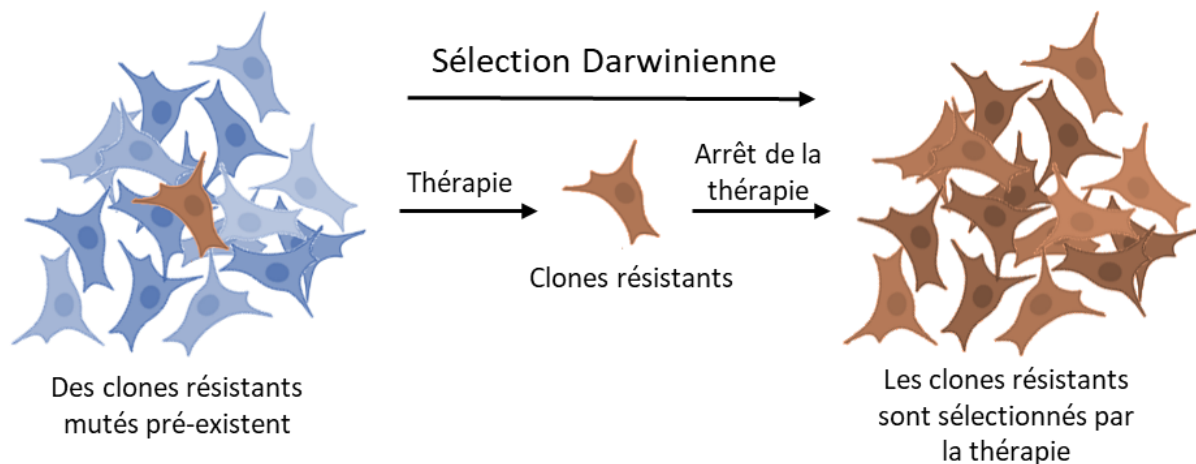


Figure 10: Modèle selon lequel l'apparition d'une population cancéreuse résistante se ferait par sélection Darwinienne d'un clone génétiquement résistant.

Cette hypothèse a des implications cliniques peu réjouissantes, car cela implique que toute tumeur peut contenir des clones résistants, ce qui signifie qu'il faudrait prendre en compte cette information pour adapter le traitement de chaque patient. De plus, une tumeur comporte en moyenne un milliard de cellules au moment de son diagnostic (Diaz *et al.* 2012),

et les erreurs de séquençage étant de l'ordre d'une base sur mille, il n'est donc pas possible d'avoir une sensibilité inférieure à 0.1% de la fraction allélique pour détecter d'éventuelles mutations au sein d'un échantillon de biopsie tumorale. Récemment, les techniques de séquençage en cellule unique ont permis de lever cette barrière et permettent aujourd'hui l'analyse de plusieurs millions de clones, et remettent également en cause la TMS.

1.3.1.2 – Cellules persistantes

Des études ont en effet montré de cette manière que la résistance proviendrait bien de clones présents dans la population de cellules cancéreuses de départ (Bhang *et al.* 2015). Cependant, il a été observé lors de phases de rechutes que les cellules cancéreuses n'arboraient pas forcément de nouvelles mutations permettant d'expliquer ce phénomène, suggérant qu'elles avaient survécu au traitement d'une autre manière, et on s'intéresse de plus en plus à cette population cellulaire depuis quelques années. Ces cellules sont souvent regroupées en deux catégories : les cellules tolérantes, qui semblent moins sensibles que les autres à la thérapie ciblée, et les cellules persistantes, qui sont dans un état de dormance, ce qui leur permet d'échapper à l'apoptose induite par le traitement (Swayden *et al.* 2020). Nous emploierons le terme de « cellule persistante » par la suite.

Dans un premier temps, il a été suggéré que des clones résistants émergeaient de ces cellules persistantes, via l'acquisition de nouvelles mutations (Ramirez *et al.* 2016). Cependant, on s'est rendu compte que la situation était plus complexe, puisque des mécanismes non-génétiques associés à la persistance ont été découverts dans plusieurs types de cancers (Shaffer *et al.* 2017; Bell *et al.* 2019).

Qu'elle soit d'ordre génétique ou non, la résistance semble donc émerger d'une sous-population clonale. De là deux hypothèses peuvent être formulées : soit la thérapie sélectionne de façon Darwinienne des clones qui seraient dans un état stochastique leur étant favorable face au traitement, soit la thérapie induit de façon Lamarckienne l'apparition de clones résistants (Figure 11). Dans les deux cas, la rechute passe par la génération de cellules persistantes résistant au traitement sans acquérir de nouvelles mutations.

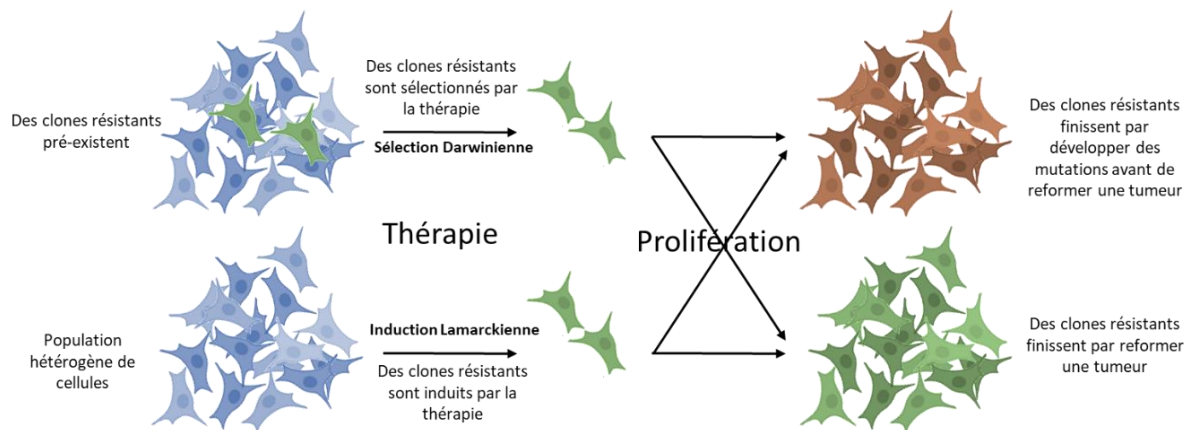


Figure 11 : Schéma décrivant les possibles modes d'apparition de cellules persistantes finissant par développer des mutations ou non. Dans un premier cas, la thérapie sélectionnerait des clones se trouvant dans un état particulier de façon Darwinienne (en haut). De façon alternative et complémentaire, on peut également envisager que la thérapie induirait l'apparition des cellules persistantes de façon Lamarckienne (en bas).

Le concept de cellule persistante n'est pas tout récent puisqu'il a été observé il y a près de 80 ans, lorsque des sous-populations bactériennes parvenaient à survivre à des traitements antibiotiques (Hobby *et al.* 1942; Bigger 1944).

Avec l'essor des analyses -omiques en cellule unique de ces dernières années, de nombreuses études ont récemment été menées pour caractériser ces sous-populations persistantes, et la notion de cellule persistante a été définie. Il s'agit de cellules capables de survivre à des traitements sans pour autant tirer cette résistance d'altérations génétiques, avec un cycle cellulaire à l'arrêt ou fortement ralenti (Balaban *et al.* 2019). On parle de persistance à l'échelle de cellules uniques ou d'une sous-population cellulaire, se distinguant ainsi du phénomène de tolérance, concernant lui la totalité d'une population cellulaire.

Ce phénomène de persistance est également réversible, si bien que des cellules persistantes ayant survécu à un traitement redonneront une population semblable à celle de départ en l'absence de traitement, et cette population se comportera de façon similaire en cas de nouveau traitement identique (Harms *et al.* 2016, Figure 12).

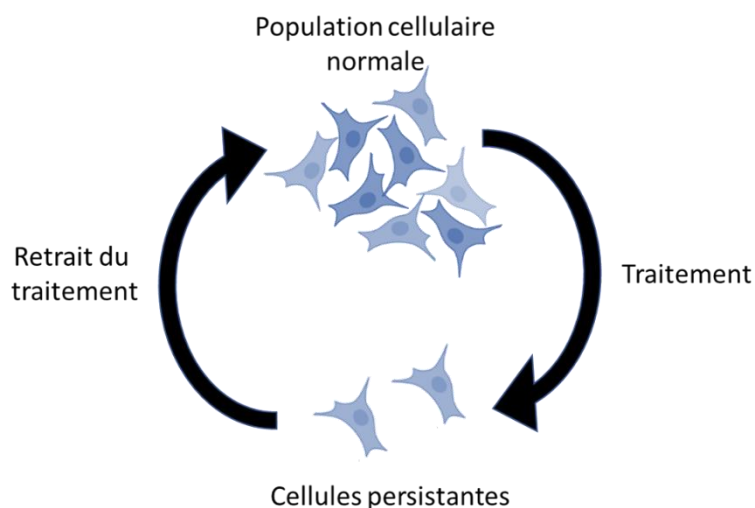


Figure 12: Schéma illustrant le caractère réversible du phénomène de persistance cellulaire

De nombreux mécanismes expliquant la persistance des cellules cancéreuses ont été découverts ces dernières années. Ils peuvent être d'ordre épigénétique, transcriptionnel, traductionnel ou encore métabolique et se cumuler entre eux, afin de servir quatre grands axes stratégiques au niveau cellulaire, à savoir : réduire la prolifération cellulaire, adapter le métabolisme cellulaire, détourner le micro-environnement ou encore changer d'identité cellulaire (Shen *et al.* 2020).

Pour résumer, l'apparition de cellules cancéreuses persistantes face à un traitement pourrait se produire de deux façons différentes. Tout d'abord, on peut imaginer que de telles cellules préexistent déjà au sein d'une population globale de cellules cancéreuses, et que le traitement anti-cancéreux ne fait que les sélectionner de façon Darwinienne. D'un autre côté, il est possible que le traitement lui-même soit en partie responsable de l'apparition de clones persistants, via une induction Lamarckienne des cellules (Pisco *et al.* 2013) et c'est dans cette optique que se place mon projet de thèse.

1.3.2 – Résistance et mélanome

Comme nous l'avons vu précédemment, ce sont des inhibiteurs de BRAF qui sont utilisés en première intention pour traiter le mélanome métastatique. Ces inhibiteurs donnent des résultats prometteurs, mais au bout de quelques mois les cellules cancéreuses deviennent résistantes aux inhibiteurs de BRAF, le plus souvent en réactivant la voie MAPK ou PI3K-AKT (Amaral *et al.* 2017). Pour ralentir l'acquisition de telles résistances, la combinaison d'inhibiteurs de MEK aux inhibiteurs de BRAF se montre très efficace, avec un temps avant rechute presque doublé (Flaherty *et al.* 2012).

1.3.2.1 – Causes génétiques

Les causes de ces phénomènes de résistance peuvent être expliquées en partie par la génétique. En effet, des séquençages de mélanomes BRAF^{V600} de patients ayant été traités avec des inhibiteurs de BRAF ont révélé tout un spectre de mutations au sein de gènes des voies MAPK et PI3K-AKT (Figure 13), chez plus de la moitié des patients (Van Allen *et al.* 2014). De façon intéressante, les mutations retrouvées en monothérapie (BRAFi seul) et en thérapie combinatoire (BRAFi+MEKi) concernent les mêmes sets de gènes (Long *et al.* 2014), indiquant qu'une approche thérapeutique combinatoire montrerait toujours ses limites face à ce réservoir de possibilités de résistances génétiques.

Cette hétérogénéité d'altérations génétiques peut même se retrouver au sein d'une même tumeur, où des populations sous-clonales peuvent présenter des altérations génétiques bien différentes. Une étude a en effet montré que des cellules cancéreuses prélevées dans différentes zones de mêmes tumeurs présentaient des mutations différentes (Harbst *et al.* 2016).

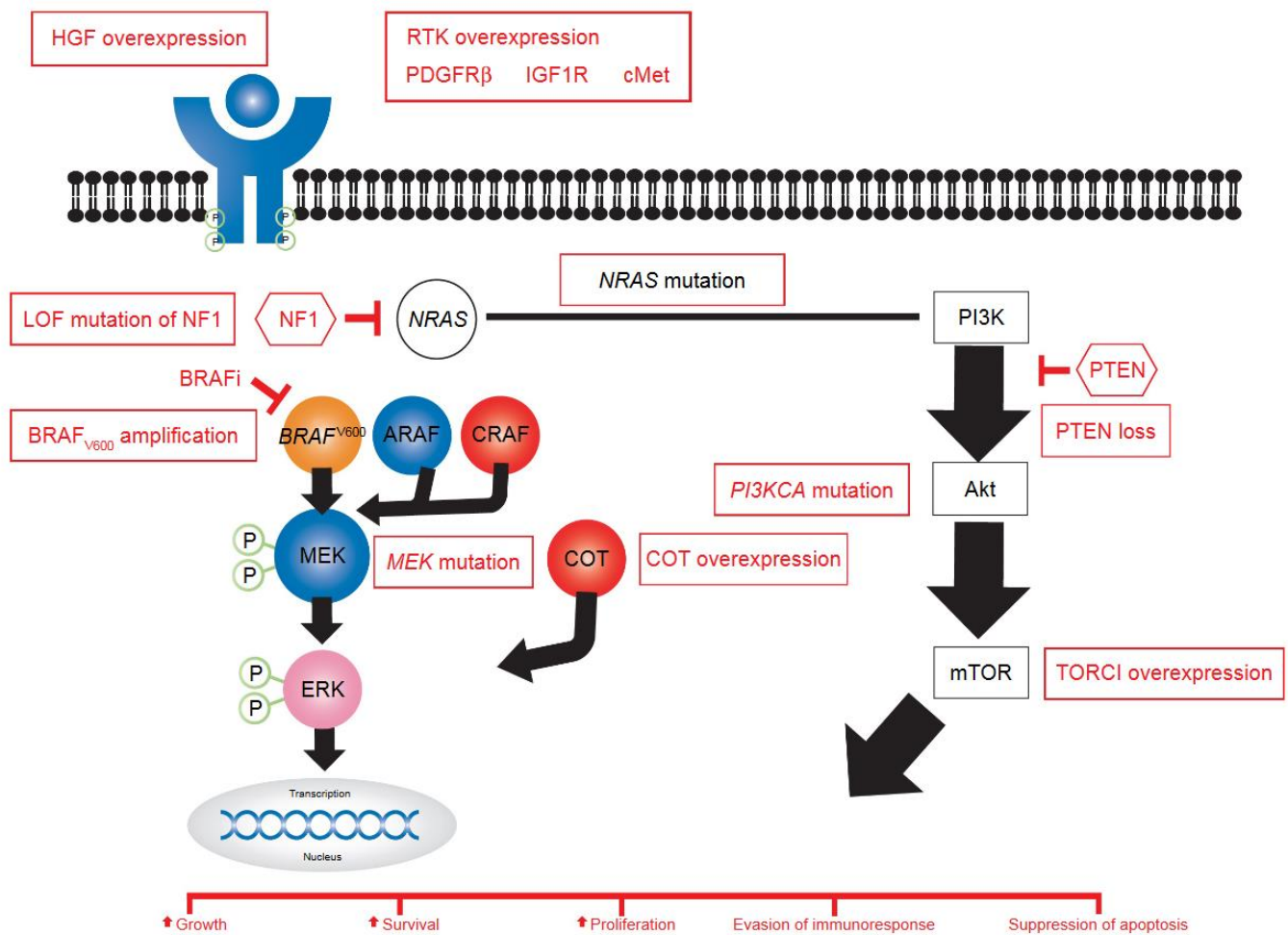


Figure 13 : Liste non exhaustive de causes de résistance génétique et épigénétique aux inhibiteurs de BRAF. Tiré de Kakadia et al. 2018

1.3.2.2 – Causes épigénétiques

Cependant, les mécanismes génétiques décrits précédemment donnent une vision très cloisonnée des activités cellulaires, alors qu'elles sont intimement liées et interdépendantes. De plus, ils ne suffisent pas à eux seuls à expliquer ce que l'on observe chez certains patients lors de rechutes impliquant des cellules cancéreuses ne portant pas de mutations. Ces dernières années et grâce au développement de techniques -omiques en cellule unique, de plus en plus d'études montrent en effet que des cellules cancéreuses, de par leur hétérogénéité stochastique, peuvent survivre à des thérapies sans pour autant porter des mutations qui leur conférerait un avantage particulier. On parle de cellules persistantes.

1.3.2.3 – Ralentir la prolifération cellulaire

Tout comme pour les bactéries, il a été montré que les cellules cancéreuses persistantes présentaient un rythme cellulaire ralenti, notamment grâce à des modifications d'ordre épigénétique (Liau *et al.* 2017, Sharma *et al.* 2010). Ce ralentissement peut également provenir de régulations transcriptionnelles ou d'interactions avec le microenvironnement tumoral, mais il est difficile de savoir si de telles cellules existent déjà avant le traitement, ou bien si c'est le traitement qui induit leur apparition. Une étude très récente a montré que des cellules persistantes pouvaient exister avant un traitement (Taavitsainen *et al.* 2021) ; mais ces deux modèles semblent bel et bien coexister (Swayden *et al.* 2020).

Chez des cellules de mélanome BRAF^{V600} traitées au vémurafénib, il a été montré que la surexpression du gène KDM5B, une dé-méthylase de la marque H3K4, était retrouvée chez les cellules persistantes possédant une prolifération cellulaire ralentie (Roesch *et al.* 2013). En effet, en réduisant le niveau de méthylation H3K4, l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire est inhibée chez ces cellules persistantes (Sharma *et al.* 2010).

Au niveau transcriptionnel, il a été montré que des cellules de mélanome pouvaient devenir résistantes de façon réversible à des inhibiteurs de la voie MAPK via la surexpression de l'oncogène MITF (Smith *et al.* 2016).

Le ralentissement de la prolifération cellulaire semble donc nécessaire mais pas suffisant pour expliquer la survie des cellules persistantes. En effet, le stress métabolique engendré par la thérapie doit lui aussi être contré, notamment en modifiant leur métabolisme, et plus particulièrement leur mode de consommation énergétique.

1.3.2.4 – Adaptation du métabolisme cellulaire

Il a été montré dans plusieurs types de cancers que les cellules persistantes diminuent leur consommation de glucose en augmentant leur respiration mitochondriale. Pour cela, la production d'Acetyl-CoA est nécessaire, alimentée par l'autophagie ou encore l'oxydation des acides gras.

La surexpression de transporteurs membranaires d'acides gras facilitant l'importation de ces derniers a d'ailleurs été décrite chez des cellules persistantes de mélanome BRAF^{V600} traitées avec des inhibiteurs de la voie MAPK. Dans cette étude, il est montré que la surexpression de CD36 (fatty-acid translocase) favorise le catabolisme des acides gras, alimentant ainsi la respiration mitochondriale (Aloia *et al.* 2019).

Pour contrer cette hyperactivité mitochondriale oxydative, les cellules persistantes ont besoin de mécanismes anti-oxydants puissants. Ainsi, la réduction de peroxydes lipidiques faisant intervenir le glutathion a été observée chez plusieurs types de cellules persistantes. Par exemple, le gène GPX4 est retrouvé sur-exprimé dans des cellules persistantes de mélanome et de cancer du sein. Cette enzyme catalyse la réduction de peroxydes lipidiques, limitant ainsi le stress oxydatif (Hangauer *et al.* 2017).

Une autre étude a montré que des cellules persistantes cancéreuses BRAF^{V600} traitées avec des inhibiteurs de la voie MAPK montraient une autophagie boostée via l'activation de la voie AMPK. En combinant le traitement avec des inhibiteurs de l'autophagie (chloroquine, bafilomycine), la mortalité cellulaire augmente significativement. A l'inverse, la stimulation de la voie AMPK rend les cellules plus résistantes encore aux inhibiteurs de la voie MAPK (Sanduja *et al.* 2016).

1.3.2.5 – Détourner le micro-environnement

Comme évoqué dans la partie précédente, la tumeur interagit en permanence avec son micro-environnement. En mettant en contact des cellules de mélanome BRAF^{V600} avec différents types de cellules stromales, une équipe de recherche a pu montrer que la présence de ces dernières jouait un rôle important dans la persistance des cellules cancéreuses. En effet, la sécrétion par les cellules stromales du facteur de croissance HGF active le récepteur MET des cellules cancéreuses, réactivant les voies MAPK et PI3K-AKT en contournant l'inhibition de BRAF du traitement anti-cancéreux (Straussman *et al.* 2012).

Il a également été montré que l'inhibition de BRAF pouvait affecter les cellules du microenvironnement, favorisant ainsi la persistance des cellules cancéreuses. En effet, l'utilisation de telles drogues induirait l'activation de fibroblastes associés à la tumeur (MAFs pour Melanoma Associated Fibroblasts), conduisant à la restructuration de la matrice extracellulaire, déclenchant la réactivation de ERK via FAK chez les cellules cancéreuses (Hirata *et al.* 2015, Figure 14)

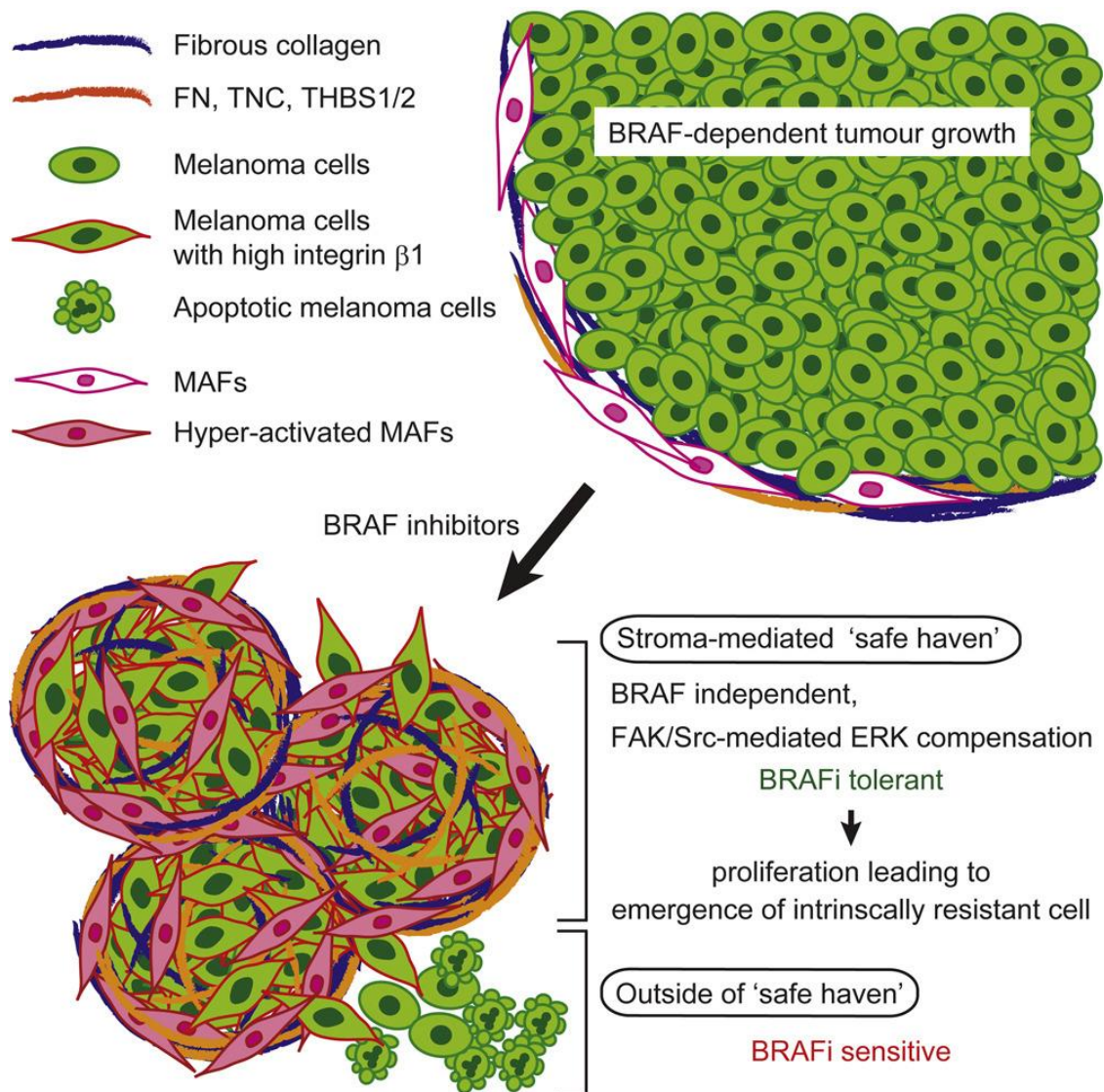


Figure 14: L'inhibition de BRAF dans des cellules $BRAF^{V600}$ promeut l'activation de fibroblastes et le remodelage de la matrice extracellulaire, ce qui entraîne la signalisation de l'intégrine $\beta 1$ -FAK-Src et la réactivation de ERK et MAPK dans les cellules de mélanome. La co-inhibition de BRAF et FAK bloque la réactivation de ERK. Tiré de Hirata *et al.* 2015

1.3.2.6 – Changer d'identité cellulaire

Pour échapper à un traitement, les cellules cancéreuses peuvent également changer d'identité par le biais de deux mécanismes : la transition épithélio-mésenchymateuse (MET) et la dé-différenciation.

Il a en effet été observé que des cellules de mélanome présentant une signature d'expression génique de cellules mésenchymateuses (notamment sous-expression de MITF et SOX10, et surexpression de AXL) possédaient une résistance intrinsèque à l'inhibition de la voie MAPK. Il a donc été proposé que le changement phénotypique d'un statut prolifératif vers un statut invasif (MET) était un mécanisme de persistance (Kemper *et al.* 2014).

Plus récemment, une autre étude a montré que de façon similaire, une sous-population de cellules de mélanome dédifférenciées et présentant un rythme de division ralenti, ainsi qu'une sous-expression de MITF et surexpression de NGFR, persistait face à des inhibiteurs de BRAF et MEK. Pour aller plus loin, ils sont parvenus à rendre cette population sensible en combinant au traitement des inhibiteurs contrant cette dé-différenciation (Figure 15, Fallahi-Sichani *et al.* 2017).

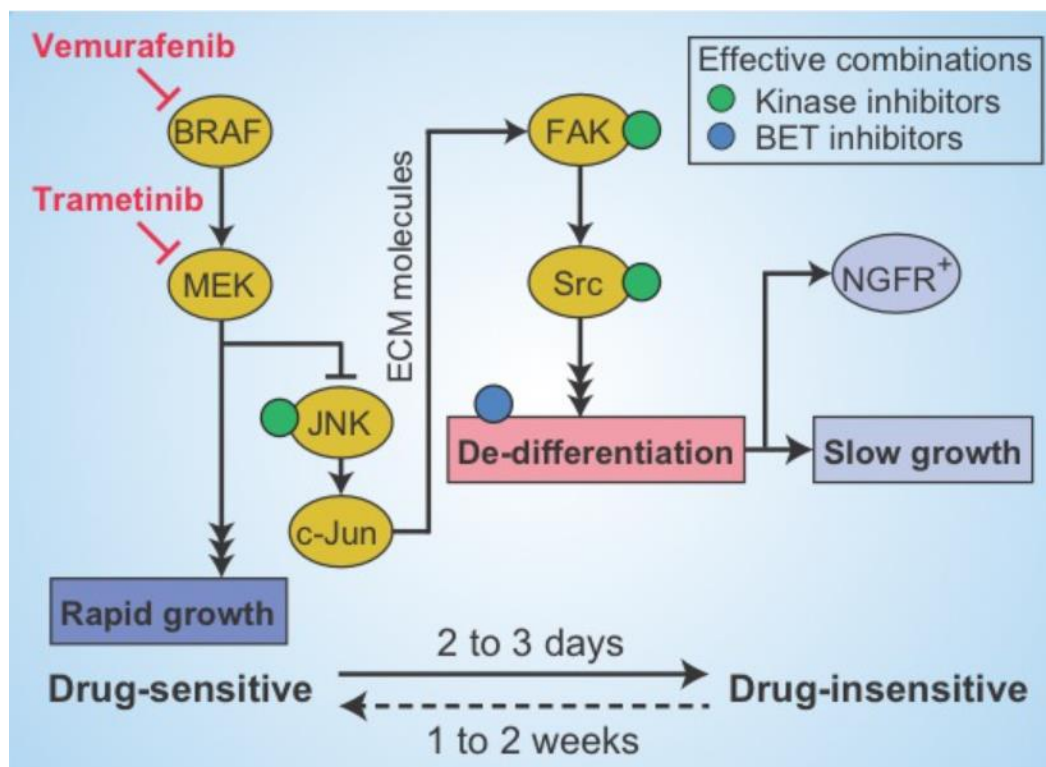


Figure 15: Des cellules résistantes sont dédifférenciées, et cette résistance peut être inhibée à l'aide de drogues. Tiré de Fallahi-Sichani *et al.* 2017.

1.3.3 - Conclusion

Les études récentes de ces mécanismes de persistance ont permis de mettre en avant le fait qu'ils ne seraient pas cloisonnés mais bel et bien interconnectés, et ouvrent la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques. Elles ne remettent pas en cause la théorie des mutations somatiques qui postule que le cancer s'explique par l'accumulation de mutations génétiques aléatoires, et leur rôle déterminant est indéniable. Cependant, ce modèle semble aujourd'hui montrer ses limites face aux données expérimentales obtenues pour expliquer à lui seul l'apparition et la progression du cancer, ainsi que la résistance aux thérapies.

Ainsi, des activités cellulaires comme la régulation de l'expression des gènes ou le métabolisme semblent être des étapes de régulation clés dans le phénomène de persistance : c'est en acquérant un phénotype particulier que les cellules parviennent à survivre à la thérapie, mais pas nécessairement via l'acquisition de mutations.

De façon naïve, on pourrait penser qu'une stratégie efficace serait de sortir les cellules persistantes de leur état de dormance afin de les re-sensibiliser au traitement. Basé sur le caractère réversible des cellules persistantes, des traitements par intermittence ont été expérimentés avec succès sur un modèle de cellules de mélanome BRAF^{V600} traitées au vémurafénib (Das Thakur *et al.* 2013). Cependant, cette stratégie semble trop limitée car elle laissera toujours en vie quelques cellules persistantes, qui finiront par reformer une tumeur tôt ou tard.

Il conviendrait donc mieux de cibler directement les cellules persistantes et/ou d'empêcher leur apparition en combinaison avec le traitement anti-cancéreux, afin de les éradiquer en totalité en même temps que les cellules cancéreuses, une bonne fois pour toute. Par exemple, la réactivation micro-environnementale par les MAFs de ERK évoquée précédemment peut être efficacement contrée en utilisant des inhibiteurs de FAK en combinaison aux inhibiteurs de BRAF (Hirata *et al.* 2015).

Présentés de façon décloisonnée et interconnectée, ces mécanismes de résistance sont complexes et reposent sur des voies et cascades de signalisation imbriquées les unes dans les autres.

Puisque la régulation de l'expression des gènes et le métabolisme sont le pilier de la plasticité phénotypique des cellules cancéreuses, nous devons nous interroger sur les liens entre ces deux activités cellulaires. Pour pouvoir adresser cette question, nous devons commencer par nous interroger sur le sens et le bien-fondé d'une métaphore : celle de « programme génétique », qui est souvent utilisée pour résumer ce que serait l'expression génique. Nous verrons que c'est en questionnant cette métaphore que l'on pourra mieux comprendre les relations entre métabolisme et expression génique.

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous avons fait l'hypothèse que des mécanismes beaucoup plus simples et directs basés sur la traduction des ARN messagers en protéines et la biodisponibilité (et donc le métabolisme) des acides aminés seraient (au moins en partie) responsables du phénomène de persistance et de l'acquisition de mutations menant à la résistance.

Partie 2 : Métabolisme et expression des gènes

2.1 – « Programmes génétiques » et expression des gènes

2.1.1 – Les différents niveaux de régulation de l'expression génique

L'expression des gènes intègre l'ensemble des activités cellulaires qui à partir de l'ADN, conduisent à la synthèse de protéines, en passant bien entendu par la production d'ARN. C'est donc un phénomène possédant divers niveaux de régulation, essentiellement la transcription, la maturation des ARN, et la traduction. Chacune de ces étapes participe à conférer un certain phénotype à la cellule, et leur régulation permet de répondre de façon dynamique aux conditions environnementales affectant la cellule.

2.1.1.1 – Régulations transcriptionnelles

La transcription de l'ADN en ARN est réalisée par des ARN polymérases, qui sont chez les eucaryotes des enzymes composées de plusieurs sous-unités et réparties en 3 classes (RNA Pol I, Pol II et Pol III), chacune spécialisée dans la transcription de certains types d'ARN (respectivement dans la transcription des ARN ribosomiques (rRNA, à l'exception du 5S synthétisé par ARN Pol III), des ARN messagers et ARN non-codants, et des petits ARN/tRNAs).(Cramer 2019).

Pour initier la transcription, l'ARN polymérase doit « reconnaître » la région promotrice d'un gène. Pour cela, cette région doit être accessible et ainsi, la présence de nucléosomes peut inhiber l'initiation de l'ARN polymérase. Pour faciliter l'accès à un gène et permettre la transcription de ce dernier, ces derniers doivent être enlevés ou décalés (Lorch & Kornberg 2017). Concernant l'ARN Pol II, une classe de promoteurs contenant des îlots CpG peuvent inhiber l'assemblage de nucléosomes sur ces régions et ainsi faciliter leur transcription (Deaton & Bird 2011).

D'autre part, seule une fraction des promoteurs Pol II d'une cellule est « active » à un instant *t* au sein d'une cellule. En effet, les promoteurs ont parfois besoin d'être activés par des facteurs de transcription, protéines de liaison à l'ADN se liant de façon séquence-spécifique et permettant de guider les ARN polymérases à leur cible (Dyran & Tjian 1983). Ces facteurs de transcription possèdent dans leurs séquences protéiques d'acides aminés des régions de faible complexité leur permettant de recruter d'autres protéines régulant l'accessibilité à la région promotrice et l'initiation de la transcription par exemple. Plus de 1500 facteurs de transcription ont été recensés (Lambert *et al.* 2018), et bien que la majorité se lie à des régions d'ADN ouvertes, certains peuvent se lier à des régions riches en nucléosomes, permettant d'« ouvrir » la chromatine localement (grâce à des histone-acétyltransférases et des complexes de remodelage de la chromatine notamment) et ainsi les rendre accessibles à l'ARN Pol II (Utley *et al.* 1998).

Le rythme d'élongation de l'ARN Pol II est également régulé. Certaines séquences d'ADN et les nucléosomes peuvent en effet ralentir sa progression et induire une pause transcriptionnelle. Cela peut causer un arrêt et la terminaison de l'ARN Pol II mais aussi participer à d'autres étapes de régulations co-transcriptionnelles comme l'épissage alternatif par exemple.

En effet, lorsqu'un ARN messager est transcrit, il contient des exons et des introns, et ces derniers doivent être excisés. Certains exons peuvent en effet être excisés lors de ce processus, menant à la formation d'isoformes différentes, et ce phénomène n'est pas rare puisqu'il concerne plus de 95% des gènes chez l'Homme. Ainsi, à partir d'un seul gène, une grande variété d'isoformes protéiques différentes peuvent être synthétisées. Ce processus est essentiellement régulé par des protéines de liaison à l'ARN capables de reconnaître des motifs plus ou moins dégénérés et s'y lier pour promouvoir ou réprimer l'inclusion d'un exon particulier : les facteurs d'épissage. La présence ou non d'un exon peut être primordiale dans la fonction de la protéine qui sera traduite, en jouant sur sa localisation cellulaire par exemple. Des protéines synthétisées à partir d'un même gène peuvent même avoir des fonctions antagonistes.

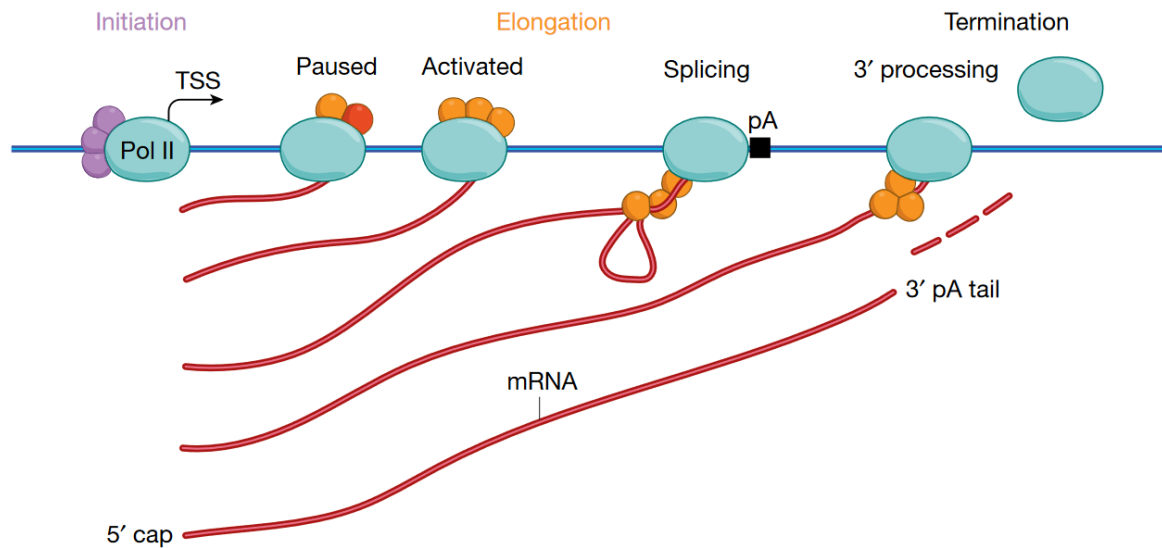


Figure 16: Quelques exemple de régulations transcriptionnelles, de l'initiation à la terminaison. Tiré de Cramer 2019.

2.1.1.2 – Régulations post-transcriptionnelles

La dégradation des ARNm a longtemps été perçue comme étant passive, à la manière d'un isotope radioactif se désintégrant, alors qu'en réalité il s'agit d'un processus actif indispensable à leur régulation. Moduler la durée de vie d'un ARN messager va en effet permettre de réguler la quantité maximale de protéines qui pourra en être synthétisée. Une protéine étant bien plus stable, ce niveau de régulation intermédiaire est primordial pour permettre une réponse adaptative rapide des cellules, et c'est en cela qu'il s'agit d'une étape très importante de la réponse cellulaire à un stress : en se dégradant, les ARN messagers limitent les conséquences fonctionnelles qu'auraient eues leurs protéines si elles avaient été synthétisées. La stabilité des ARNm peut être régulée de deux grandes façons : de façon traduction dépendante (TDD pour Translation Dependand Decay) ou non.

Chez les eucaryotes, il existe en effet plusieurs voies de surveillance des ARN messagers traduction-dépendantes permettant de les dégrader. Les principales répertoriées à ce jour sont le nonsense-mediated decay (NMD), le non-stop decay (NSD) et le no-go decay (NGD).

Le NMD permet principalement d'identifier les ARN messagers possédant des codons STOP prématures (PTC pour Premature Termination Codon). Ces codons peuvent apparaitre

de façon aberrante à cause de mutations, d'erreurs de transcription ou de l'épissage alternatif. Ce mécanisme peut également dégrader des transcrits « normaux » possédant un cadre de lecture ouvert (open reading frame, ORF) dans leur région 5' non traduite (5'UTR) ou une 3'UTR de grande taille (Kurosaki *et al.* 2019). En temps normal, les ribosomes décodent les ARN messagers jusqu'à ce qu'ils rencontrent un codon STOP, généralement situé dans le dernier exon, proche du site de polyadénylation où se lie la protéine PABPC1, qui favorise la terminaison de la traduction en recrutant d'autres facteurs (eRF1 et eRF3a) et libérant ainsi la chaîne peptidique formée (Ivanov *et al.* 2016).

Le NSD, comme son nom l'indique, intervient lorsqu'aucun codon stop n'a été rencontré par le ribosome et finit par atteindre l'extrémité 3' du transcrit, mais aussi les transcrits polyadénylés à tort dans leur région codante (Frischmeyer *et al.* 2002).

Le NGD permet la dégradation de transcrits sur lesquels les ribosomes sont « bloqués ». Ce blocage peut provenir de structures secondaires (motifs tige-boucle, séquences GC-riches), de bases nucléiques de l'ARN endommagées mais aussi de la présence de codons rares. Le ribosome ralenti peut ainsi être percuté par le ribosome suivant, créant des collisions de ribosomes. Dans le cas de la pause, le complexe Pelota-Hbs1 se lie au site A du ribosome laissé vide, et recrute une endonucléase qui va découper le transcrit au voisinage du ribosome pausé (Doma & Parker 2006). Concernant les collisions de ribosomes, il semblerait qu'aucun facteur externe ne soit nécessaire. Lorsque le ribosome en cours d'élongation percute le ribosome pausé en aval, un complexe est formé : un disome. Son élimination et la dégradation du transcrit passerait par l'ubiquitination de la sous-unité ribosomale RPS20 (Ikeuchi *et al.* 2019).

Ces trois voies de surveillance des ARN messagers sont schématisés ci-après (Figure 17).

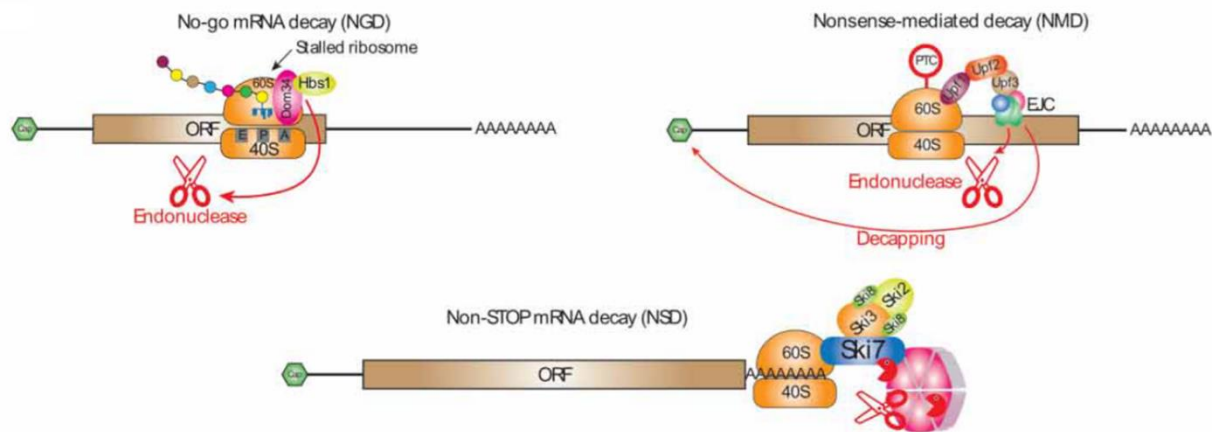


Figure 17: Pour les trois voies connues de surveillance des ARNm, la traduction est nécessaire pour signaler la dégradation des ARNm. Le NGD dégrade les ARNm qui provoquent le blocage du ribosome. Le NGD nécessite une interaction entre Dom34/Hbs1 (Pelota/Hbs1 chez les mammifères) et le site A du ribosome, ce qui entraîne un clivage endonucléolytique de l'ARNm. Le NSD se produit lorsque le ribosome ne rencontre jamais de codon de terminaison, et atteint plutôt l'extrémité 3' d'un transcrit. Le NSD implique des interactions entre le ribosome et Pelota(Dom34)/Hbs1 chez les mammifères, conduisant à la dégradation de l'ARNm par les activités exonucléolytiques et endonucléolytiques de l'exosome via le complexe Ski (Ski2/Mtr4 et Dis3). Le NMD dégrade les ARNm qui terminent leur traduction sur un PTC. Le NMD nécessite Upf1, qui interagit avec le facteur de libération eucaryote 3 (eRF3) sur le ribosome de terminaison, et implique également les partenaires de liaison d'Upf1, Upf2 et Upf3. On pense que les PTC déclenchent un événement de terminaison aberrant en raison de leur distance par rapport à l'extrémité 3' du transcrit, de la composition de la mRNP en aval du PTC, ou des deux. Tiré de Bicknell & Ricci 2017.

2.1.1.3 - Conclusions

Pour résumer, l'expression des gènes est une succession d'étapes allant de la transcription à la traduction, en passant par la dégradation des ARNm. Chacune de ces étapes peut être régulée, permettant aux cellules de modifier la quantité et la nature de leurs produits géniques en fonction des modifications de leur environnement et de leur milieu intracellulaire. C'est au travers de la régulation de l'expression des gènes que chaque cellule peut s'adapter, c'est-à-dire modifier son phénotype en fonction de son microenvironnement.

Cependant, les choses sont un peu plus complexes en réalité. En effet, la réponse cellulaire à des modifications du microenvironnement ne dépend généralement pas de la régulation d'un seul gène, mais de la corégulation d'un ensemble de gènes dont les produits contribuent collectivement à un phénotype cellulaire. Aussi, une question importante que l'on doit adresser est comment les cellules corégulent l'expression de ces « réseaux de gènes ». C'est dans ce contexte que l'on utilise souvent la métaphore de « programmes génétiques », qui comme nous allons le voir n'est pas satisfaisante.

2.1.2 – Programmes génétiques : une réalité ?

Lorsque l'on fait face à un problème complexe, on a souvent recours à des simplifications ou des métaphores qui s'approchent au plus près des résultats expérimentaux observés. Sur le long terme, ces métaphores finissent par faire partie du jargon du milieu et on en oublie presque leurs origines et qu'il s'agit d'hypothèses de travail, et non d'un modèle avéré. C'est notamment le cas en biologie, où la notion de « programme génétique » est utilisée à tout-va pour décrire comment fonctionne la régulation de l'expression génique (Nijhout 1990). Selon cette métaphore, les cellules seraient des machines préprogrammées, tels des ordinateurs, dont on pourrait prédire les « actions » si on en connaissait toutes les variables. Selon ce concept, la régulation de l'expression d'un ensemble de gènes serait sous la dépendance de « circuits génétiques » prédéfinis et programmés dans le génome. Cette vision des choses est réductionniste, dans le sens où selon elle il suffirait de connaître la nature et la fonction de chaque gène composant ces circuits génétiques pour expliquer la réponse cellulaire. Elle est également déterministe dans le sens où une modification (par exemple une perturbation environnementale) conduirait à une réponse cellulaire unique et stéréotypée, conséquence directe d'un programme génétique prédéfini (Nicholson 2019).

La naissance de cette métaphore remonte historiquement aux années 60, alors que Jacob et Monod découvraient le fonctionnement de l'opéron lactose (Jacob & Monod 1961). C'est également à cette époque que les premiers langages de programmation informatique modernes ont été conçus : la métaphore était toute trouvée. Cependant, les progrès technologiques réalisés ces dernières années ont généré de nombreuses données en contradiction avec le déterminisme et le réductionnisme de cette métaphore, déjà critiquée avant cela (Kupiec 2009).

Depuis et pendant des décennies de recherche, des connaissances sur les gènes, leurs fonctions et leurs places au sein de voies métaboliques ont été accumulées et ont permis de façon indéniable de mieux comprendre les réponses cellulaires à des événements externes. Mais force est de constater que plus ces voies de signalisation sont décortiquées, et plus elles se montrent complexes et ne suffisent plus à expliquer l'ensemble des observations. Cela est

notamment dû au fait que chaque protéine impliquée dans une voie de signalisation peut avoir de multiples effets et sur de multiples cibles, et que ces effets dépendent du contexte et des interconnexions entre les voies de signalisation. En somme, l'étude « gène par gène » des voies de signalisation s'est montrée très efficace pour déduire des « grandes règles » de réponses cellulaires, mais aujourd'hui on se rend bien compte qu'il est vain d'essayer de réduire la réponse cellulaire à la somme des actions des gènes/protéines qui y participent.

Grâce aux avancées technologiques de ces dernières années en termes d'analyses - omiques en cellule unique, de nombreuses données remettent également en question le côté déterministe de la métaphore de « programmes génétiques ». En effet, en analysant le contenu en ARN de cellules uniques isogéniques en réponse à un stress environnemental, on s'est rendu compte que chaque cellule répondait de façon unique, bien que possédant le même génome (Tang *et al.* 2009). Cette observation entre en contradiction avec l'idée selon laquelle les cellules s'adaptent à un stress de façon graduelle, standardisée et uniforme, et toutes de la même façon, à la manière d'un programme informatique qui reproduirait toujours les mêmes résultats en effectuant toujours les mêmes tâches dans les mêmes conditions (Figure 18 A). En réalité, on observe une réponse stochastique et probabiliste différente pour chaque cellule (Figure 18 B) et c'est logique, puisqu'à l'échelle des molécules, le déterminisme ne peut exister.

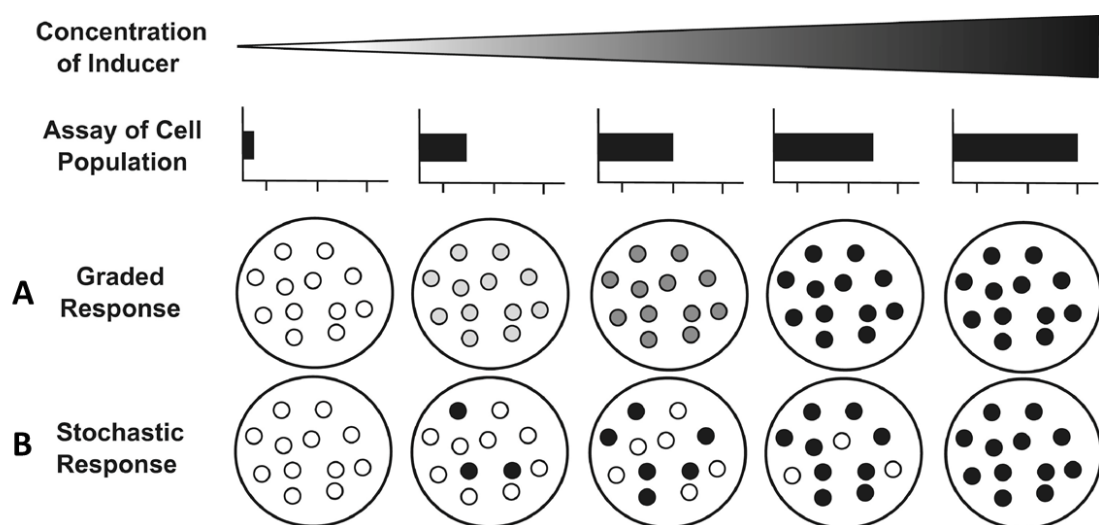


Figure 18: Une même réponse observée à l'échelle d'une population de cellule peut avoir des origines différentes. A : toutes les cellules répondent de la même façon et apportent une réponse proportionnelle à la concentration de la thérapie. B : Chaque cellule répond indépendamment à la thérapie, et le nombre de cellules y répondant augmente avec sa concentration. Tiré de Nicholson 2019.

En effet, les interactions moléculaires ne sont pas déterminées à l'avance, mais dépendent de lois physiques probabilistes, puisqu'elles dépendent de la probabilité de rencontre des molécules, et donc de leurs trajectoires. Cette probabilité est « simplement » affectée par la concentration desdites molécules. Par exemple, la régulation transcriptionnelle d'un gène va dépendre des probabilités de méthylation de son promoteur et des histones environnantes, de rencontre d'un facteur de transcription, du recrutement de l'ARN polymérase et de la probabilité de fixation de facteurs d'épissage. De même, sa traduction dépendra de façon probabiliste de sa stabilité et donc de la présence de ribosomes, de tRNA chargés en acides aminés.

Pour résumer, il est important de retenir que la régulation de l'expression des gènes ne repose pas sur un programme génétique déterministe, mais sur des lois physiques probabilistes desquelles dépendent la rencontre et l'interaction des molécules. Si cette métaphore de « programmes génétiques » doit être mise de côté, il reste encore à déterminer comment « s'orchestre » la régulation génétique. Comme nous allons le voir, le lien entre le métabolisme et l'expression des gènes semble être une piste de réflexion intéressante.

2.2 – Métabolisme cellulaire et expression des gènes

2.2.1 – Métabolisme cellulaire et expression des gènes ?

On sait depuis longtemps que le métabolisme et l'expression des gènes sont liés. Lorsque Jacob et Monod étudient le fonctionnement de l'opéron lactose dans les années 60, c'est exactement cela qu'ils ont découvert : lorsque des bactéries sont cultivées dans un milieu sans lactose, elles ne produisent pas les enzymes capables de le métaboliser. Si on ajoute du lactose au milieu (perturbation environnementale), la synthèse de ces enzymes augmente rapidement (moins de deux minutes), permettant une adaptation très rapide des bactéries à leur milieu. Trois gènes codent en effet pour ces enzymes et sont regroupées sur une portion d'ADN : l'opéron lactose. Il est d'ordinaire réprimé transcriptionnellement par la fixation d'un répresseur au niveau de sa région promotrice, synthétisé de manière constitutive par un autre

gène. Mais ce répresseur se lie également au lactose et en sa présence, n'est plus capable d'inhiber efficacement la transcription de l'opéron. Ainsi, un métabolite est capable déréguler l'expression de gènes (Figure 19).

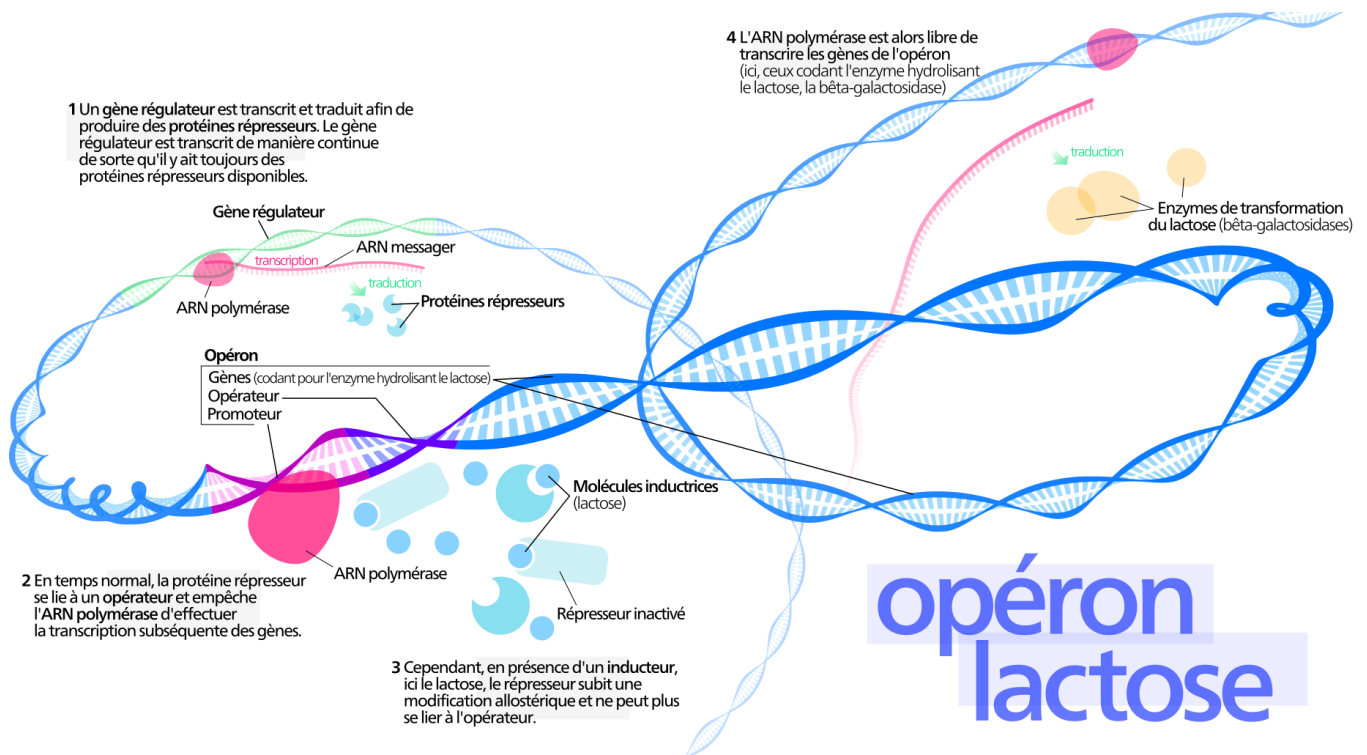


Figure 19: Schéma explicatif du mode de fonctionnement simplifié de l'opéron lactose. Auteur : Hawk-Eye.

Dans la continuité de ces travaux, les biologistes ont étudié les liens entre le métabolisme et la régulation de l'expression des gènes, en essayant tant bien que mal de décortiquer les réseaux de gènes ou voies de signalisation y étant impliqués. Par exemple, on estime qu'il existerait des senseurs capables de détecter la présence de certains métabolites (comme les acides aminés) et qui, via des voies de signalisation complexes, réguleraient par des réactions en cascade l'activation de gènes, de façon transcriptionnelle et post-transcriptionnelle, en particulier au niveau de la traduction.

C'est le cas par exemple pour mTOR, au cœur de la « reprogrammation » métabolique des cellules cancéreuses. mTOR contrôle la croissance des cellules en régulant les métabolismes des acides aminés, du glucose, des nucléotides et des lipides, ainsi que la biogénèse des ribosomes, tout en inhibant l'autophagie. mTOR fait partie de deux complexes structurellement et fonctionnellement distincts : mTORC1 et mTORC2. De façon intéressante,

l'activation de mTORC1 est dépendante de la présence de nutriments dans le cytoplasme cellulaire. En effet, ce dernier s'active par translocation vers des membranes lysosomales, par sa mise en contact avec le facteur de croissance RHEB (Long *et al.* 2005). De façon intéressante, cette translocation est régulée par la présence d'acides aminés et la leucine, l'arginine et la glutamine seraient ceux qui y participent le plus (González & Hall 2017). La glutamine sert de donneur de carbone et d'azote pour la synthèse d'autres acides aminés, lipides et nucléotides, et est utilisée par les cellules cancéreuses pour alimenter le cycle de Krebs (Yang *et al.* 2017) et il s'avère que mTOR régule également la glutaminolyse puisque mTORC1 régule positivement GLS (qui transforme la glutamine en glutamate), tandis que mTORC2 inhibe l'expression de la glutamine synthase (GS, qui transforme le glutamate en glutamine, Mossmann *et al.* 2018, Figure 20). En somme, le métabolisme peut réguler la régulation de l'expression génique et vice-versa.

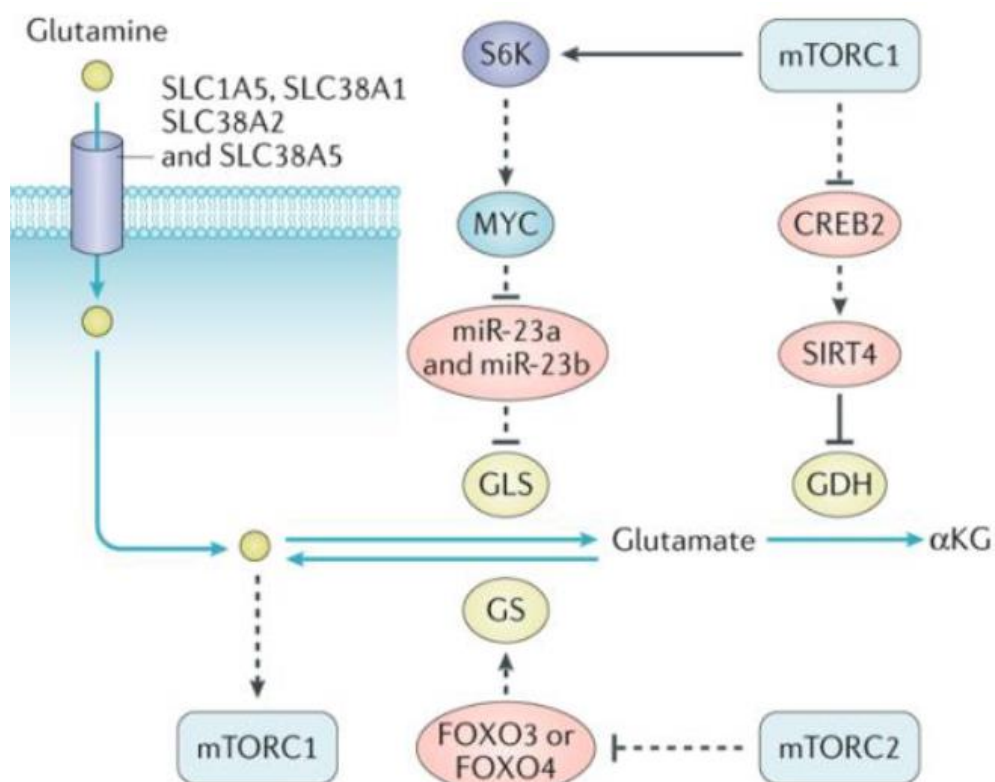


Figure 20: Le métabolisme de la glutamine. SLC1A5, SLC38A1, SLC38A2 et SLC38A5 assurent l'importation de la glutamine. La glutamine, qui contribue à l'activation du complexe mTORC1, est convertie en glutamate et en α -kétoglutarate (α KG) par la glutaminase (GLS) et la glutamate déshydrogénase (GDH). mTORC1 phosphoryle et active ainsi la protéine ribosomale S6 kinase (S6K). S6K favorise la traduction de MYC, qui déréprime GLS en inhibant miR-23a et miR-23b. mTORC1 induit également la dégradation dépendante du protéasome de cAMP-responsive element binding 2 (CREB2), un facteur de transcription qui induit l'expression de la sirtuine 4 (SIRT4). SIRT4 inhibe la GDH par ribosylation de l'ADP. La glutamine synthétase (GS) convertit le glutamate en glutamine. L'expression de la GS est favorisée par FOXO3 et/ou FOXO4, qui sont potentiellement sous le contrôle négatif de mTORC2. Tiré de Mossmann *et al.* 2018

Les liens entre métabolisme et expression génique sont en réalité fondamentalement plus directs que les réseaux d'interactions complexes qui sont principalement décrits aujourd'hui, et pour deux raisons évidentes. La première, c'est que les produits géniques (ARN et protéines) ne peuvent être synthétisés que si les briques de base qui les composent (acides nucléiques et acides aminés) sont présents dans la cellule. Or, ces briques élémentaires sont des produits directs du métabolisme. D'autre part, les gènes (ADN) et les produits géniques (ARN et protéines) subissent constamment des modifications chimiques (méthylation, phosphorylation, acétylation,...) qui modifient leurs propriétés en passant par l'ajout de petits groupements chimiques (groupements méthyl, phosphate, acétyl,...) dont la production est étroitement liée aux activités métaboliques. Ces modifications sont primordiales dans la régulation de l'expression des gènes, puisqu'elles peuvent changer radicalement les propriétés physico-chimiques et les activités biologiques des molécules concernées, par exemple en modifiant leurs affinités avec d'autres interactants moléculaires.

Regardons à présent plus précisément et à différents niveaux ce lien direct entre métabolisme cellulaire et régulation de l'expression génique, sous l'angle de la progression tumorale et de la résistance aux thérapies anti-cancéreuses.

2.2.2 – Métabolisme cellulaire et épigénétique

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, les modifications post-traductionnelles des histones (méthylation, acétylation), qu'elles soient transmises d'une génération cellulaire à l'autre ou pas, consistent en l'ajout de groupements chimiques (méthyl, acétyl) sur certains acides aminés (résidus) de leurs chaînes peptidiques. L'ajout de telles modifications nécessite d'une part leur biodisponibilité, mais aussi l'action des enzymes catalysant ces réactions. D'autres métabolites comme l'acétyl-CoA, la S-adenosylmethionine (SAM) ou encore l'adénosine triphosphate (ATP) ont également été identifiés comme étant les substrats principaux ou des co-facteurs de ces enzymes (Gapa *et al.* 2022). Il faut garder à l'esprit la dimension stochastique et probabiliste de ces réactions, et donc que pas une seule cellule ne présentera un profil épigénétique similaire. L'état métabolique des cellules joue donc directement sur leur profil épigénétique (et donc transcriptionnel) et de nombreuses

études récentes avancent que les perturbations métaboliques pourraient être à la racine de l'émergence des cellules cancéreuses (Izzo *et al.* 2021; Gapa *et al.* 2022). Autrement dit, les plasticités métabolique et épigénétique des cellules cancéreuses en réponse à des thérapies décrites dans la partie précédente seraient les deux faces d'une même pièce : indissociables et indispensables l'une à l'autre (Figure 21).

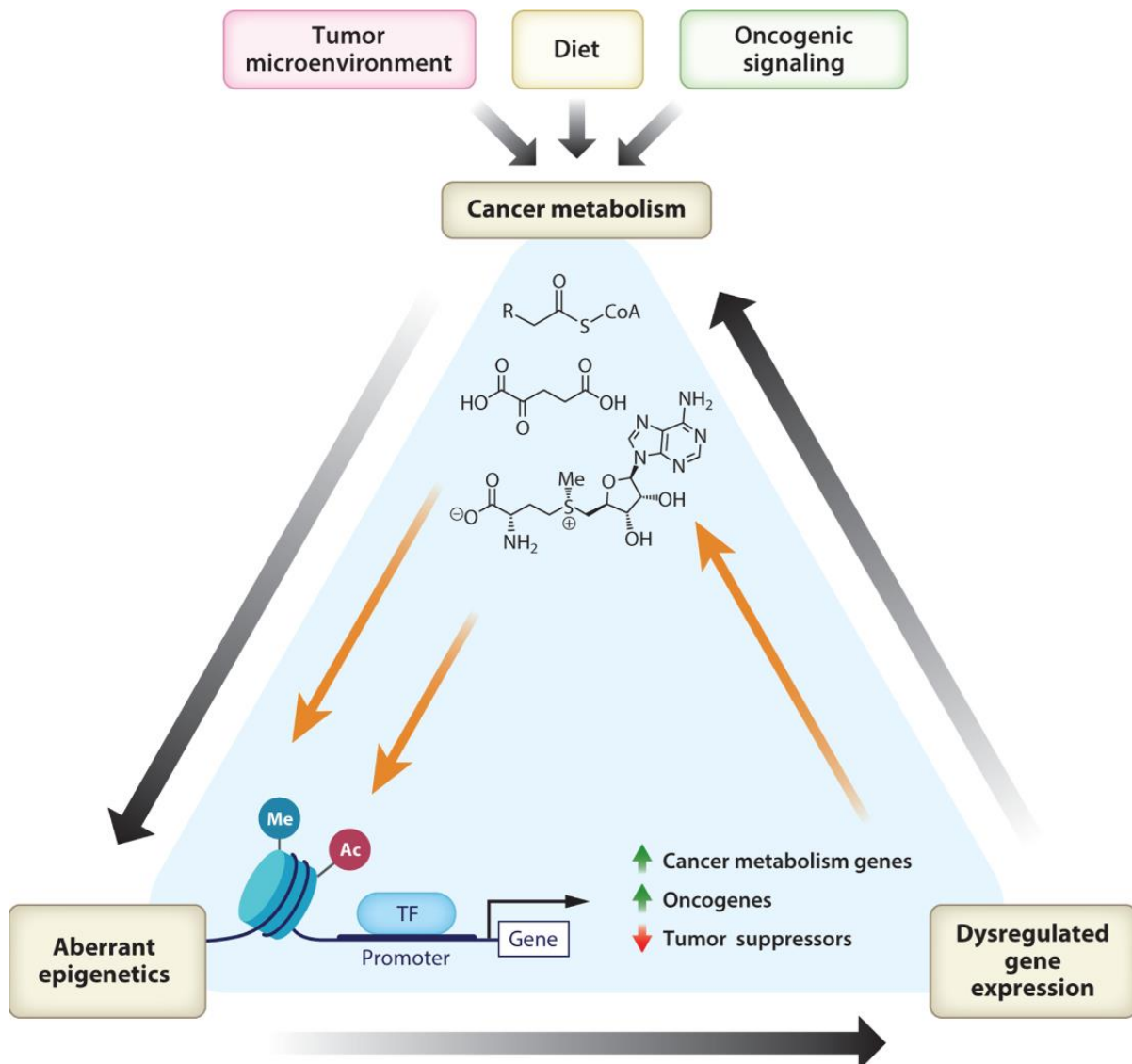


Figure 21: Les reprogrammations métaboliques et épigénétiques des cellules cancéreuses exercent une régulation réciproque l'une sur l'autre. Le microenvironnement tumoral, la signalisation oncogénique et le métabolisme influencent chacun la disponibilité des métabolites utilisés par les enzymes épigénétiques. Les caractéristiques épigénétiques des tumeurs peuvent réciproquement entraîner des changements dans l'expression des gènes qui ont un impact sur le métabolisme du cancer. Ac, acétylation ; Me, méthylation ; TF, facteur de transcription. Tiré de Izzo *et al.* 2021.

2.2.3 – Métabolisme cellulaire, traduction et TDD

2.2.3.1 – Traduction, codons et tRNA

Deux étapes majeures de la régulation de l'expression génique sont la régulation de la stabilité des transcrits ainsi que celle de leur traduction par les ribosomes. Comme nous l'avons évoqué précédemment, ces deux phénomènes sont en partie liés puisque la dégradation des ARN messagers peut être régulée de façon traduction dépendante (Translation-Dependant Decay, ou TDD). Nous allons à présent voir que l'efficacité de la traduction (et par conséquent le TDD) est dépendante de l'état métabolique des cellules.

L'information génétique stable contenue dans l'ADN et transcrite de façon temporaire en ARN messenger est contenue sous la forme de quatre bases nucléiques. Regroupées en triplets, elles forment 4^3 soit 64 combinaisons différentes : les codons. 61 d'entre eux codent pour les 20 acides aminés standards, alors que les 3 derniers sont des signaux de fin de traduction (codons STOP). Il y a donc plus de codons que d'acides aminés encodés : c'est la dégénérescence du code génétique. Par exemple la méthionine et le tryptophane sont encodés par un seul codon (respectivement AUG et UGG), tandis que les autres acides aminés sont encodés de façon redondante par 2 à 6 codons dits synonymes (Figure 22).

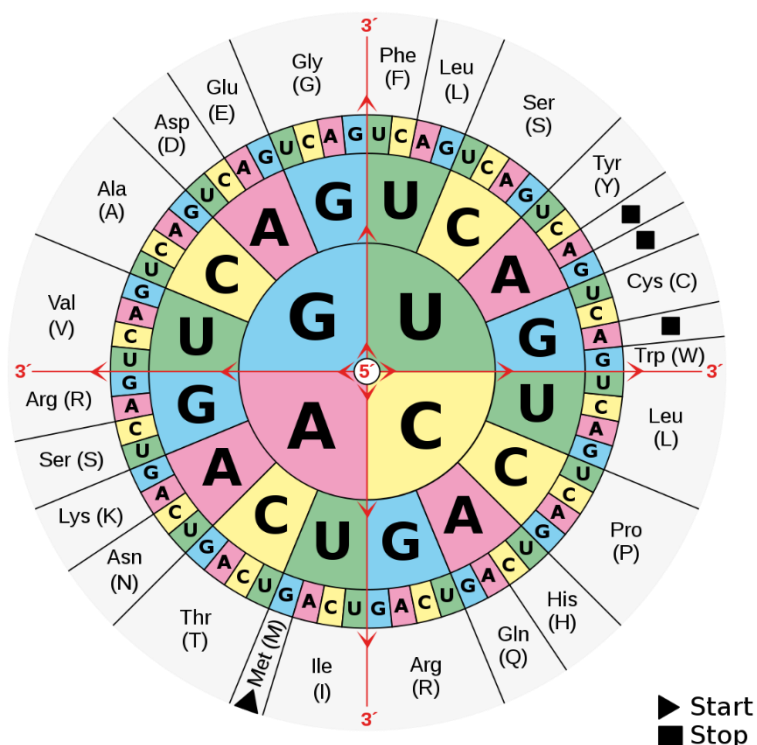


Figure 22: Table des codons. By Mouagip

Lors de la traduction, les codons sont « reconnus » par des anti-codons présents dans les séquences de tRNA. Ces derniers sont chargés avec l'acide aminé correspondant au codon complémentaire, et des tRNA possédant le même anticodon mais qui diffèrent dans le reste de leur séquence sont dits iso-accepteurs.

Une fois leur maturation complète, les ARN messagers sont exportés dans le cytoplasme, et leur coiffe 5' et leur queue polyA servent de plateformes de recrutement pour des protéines régulant leur stabilité et leur traduction. L'initiation de la traduction se fait par l'interaction de cette coiffe avec le complexe eIF4F, qui va par la suite interagir avec la queue polyA du transcrit via la protéine PABP qui porte bien son nom (polyA binding protein), ce qui a pour effet de stabiliser l'interaction coiffe/eIF4F et facilite ainsi le recrutement des ribosomes (Wei *et al.* 1998, Figure 23).

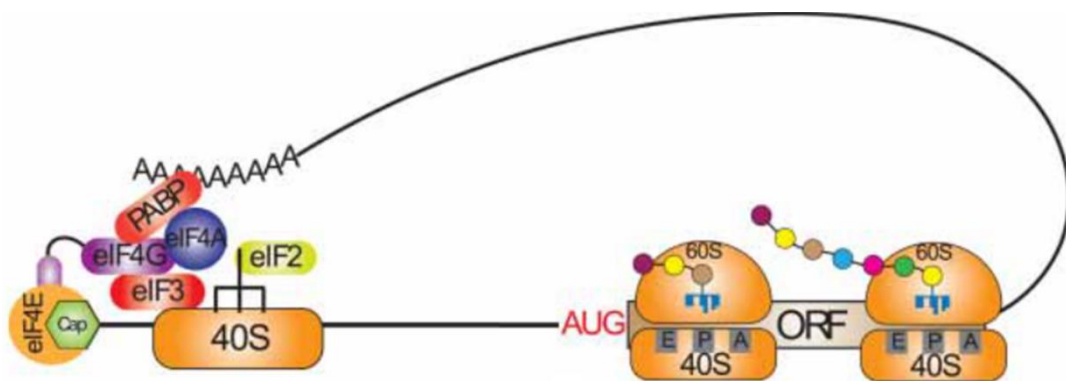


Figure 23: Schéma de l'initiation coiffe-dépendante de la traduction chez les eucaryotes. Elle requiert la liaison entre la coiffe 5' et eIF4F. eIF4F comprend eIF4E, qui se lie à la coiffe, eIF4G, qui se lie à eIF4E et agit comme un échafaudage, et eIF4A, qui déroule la structure secondaire dans la 5'-UTR. Tiré de Bicknell & Ricci 2017.

Après cette étape, la sous-unité ribosomale va migrer le long de la 5'-UTR jusqu'à rencontrer un codon START (AUG) favorable, marquant le début d'une ORF. Le contexte nucléotidique de ce codon initiateur est en effet très important et est déterminant pour l'efficacité de la traduction. Le contexte optimal serait la séquence suivante : RCCAUGG (séquence Kozak), dans laquelle une purine 3 nucléotides en amont et une guanine 4 nucléotides en aval de l'adénine du codon AUG sont les plus influentes (Kozak 1991).

Ensuite, les ribosomes se déplacent le long de la molécule d'ARNm pour la traduire, codon par codon, en suivant des cycles en 3 étapes : c'est l'élongation. La première étape du cycle d'élongation est le décodage : un tRNA chargé de son acide aminé est délivré au niveau du site A du ribosome. Cette étape est rapidement suivie par le transfert irréversible du groupe peptidyl du site P vers le tRNA chargé du site A. Enfin, lors de la translocation, l'ARN messager se « déplace » et le site A est libéré, pour laisser place au cycle suivant et au décodage du codon suivant (Shoji *et al.* 2009, Figure 24). En moyenne (et j'insiste sur ce terme, c'est très important), on considère qu'un ribosome est capable d'allonger une chaîne peptidique de 200 acides aminés par minute. Les ribosomes stabilisent les ARN messagers lorsqu'ils les traduisent, mais nous avons également vu précédemment qu'ils pouvaient induire leur dégradation selon leur état dynamique.

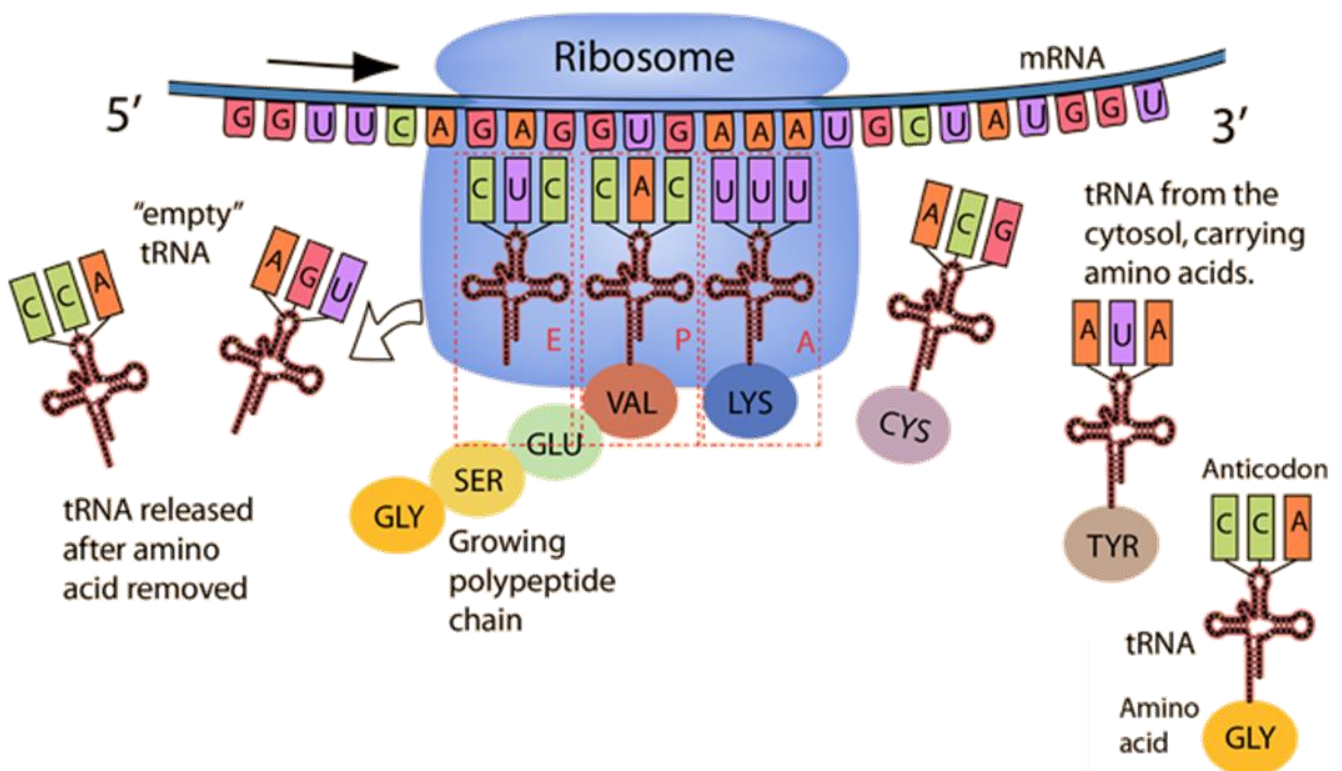


Figure 24: Schéma illustrant le cycle d'élongation du ribosome lors de la traduction. L'acide aminé allant s'ajouter à la chaîne peptidique en cours de formation est apporté par un tRNA qui va décoder de façon spécifique le codon se trouvant dans le site A du ribosome. Vient ensuite l'étape de translocation au cours de laquelle l'ARNm se « décale » d'un codon avant d'entamer le cycle suivant. By R Nave.

Il existe donc une compétition entre ces deux phénomènes, ce qui permet une régulation directe de la synthèse protéique via l'efficacité de traduction des ARN messagers. Par exemple, si les ribosomes commencent à « manquer » de certains tRNA chargés pour poursuivre efficacement leur élongation, les ribosomes vont ralentir et pauser sur les régions possédant des codons correspondant à ces acides aminés, entraînant la dégradation de ces ARN messagers.

2.2.3.2 – Optimalité des codons, traduction et TDD

Il a été observé que les codons synonymes ne sont pas utilisés de façon égale, certains étant privilégiés au détriment d'autres. Ce phénomène de biais d'usage de codon (codon usage bias, CUB) diffère selon les espèces, mais également au sein d'une même cellule, entre ses différents gènes, et même au sein d'un même gène on peut se rendre compte que l'utilisation d'un codon particulier peut être concentrée en un endroit précis. De façon intéressante, il a été observé chez de nombreuses espèces que les concentrations en tRNA corrélaient avec la proportion de leurs codons respectifs au sein des ARN messagers : plus un codon est rare et plus la concentration de ses tRNA correspondants est faible (et inversement) (Moriyama & Powell 1997).

Par ailleurs, il a également été observé que de manière générale, les codons les plus rares sont ceux dont les triplets de nucléotides se terminent par A ou U (codons AU3), tandis que les plus communs se terminent par G ou C (codons GC3). Aussi, les codons AU3 ont une interaction plus faible avec les anticodons de leurs tRNA, en comparaison aux codons GC3. Pour finir, il a été montré que les ARNm riches en codons GC3 étaient plus stables et plus efficacement traduits que les ARNm riches en codons AU3 (Hia *et al.* 2019). Pour résumer : les codons optimaux correspondent aux codons décodés rapidement par les ribosomes, permettant ainsi un déplacement rapide de ces derniers et une stabilisation de l'ARN messenger. Pour les codons non-optimaux, c'est l'inverse : leur décodage est lent et le ralentissement des ribosomes peut induire la dégradation des ARN messagers (Presnyak *et al.* 2015). De façon attendue, il a été montré chez diverses espèces que les protéines les plus exprimées (présentes le plus abondamment) étaient codées par les ARNm les plus stables et

les plus riches en codons optimaux, à l'inverse des protéines les moins exprimées, riches en codons non-optimaux (Frumkin *et al.* 2018).

Il est également important de noter que plus de 400 gènes codent pour des tRNA chez l'espèce humaine, mais qu'ils ne représentent que 46 iso-accepteurs différents. Ainsi, pour certains codons, il n'existe pas de tRNA possédant un anti-codon strictement complémentaire. En effet, dans la majorité des cas, les deux premiers nucléotides d'un codon sont suffisants pour déterminer l'acide aminé correspondant (Figure 22). Aussi, les anticodons sont capables de s'apparier à certains codons de façon imparfaite aux codons se terminant par G ou U (codons GU3) : on parle de wobble base pairing et grâce à ce mécanisme, 8 autres codons sont capables d'être décodés (Figure 25, Chan & Lowe 2016). Les 7 derniers codons parviennent à être décodés grâce à des modifications chimiques apportées sur les tRNA. En effet, certaines enzymes sont capables d'engendrer sur le tRNA la modification du nucléotide s'appariant avec le 3ème nucléotide d'un codon (wobble base, position 34 sur le tRNA). Par exemple, ADAT2/3 peut changer une adénine (A) en une inosine (I) (modification A34I) et le nouvel anticodon ainsi formé peut s'apparier à de nouveaux codons (Figure 25, Gillen *et al.* 2021).

Cognate				
AA	anticodon:codon			
S	AGU:UCA	UCG:AGC	AGC:UCG	AGA:UCU
G	CCU:GGA	CCG:GGC	CCC:GGG	
I	UAU:AUA	UAG:AUC		UAA:AUU
R	UCU:AGA		UCC:AGG	GCA:CGU
	GCU:CGA		GCC:CGG	
L	GAU:CUA		GAC:CUG	GAA:CUU
	AAU:UUA		AAC:UUG	
T	UGU:ACA		UGC:ACG	UGA:ACU
P	GGU:CCA		GGC:CCG	GGA:CCU
A	CGU:GCA		CGC:GCG	CGA:GCU
V	CAU:GUA		CAC:GUG	CAA:GUU
K	UUU:AAA		UUC:AAG	
Q	GUU:CAA		GUC:CAG	
E	CUU:GAA		CUC:GAG	
N		UUG:AAC		
H		GUG:CAC		
D		CUG:GAC		
Y		AUG:UAC		
C		ACG:UGC		
F		AAG:UUC		
W			ACC:UGG	
M			UAC:AUG	

Wobble		
AA	anticodon:codon	
S	AGU:UCG	UCG:AGU
G	CCU:GGG	CCG:GGU
R	UCU:AGG	
	GCU:CGG	
L	GAU:CUG	
	AAU:UUG	
T	UGU:ACG	
P	GGU:CCG	
A	CGU:GCG	
V	CAU:GUG	
K	UUU:AAG	
Q	GUU:CAG	
E	CUU:GAG	
N		UUG:AAU
H		GUG:CAU
D		CUG:GAU
Y		AUG:UAU
C		ACG:UGU
F		AAG:UUU

A34I	
AA	anticodon:codon
S	AGI:UCC>UCU>UCA
I	UAI:AUC>AUU>AUA
R	GCI:CGC>CGU>CGA
L	GAI:CUC>CUU>CUA
T	UGI:ACC>ACU>ACA
P	GGI:CCC>CCU>CCA
A	CGI:GCC>GCU>GCA
V	CAI:GUC>GUU>GUA

Figure 25: Les différents types d'appariements anticodon:codon chez l'Homme. Tiré de Gillen *et al.* 2021

Il existe d'autres modifications apportées sur la 34^{ième} base des tRNA. Par exemple, la thiolation de ces uridines (S²U34) réalisée par CTU1/2 est importante pour l'appariement avec les codons AAA (lysine), CAA (glutamine) et GAA (glutamate) (Dewez *et al.* 2008). De façon très intéressante, il s'avère que les ARNm impliqués dans l'initiation tumorale, l'invasion et la résistance aux thérapies sont enrichis en ces codons. Par exemple dans un modèle de mélanome BRAF^{V600E}, le blocage de ce mécanisme permet de re-sensibiliser des cellules résistantes à des inhibiteurs de BRAF (Rapino *et al.* 2018). Ainsi, ces types de modifications permettent d'augmenter rapidement la synthèse protéique d'une sous-population d'ARNm enrichis en ces codons sans pour autant en augmenter la transcription. Il est également important de remarquer que, tout comme les modifications épigénétiques de l'ADN, ces modifications « épitranscriptomiques » des ARNt dépend directement du métabolisme cellulaire, puisqu'elles proviennent de l'ajout de groupements chimiques et de métabolites.

Il existe un dernier paramètre régissant le principe d'optimalité des codons, et c'est tout simplement la biodisponibilité (ou concentration) en ARNt chargés en acides aminés. Cette biodisponibilité dépend comme nous venons de le voir de l'expression et des modifications des ARNt, mais aussi de l'expression des enzymes catalysant le chargement des acides aminés sur leurs ARNt (appelées aminoacyl transférases ou tRNA synthétases) et de la biodisponibilité des acides aminés eux-mêmes. En ce qui concerne les aminoacyl transférases, il a été montré qu'elles pouvaient réguler l'optimalité des codons dans des contextes de progression tumorale par exemple (Passarelli *et al.* 2022).

Mais ce qui nous intéresse le plus, c'est le lien entre la biodisponibilité des acides aminés et la traduction/dégradation des ARN messagers. En effet, comme on pouvait s'y attendre, il a été montré que lorsqu'on diminuait la biodisponibilité d'un acide aminé X dans des cellules (en les cultivant dans un milieu ne contenant pas l'acide aminé X par exemple), on retrouve statistiquement plus de ribosomes en cours de traduction sur les codons codant pour l'acide aminé X, indiquant leur ralentissement voire leur pause sur ces derniers. Ce phénomène a été observé pour l'arginine et la leucine (Darnell *et al.* 2018), mais aussi pour l'histidine, l'asparagine, la glutamine, la proline et la sérine (Loayza-Puch *et al.* 2016, 2017; Wu

et al. 2019; Banh *et al.* 2020). Pour aller plus loin, il a été montré que dans un contexte de privation de glutamine, les ARNm les plus touchés étaient ceux qui possédaient des enchainements de codons glutamine dans leurs séquences (polyQ tracts, Pavlova *et al.* 2020). De ces pauses découlent la régulation de l'expression des gènes concernés, et cela a des conséquences physiologiques pour la cellule. Par exemple, diminuer la biodisponibilité de valine peut limiter la production de protéines mitochondriales riches en valine, et ainsi ralentir la progression tumorale (Thandapani *et al.* 2022).

A l'inverse, augmenter la biodisponibilité d'un acide aminé peut faciliter la traduction des ARNm riches en codons codant pour cet acide aminé. Par exemple, la stimulation de la biodisponibilité en proline dans divers contextes physiopathologiques permet la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène et les SPRR (small proline-rich protein), riches en proline (Shen *et al.* 2022; Kay *et al.* 2022).

2.2.3.3 - Conclusion

L'impact de l'optimalité des codons sur l'expression génique est loin d'être négligeable. En effet, des études utilisant des gènes rapporteurs codant pour des chaînes peptidiques identiques mais encodées par des substitutions de codons synonymes montrent bel et bien à quel point la demi-vie et donc la synthèse protéique d'un ARN messager est impactée par son contenu en codons (Radhakrishnan *et al.* 2016; Darnell *et al.* 2018).

L'ensemble de ces mécanismes contribue à ce que l'on appelle la dégradation des ARN messagers en lien avec l'optimalité des codons (COMD en anglais pour codon optimality-mediated mRNA decay). Ces pauses induisent des changements de conformation uniques du ribosome, qui peuvent être détectés et analysés expérimentalement (Wu *et al.* 2019). Cette conformation particulière semble être « détectée » par des enzymes des complexes de déadénylation et de décoiffage de l'ARNm, conduisant à leur dégradation, mais ce mécanisme n'a pas encore été totalement élucidé (Bae & Coller 2022).

Pour résumer, l'optimalité des codons est dépendante d'une part de la biodisponibilité en ARNt chargés (ce qui englobe la synthèse des tRNA, la disponibilité en acides aminés et leur chargement sur les ARNt catalysé par les aminoacyl transférases) et de leur efficacité d'appariement lors de la traduction (Figure 26).

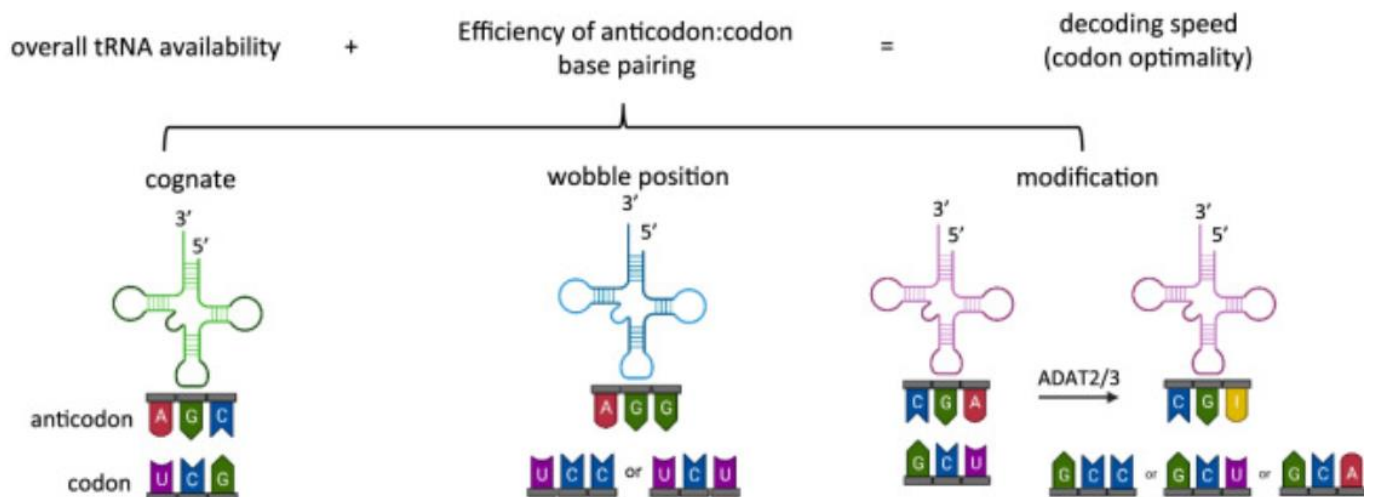


Figure 26: L'optimalité des codons est déterminée par la biodisponibilité en ARNt chargés et de l'efficacité de l'appariement anticodon:codon, elle-même dépendante de modifications des ARNt. Tiré de Gillen et al. 2021.

Ainsi ces données montrent comment des modifications du métabolisme, en particulier celui des acides aminés, peut impacter la nature des protéines exprimées par une cellule (Kay et al. 2021). Ce lien entre métabolisme et expression génique est sélectif dans le sens où certains ARN messagers contenant certains types de codons correspondant à certains acides aminés ont une plus grande probabilité d'être affectés dans différentes situations physiopathologiques. En effet, il faut garder à l'esprit que toutes ces étapes et réactions que nous venons de décrire se déroulent (ou n'ont pas lieu) de façon probabiliste.

2.2.4 – Vers une vision intégrée des différentes activités cellulaires

Le lien entre métabolisme et la régulation de l'expression des gènes est souvent décrit au travers de voies de signalisation complexes dans lesquelles des « capteurs » détectent les niveaux de concentration de métabolites. Selon ce modèle, lors d'une perturbation physiologique, ces voies de signalisation s'activeraient en cascade, aboutissant à la modification de l'expression des gènes permettant le retour à une situation d'équilibre des

paramètres physicochimiques de la cellule. Cette adaptabilité cellulaire serait programmée, dans le sens où les réseaux de gènes constituant ces voies de signalisation seraient des « programmes génétiques » (Figure 27 A).

Cependant, les recherches menées ces dernières années grâce aux avancées technologiques (cellule unique en particulier) ont permis de mettre en évidence un lien beaucoup plus direct entre la régulation de l'expression des gènes et le métabolisme des cellules. Dans ce modèle, une perturbation physiologique provoque la variation des concentrations cellulaires de métabolites et/ou de produits métaboliques (comme les acides aminés). Ces métabolites impactent directement et de façon sélective l'expression des gènes, au travers de leurs effets sur les modifications biochimiques de l'ADN ou sur la traductibilité et la stabilité des ARN messagers, qui peuvent en retour modifier l'état métabolique des cellules, formant ainsi des boucles de rétroaction permettant de retrouver une homéostasie cellulaire dans cet environnement modifié (Figure 27 B).

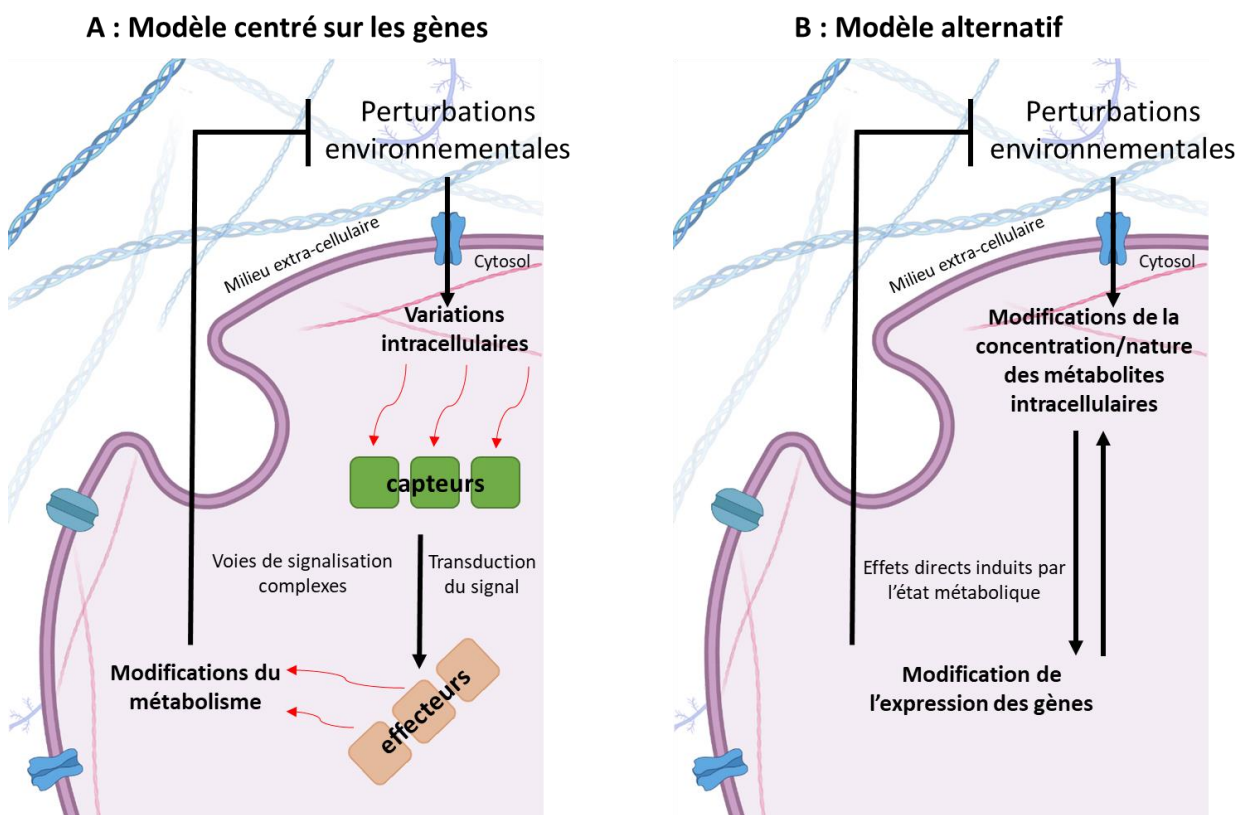


Figure 27: Schématisation de l'adaptation métabolique d'une cellule à une perturbation environnementale. A : selon un modèle centré sur les gènes, ces variations environnementales seraient captées par des senseurs qui transduiraient ce signal à des effecteurs qui à leur tour modifient le métabolisme cellulaire, via des réactions en cascade complexes. B : un modèle alternatif serait que les perturbations intracellulaires causées par les perturbations environnementales agissent directement sur l'expression des gènes et permettent une adaptation directe du métabolisme.

2.2.5 - Conclusion

Un intérêt croissant est porté aux liens directs entre le métabolisme et l'expression des gènes. La compréhension de ces liens pourrait être particulièrement importante pour notre compréhension de ce que l'on nomme la « plasticité des cellules cancéreuses » englobant à la fois la progression tumorale et la résistance aux thérapies anticancéreuses. En effet, nous observons que la progression tumorale et la résistance aux thérapies anticancéreuses s'accompagnent à la fois de modifications du métabolisme cellulaire, mais aussi de celles de l'expression génique dont dépend le phénotype cellulaire.

Le modèle présenté précédemment dans lequel le métabolisme et la régulation de l'expression des gènes sont intimement liés et interdépendants pourrait nous aider à mieux comprendre la plasticité des cellules cancéreuses. En effet, toute variation du milieu extracellulaire (y compris l'exposition à des thérapies anticancéreuses) pourrait se manifester par des modifications biochimiques, c'est-à-dire des modifications de l'état métabolique des cellules ayant un impact direct sur l'expression génique pour permettre de retrouver l'homéostasie cellulaire.

Partie 3 : Objectifs

En utilisant un modèle de cellules cancéreuses de mélanome exposées à une thérapie anticancéreuse ciblant des protéines de la voie des MAPK kinases, l'objectif de ma thèse a été d'étudier la réponse cellulaire à cette thérapie afin d'essayer de mettre à jour l'interconnexion entre le métabolisme, la régulation de l'expression des gènes et le phénotype cellulaire. Pour cela je me suis focalisé sur le niveau d'expression des ARN messagers et de leur traduction.

J'ai observé que l'exposition des cellules cancéreuses à des inhibiteurs de la voie MAPK s'accompagne de la baisse de la biodisponibilité intracellulaire d'acides aminés comme l'aspartate et le glutamate, menant à des conséquences sur la stabilité et la traduction d'ARNm codant pour des protéines enrichies en ces acides aminés. De façon intéressante, j'ai observé qu'en général, les protéines enrichies en ces acides aminés sont impliquées dans la prolifération cellulaire et/ou la réparation de l'ADN. En conséquence, nous proposons un modèle selon lequel la baisse de biodisponibilité d'acides aminés comme l'aspartate et le glutamate se traduit par une baisse de la synthèse de protéines de ces fonctions moléculaires. La baisse du niveau d'expression de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire participe à la réponse cellulaire « attendue » par la thérapie, mais d'un autre côté, la baisse de l'expression de protéines de la réparation de l'ADN par ce même mécanisme pourrait quant à elle favoriser une instabilité génétique de ces cellules, si elles parvenaient à se répliquer. Cette instabilité génétique, conséquence du métabolisme cellulaire altéré, pourrait alors augmenter la probabilité qu'apparaissent des clones génétiquement modifiés et résistant à la thérapie.

Ces conclusions et hypothèses sont discutées avec des propositions d'expériences qui permettront de les confirmer ou au contraire de les réfuter.

Partie 4 : Résultats (article scientifique)

Metabolism-dependent secondary effects of anti-MAPK cancer therapy on DNA-replication and -repair

Fabien Aubé¹, Nicolas Fontrodona¹, Audrey Lapendry¹, Cyril Bourgeois^{1,2}, Franck Morteux^{1,2}, & Didier Auboeuf^{1, 2,*}

4.1 - Résumé

Afin d'expliquer pourquoi la résistance aux thérapies anti-cancéreuses est si fréquente, il est essentiel de caractériser la réponse cellulaire à la thérapie. Dans ce but, nous avons analysé, dans un modèle cellulaire de mélanome, les biais de composition des ARN messagers (et ceux des protéines dérivées) dont le niveau d'expression est régulé par des inhibiteurs de la voie MAPK (MAPKi) utilisés en clinique. Après avoir observé que les protéines codées par les ARNm régulés par MAPKi étaient enrichies en acides aminés tels que l'aspartate et le glutamate, nous avons montré qu'au moins une sous-population d'ARNm régulés par MAPKi étaient dégradés en réponse à MAPKi de manière dépendante de la traduction en raison du ralentissement des ribosomes traversant les régions d'ARNm enrichies en un ensemble sélectif de codons, dont ceux correspondant à l'aspartate et au glutamate. Nous avons également observé que MAPKi induit la diminution de la concentration intracellulaire d'aspartate et de glutamate, suggérant qu'une faible concentration intracellulaire d'aspartate et de glutamate déclenche la dégradation dépendante de la traduction des ARNm codant pour des protéines riches en aspartate et en glutamate. Il est intéressant de noter que les protéines riches en aspartate et en glutamate sont impliquées dans la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN. Nous proposons donc un modèle selon lequel les cellules utilisant l'aspartate et le glutamate en réponse à MAPKi pour générer de l'énergie au lieu de les utiliser pour générer les blocs de construction des protéines et des acides nucléiques nécessaires à la prolifération cellulaire, auraient une probabilité plus élevée de survivre à la thérapie. Et dans

le même temps, la diminution concomitante de la biogénèse des protéines riches en aspartate et en glutamate impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN augmenterait la probabilité de l'émergence, en réponse à MAPKi, de cellules à prolifération lente donnant potentiellement naissance à des clones mutés.

4.2 - Abstract

In order to explain the frequency of anti-cancer therapy resistance and the associated-mechanisms, it is essential to characterize the therapy cellular response. Toward this end, we analyzed, in a melanoma cellular model, the compositional biases of RNAs – and that of the derived-proteins – whose expression level is regulated by MAPK inhibitors (MAPKi) used in clinics. After observing that proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs were enriched in amino acids such as aspartate and glutamate, we showed that at least a subpopulation of MAPKi-downregulated mRNAs were degraded in response to MAPKi in a translation-dependent manner due to the slowing down of ribosomes going through mRNA regions enriched in a selective set of codons, including those corresponding to aspartate and glutamate. We also observed that MAPKi induced the decrease in the intracellular concentration of aspartate and glutamate suggesting that a low intracellular concentration of aspartate and glutamate triggers the translation-dependent degradation of mRNAs encoding aspartate- and glutamate-rich proteins. Interestingly, aspartate- and glutamate-rich proteins are involved in cell proliferation and DNA repair. We therefore propose a model according to which cells using aspartate and glutamate in response to MAPKi to generate energy instead of using them to generate protein- and nucleic acid-building blocks necessary for cell proliferation, would have a higher probability to survive and in the meantime, the concomitant decrease of the biogenesis of aspartate- and glutamate-rich proteins involved in DNA-replication and -repair would increase the probability of the emergence in response to MAPKi of slow proliferative cells potentially giving rise to mutated clones.

4.3 - Introduction

Although much criticized, the “genetic program” metaphor – that derives from the gene-centric point of view dominating biology since the second half of the 20th century – is still widely used (e.g., [1-5]). Accordingly to this metaphor, cells would respond and adapt to environmental modifications thanks to genetic programs “stored” within their genome. However, this concept does not fit with recent observations, especially those made from single-cell analysis. Indeed, single-cell analysis revealed that different cells with the same genetic background are unique in terms of molecular composition (e.g., mRNA content) and “respond” uniquely to environmental variations because of nondeterministic- and large number statistical-laws on which relies for example molecular interactions [6-12]. In other words, the inter-individual variation of isogenic cells challenges what implies the “genetic program” metaphor, i.e., the fact that cells would be under the control of deterministic genetic programs.

Even though an increasing number of biologists criticizes it, the “genetic program” metaphor is still widely used because it allows to easily fit some observations within the dominating “gene centric” paradigm. However, it is important to underline that the use of this metaphor influences the way biological objects are apprehended. For example, the concept of “genetic programs” tends to isolate cellular activities from each other since each cellular activity would depend on sub-programs being under the control of ““master genes” and/or preprogrammed signaling pathways. Illustrating this point, cellular metabolism and gene expression are mostly studied completely independently. However, recent evidences clearly demonstrate that cellular metabolism and gene expression are directly and intimately interconnected and interdependent. For example, metabolic activities and epigenetic marks-depending gene transcriptional activities are directly interdependent and interconnected ([13-17] and see below). This is due to the fact that all DNA- and histone-chemical modifications – i.e. epigenetic marks that influence gene transcriptional activity – are directly depending on the bioavailability of chemical groups – e.g., methyl groups deposited on DNA

or histones – whose biogenesis depends in turn on the cellular metabolic activities (e.g., the so-called “one carbon cycle”). In other words, changes in cellular metabolic activities directly impact the chemical modifications of DNA and that of histones through variations of the bioavailability of chemical groups, which in turn impacts gene transcriptional activities, i.e., the biogenesis of mRNA molecules ([13-17] and see below).

Along the same line, a direct link between cellular metabolic activities and translation – i.e., the biogenesis of proteins – has been clearly established. Indeed, protein synthesis is directly dependent on the bioavailability – and therefore on the metabolism – of amino acids that in turn depends on the cellular metabolic activities. In this regards, it is important to underline that some amino acids like aspartate and glutamate are at the crossroad between the energetic metabolism and the synthesis of “building blocks” of proteins (i.e., amino acids) and nucleic acids (i.e., nucleotides) [18-23]. Indeed, aspartate and glutamate derive from and can generate in a reversible manner key components of the TCA cycle, namely oxaloacetate and α -ketoglutarate. Moreover, aspartate and glutamate are used to generate other amino acids like glutamine, asparagine, lysine, and arginine among others. Aspartate, glutamate, and glutamine provide also the carbon skeleton and the nitrogen atoms require for the biogenesis of nucleobases and consequently that of nucleotides. As a consequence, there is a “competition” between i) anabolic pathways where the carbon skeleton of metabolites such as oxaloacetate/aspartate and α -ketoglutarate/glutamate is used to generate the building blocks of proteins (i.e., amino acids) and nucleic acids (i.e., nucleotides) and ii) energy production where these metabolites “feed” mitochondria through the TCA cycle to produce more ATP molecules.

Besides this general principle – and supporting a model where cellular metabolic activities have direct consequences on translation – it has been observed that the synthesis of some proteins can only occur under certain metabolic states allowing to produce sufficient amount of certain amino acids [24-34]. For example, a large amount of proline can be produced only under some metabolic conditions which next determines whether some

proline-rich proteins of the extracellular matrix, such as collagen are produced [25-28]. In this setting, it is important to underline the fact that, while it could be assumed that the diminution of the bioavailability of some amino acids has a broad effect on translation (e.g., by globally inhibiting translation), it has been observed that the limited bioavailability of certain amino acids has instead a “selective” effect by impacting the translation of only a subset of mRNAs. For example, the deprivation of a given amino acid only affects the translation of only certain mRNAs either because their translation requires a large amount of the limiting residue or because they are enriched in some codons those corresponding charged-tRNAs and/or uncharged-tRNAs are limiting [30-37]. In other words, the intracellular concentration of certain amino acids and/or that of (charged)-tRNAs can have a selective effect on translation of a subset of mRNAs in function of their compositional biases at the codon level and/or at the amino acid level.

It must also be underlined that mRNA metabolism, in particular mRNA degradation, depends at least in part on translation through the so-called translation-dependent degradation (TDD) [38-41]. Indeed, it has been observed that ribosomes compete with enzymes that degrade mRNAs. Consequently, ribosomes can “protect” mRNAs from degradation but if ribosomes “pause” and do not progress along mRNA molecules, the latter have a higher probability to be degraded [38-41].

The link between translation and mRNA degradation has been extensively studied through the concept of “codon optimality” [42-47]. Indeed, it has been observed that codons ending by the G or C (G/C) nucleotide interact efficiently with their cognate anti-codons which in turn favor ribosome dynamics, and consequently translation and mRNA stability, while codons ending by the A or U (A/U) nucleotide establish weak interactions with their cognate anti-codons which slows down ribosomes and which is therefore associated with inefficient translation and consequently with TDD-dependent mRNA instability [42-52]. It is important to underline that “codon optimality” that relies on A/T- and G/C-nucleotide properties and that establishes a link between translation and mRNA degradation is a general rule. However, “codon optimality” can be modulated by many extrinsic parameters. For example, chemical

modifications of the first nucleotide of anti-codons can modulate the codon/anti-codon interactions with consequences on ribosome dynamics (e.g., [52, 53]). Along the same line the intracellular concentration of charged- and/or uncharged-tRNAs can also modulate “codon optimality”. For example, it has been observed that, when compared to differentiating cells, proliferating cells express more tRNAs corresponding to A/T-ending codons allowing the efficient translation of proteins that are involved in cell proliferation and that are encoded by mRNA enriched in A/T-ending codons ([54-56] and see Discussion). To summarize, the relationship between mRNA-translation and mRNA-degradation is complex since it depends on i) intrinsic parameters (e.g., mRNA codon composition) and ii) extrinsic parameters (e.g. (charged)tRNA- and amino acid-intracellular concentration) [38, 42-52, 54-56].

As mentioned above, mRNA-translation and mRNA-degradation depend at least in part on mRNA compositional biases (intrinsic parameters) in a cellular context specific manner (extrinsic parameters). Importantly, mRNA compositional biases determine protein compositional biases which in turn has consequences in terms of protein cellular functions. Indeed, the physicochemical properties of proteins and therefore their subcellular localization, their folding, and their activities depends on their local and/or global amino acid composition [57-62]. For example, membrane proteins are biased toward hydrophobic amino acids whereas soluble cytoplasmic or nuclear proteins are enriched in certain hydrophilic amino acids. Along the same line, the isoelectric points of proteins that has major consequences in terms of biological function depends on the amino acid composition biases of proteins [63, 64]. Another example of the link between protein composition biases and protein functions concerns proteins that interact with nucleic acids and that are enriched in charged amino acids. Indeed, the succession of positively charged amino acids allows for example the interaction between proteins and nucleic acid backbone, while the succession of negatively charged amino acids can modulate protein/nucleic acid interactions and/or “mimic” nucleic acids [61, 65]. These few examples among many others illustrate the straightforward relationship between protein composition biases and protein functions.

To summarize, on the one hand, mRNA/protein-compositional biases establish a straightforward link between metabolism and mRNA degradation/translation, and on the other hand, protein biological functions depend on mRNA/protein-compositional biases. This opens the possibility of a direct link between the metabolic state and the protein-dependent cellular functions. Indeed, by “dictating” the nature of proteins that a cell can produce in a manner depending in part on their amino acid composition, the cellular metabolic state may “dictate” the protein-dependent cellular functions.

The potential direct link between cellular metabolic state and cellular functions is particularly interesting to consider in cancer cell biology. Indeed, it is well established that the hyper-proliferation of cancer cells has direct consequences on the cellular metabolism and in particular on the "use" and bioavailability of certain amino acids. For example, some cancer cells such as melanoma cells are “addicted” to glutamine that they either “use” for the synthesis of other amino acids and proteins or for the production of energy [66-68]. In addition to these cancer-associated metabolic changes, it is well established that the expression pattern of many proteins is modified in cancer cells. While these cancer-associated changes in gene expression are often associated with the concept of “reprogramming” or “rewiring”, there is the possibility that cancer-associated gene expression modifications are actually the direct consequence of modifications of the cancer-associated metabolic state. Accordingly, there are growing evidences that the metabolic plasticity and the epigenetic plasticity of cancer cells are actually two sides of the same coin [68-73].

A direct link between metabolic state and synthesis of certain proteins in a manner depending on their amino acid composition may also help to improve our understanding on the way cancer cells respond and adapt to anti-cancer therapies that modify cancer cell metabolism as exemplified in the case of MAPK-inhibitors (MAPKi) used to treat melanoma [74-77]. Because of the “high capacity” of cancer cells to adapt to cancer anti-therapies, an important issue is to decipher whether anti-cancer therapies somehow directly contribute to the emergence of drug-resistant cells owing to their effects on cancer cell metabolism which

could be “translated” into specific protein-dependent biological activities contributing to drug-resistance.

To address this issue, we analyzed the compositional biases of the mRNAs – and the corresponding proteins – that were regulated in a cellular model of melanoma cancer exposed to MAPKi. We observed that MAPKi induced a decrease in the intracellular concentration of glutamate and aspartate, that were enriched in MAPKi-downregulated mRNAs those TDD was increased in response to MAPKi. In addition, we observed that proteins enriched in glutamate and aspartate were involved in proliferation and DNA repair. Based on these observations, we propose a model where the MAPKi-dependent decrease of aspartate- and glutamate-bioavailability triggers the translation-dependent degradation of mRNAs encoding aspartate- and glutamate-rich proteins such as those involved in proliferation and DNA repair. This may in turn favor the emergence of slow-proliferating and potentially mutated cells, and therefore the emergence of therapy-resistant clones.

4.4 - Results

Compositional biases of proteins encoded by MAPKi-regulated mRNAs

RNA sequencing was performed after growing the A375 melanoma cell line for 24h in the absence or in the presence of a combination of BRAF- and MEK-inhibitors, noted hereafter MAPK inhibitors (MAPKi). The expression level of 2010 and 1719 mRNAs was decreased (“downregulated mRNAs”) and increased (“upregulated mRNAs”), respectively in treated cells (TC) compared to control cells (CC) (Figure 1A, see Supplementary Table S1). Interestingly, 813 and 753 downregulated-mRNAs encoded proteins that are associated with the « Nucleoplasm » and « Cytoplasm » GO terms, respectively. Meanwhile, 626 upregulated-mRNAs encoded proteins that are associated with the “Integral component of membrane” GO term (Figure 1A). In agreement with the fact that nucleoplasmic and cytoplasmic proteins are hydrophilic soluble proteins, while membrane proteins are hydrophobic proteins, we noticed that the hydrophobicity index of proteins encoded by upregulated-mRNAs was higher when compared to the hydrophobicity index of proteins encoded by downregulated-mRNAs (Figure 1B and Supplementary Figures S1A and S1B). This observation raised the possibility that proteins encoded by down- or up-regulated mRNAs had different amino acid composition biases since the hydrophobicity of proteins depends on their amino acid composition, some amino acids such as lysine (K), arginine (R), glutamate (E), aspartate (D), glutamine (Q), and asparagine (N) being hydrophilic residues, while amino acids such as valine (V), leucine (L), cysteine (C), tryptophan (W), isoleucine (I), and phenylalanine (F) being hydrophobic residues (Supplementary Figure S1A).

Accordingly, proteins encoded by downregulated-mRNAs were enriched in hydrophilic residues, such as lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), and asparagine (N), that were in contrast impoverished in proteins encoded by upregulated-mRNAs (Figure 1C). Consequently, proteins encoded by downregulated-mRNAs contained on average 30%, 12%, 8%, and 7% more lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), or asparagine (N) residues, respectively, when compared to proteins encoded by upregulated mRNAs (Figure 1D). Meanwhile, proteins

encoded by upregulated-mRNA were enriched in hydrophobic amino acids, like tryptophan (W), cysteine (C), phenylalanine (F), and leucine (L) that were in contrast impoverished in protein encoded by downregulated-mRNAs (Figure 1C). Consequently, proteins encoded by upregulated-mRNAs contained on average 24%, 11%, 10%, and 9% more tryptophan (W), cysteine (C), phenylalanine (F), or leucine (L) residues, respectively when compared to proteins encoded by downregulated-mRNA (Figure 1D).

As shown on Figure 1E, the average values of amino acid frequency used to compare proteins encoded by down- and up-regulated mRNAs, were representative of the variability of the frequency within the two groups since a larger number of downregulated-mRNAs encoded proteins having a higher frequency of lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), or asparagine (N), when compared to upregulated mRNAs (Figure 1E). This means that larger subpopulations of downregulated-mRNAs encoded proteins that contain a higher frequency of lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), or asparagine (N), when compared to upregulated-mRNAs as illustrated on Figure 1F (K, E, and D). Meanwhile, a larger number of upregulated-mRNAs encoded proteins having a higher frequency of leucine (L), phenylalanine (F), cysteine (C), or tryptophan (W), when compared to downregulated mRNAs (Figure 1E). This implies that larger subpopulations of upregulated-mRNAs encoded proteins that contain a higher frequency of leucine (L), phenylalanine (F), cysteine (C), and tryptophan (W), when compared to down-regulated mRNAs as illustrated on Figure 1F (W, F, and L).

Having observed different amino acid composition biases of proteins encoded by down- and up-regulated mRNAs, we next tested whether MAPKi-regulated mRNAs had different codon composition biases. As shown on Figure 1G, down- and up-regulated mRNAs were composed of different set of codons. In particular, codons ending with the A or T (A/T) nucleotides were enriched in MAPKi-downregulated mRNAs, while being impoverished in MAPKi-upregulated mRNAs. Meanwhile, codons ending with the G or C (G/C) nucleotides were enriched in MAPKi-upregulated mRNAs, while being impoverished in MAPKi-downregulated mRNAs.

Furthermore, we observed a selective enrichment of a subset of synonymous codons. For example, only the GAA (but not the GAG), the GAT (but not the GAC), and the AAT (but not the AAC) codons – corresponding to glutamate (E), aspartate (D), and asparagine (N), respectively – were enriched in downregulated mRNAs, while being impoverished in upregulated mRNAs (Figures 1G and 1H and Supplementary Figure S1C). Along the same line, only a subset of codons such as TGC, TTC, and CTG – corresponding to cysteine (C), phenylalanine (F), and leucine (L), respectively – were enriched in upregulated mRNAs while being impoverished in downregulated mRNAs (Figures 1G and 1H and Supplementary Figure S1C).

To summarize, MAPKi-downregulated and -upregulated mRNAs contain different codon compositional biases and encode protein sets having different amino acid compositional biases.

Compositional bias of TDD-regulated mRNAs in response to MAPKi

The differential enrichment of synonymous codons in MAPKi-downregulated and -upregulated mRNAs suggested that MAPKi treatment could affect, at least in part, mRNA half-life in a translation-dependent manner (see Introduction). To challenge this possibility, we first measured the TDD index of mRNAs by comparing the half-life of each expressed mRNA after inhibition of transcription alone or after inhibition of both transcription and translation either in the absence or in the presence of MAPKi (Figure 2A). Using this strategy, we observed that MAPKi treatment increased the TDD index of 1390 mRNAs, while decreasing the TDD index of only 183 mRNAs (Figure 2A). Although not a formal proof, this observation suggested that MAPKi treatment could affect mRNA expression level by modulating the degradation of a subset of mRNAs in a translation depending manner (see below).

As shown on Figure 2B, lysine (K), glutamate (E), and asparagine (N) were enriched in proteins encoded by mRNAs whose TDD index increased in response to MAPKi treatment, while these amino acids were impoverished in proteins encoded by mRNAs whose TDD index decreased (and see Supplementary Figure S1D). In contrast, other amino acids such

as tryptophan (W), glycine (G), alanine (A), proline (P) and leucine (L) were enriched in proteins encoded by mRNAs those TDD index decreased in response to MAPKi treatment, while being impoverished in proteins encoded by mRNAs those TDD index increased (Figure 2B and Supplementary Figure S1D).

Remarkably, most codons that were enriched in mRNAs those TDD index increased in response to MAPKi were impoverished in mRNAs those TDD index decreased (Figure 2C and Supplementary Figure S2A). Furthermore, most codons that were enriched in mRNAs those TDD index increased in response to MAPKi were A/T-ending codons, while most codons enriched in mRNAs those TDD index decreased in response to MAPKi were G/C-ending codons (Figure 2C). This observation agreed with a recent report showing that the MAPK pathway modulates codon optimality ([78] and see below).

As shown on Figure 2A, MAPKi treatment increased the TDD index of a large number of mRNAs (i.e. 1390) when compared to the number of mRNAs those TDD decreased (i.e., 183). In addition, a large number of MAPKi-downregulated mRNAs had a significantly increased TDD index in response to MAPKi (left panel, Figure 2D), while the TDD index of MAPKi-upregulated mRNAs was either increased or decreased (right panel, Figure 2D). This suggested that the TDD increase could contribute to the downregulation of a large subset of mRNAs in response to MAPKi, while the contribution of TDD may be limited in mRNA upregulation. Based on these considerations, we decided to focus our analyses on MAPKi - downregulated mRNAs those TDD index increased in response to MAPKi.

While analysing the compositional biases of mRNAs those TDD increased in response to MAPKi, we made two important observations. First, lysine (K), glutamate (E), asparagine (N), and aspartate (D) were the only 4 amino acids that were enriched in both MAPKi-downregulated mRNAs and mRNAs those TDD index was increased (Figure 2E). Both sets of mRNAs were also enriched with the same subset of codons including the AAA, GAA, AAT, and GAT codons corresponding to lysine (K), glutamate (E), asparagine (N), and aspartate (D), respectively (Figure 2F). These observations suggested that among the MAPKi-downregulated

mRNAs, those enriched in a subset of codons corresponding to lysine (K), glutamate (E), asparagine (N), and aspartate (D) could be regulated by TDD in response to MAPKi.

The second important observation supported this possibility. Indeed, compositional biases were stronger in mRNAs with MAPKi-induced TDD when compared to MAPKi-downregulated mRNAs. For example, the enrichment rate of lysine (K) and glutamate (E) was ~24% and ~14%, respectively in the population of mRNAs those TDD increased in response to MAPKi, while it was ~12% and ~4%, respectively in the population of MAPKi-downregulated mRNAs (Figure 2E). Likewise, the enrichment rate of the AAA (K) and GAA (E) codons was ~42% and ~38%, respectively in the population of mRNAs those TDD increased in response to MAPKi, while it was ~12% and ~9%, respectively in the population of MAPKi-downregulated mRNAs (Figure 2F).

Supporting a model where a subset of MAPKi-downregulated mRNAs were regulated by TDD depending on their compositional biases, the subpopulation of MAPKi-downregulated mRNAs those TDD increased in response to MAPKi had stronger compositional biases when compared to the rest of the MAPKi-downregulated mRNAs both in terms of amino acids and codons (Figure 2G).

Collectively these observations support a model where MAPKi treatment induced the downregulation of a subpopulation of mRNAs in a TDD-depending manner as a function of their compositional biases.

Compositional bias of MAPKi-regulated ribosomal peaks

It has been proposed that codon optimality has an effect on mRNA stability in a translation depending manner by impacting the dynamics of ribosomes on mRNAs (see Introduction). In an attempt to better elucidate the MAPKi-dependant relation between mRNA composition biases, mRNA expression level, and TDD, we performed ribosome profiling experiments with the aim of testing whether MAPKi treatment may have an effect on local ribosome density. Towards this end, after performing ribosome profiling experiments, we

computed mRNA ribosomal peaks both in the absence and in the presence of MAPKi (Figure 3A and see Supplementary Figure S2A). Below, we named “CC peaks”, mRNA regions where the local density of ribosomes was higher in control cells when compared to treated cells, and “TC peaks” mRNA regions where the local density of ribosomes was higher in treated cells when compared to control cells. As shown on Figure 3A, 1281 “CC peaks” were detected on 984 mRNAs in control cells and 1974 “TC peaks” were detected on 1509 mRNAs in treated cells. We next analysed the amino acid- and codon-composition of “CC peaks” and “TC peaks”.

As shown on the left panel of Figure 3B, some amino acids were enriched in “TC peaks” while being impoverished in “CC peaks” and conversely some amino acids were enriched in “CC peaks” while being impoverished in “TC peaks” (and see Supplementary Figure S2B). For example, ~70% of “CC peaks” did not contain any lysine residue, which means that ~30% of “CC peaks” contained at least one lysine residue. Meanwhile, ~45% of “TC peaks” did not contain any lysine residue and ~55% of “TC peaks” contained at least one lysine residue (K, Figure 3C). Similar results were obtained for aspartate (E), glutamate (D), and asparagine (N) (Figure 3C). In contrast, “CC peaks” contained more frequently at least one alanine (A) or one glycine (G) when compared to “TC peaks” (A and G, Figure 3C).

Furthermore, some codons were enriched in “TC peaks” while being impoverished in “CC peaks”, and in contrast, some codons were enriched in “CC peaks” while being impoverished in “TC peaks” (right panel, Figure 3B and Supplementary Figure SBC). Interestingly, most codons enriched in “TC peaks” were A/T-ending codons, while most codons enriched in “CC peaks” were G/C-ending codons (right panel, Figure 3B). This observation suggested that ribosomes could spend more time on A/T-ending codons in MAPKi treated cells compared to control cells. This observation agreed with a recent report showing that the MAPK pathway modulates codon optimality ([78] and see Discussion).

In agreement with a relationship between local density of ribosomes and translation-dependant mRNA decay, we observed that the TDD index of most MAPKi-downregulated mRNAs that contained “TC peaks” increased in response to MAPKi (Figure 3D).

In addition, “TC peaks” of MAPKi-downregulated mRNAs were enriched in lysine (K), glutamate (E), and aspartate (D) as did MAPKi-downregulated mRNAs those TDD increased in response to MAPKi (Supplementary Figure S2C). In addition, “TC peaks” of MAPKi-downregulated mRNAs were enriched in the AAA, GAA, GAT, and AAT codons – corresponding to lysine (K), glutamate (E), and aspartate (D), respectively as did MAPKi-downregulated mRNAs those TDD increased in response to MAPKi (Supplementary Figure S2D).

To summarize, we characterized a subset of MAPKi-downregulated mRNAs those TDD increased in response to MAPKi and that contained MAPKi-induced ribosomal peaks. These subset of mRNAs as well as the MAPKi-induced ribosomal peaks were enriched in the AAA, GAA, and GAT codons – corresponding to lysine (K), glutamate (E), and aspartate (D), respectively – and encoded for proteins enriched in lysine (K), glutamate (E), and aspartate (D) (Figure 3E).

Collectively these observations supported a model where, MAPKi treatment could result in the “accumulation” or the “slowing down” of ribosomes going through a subset of codons such as AAA, GAA, and GAT corresponding to lysine (K), glutamate (E), and aspartate (D), respectively – which may in turn trigger TDD. This would provide an explanation of the observed compositional biases in MAPKi-downregulated mRNAs, TDD-induced mRNAs, and MAPKi-induced ribosomal peaks.

Amino acid bioavailability and codon-depend selective effects.

It has been reported that the decrease in the intracellular concentration of certain amino acids can induce pause of ribosomes when they move on mRNAs through some of the cognate codons (see Introduction). Since the activation and inhibition of the MAPK pathway in melanoma cells have been reported to modify amino acid metabolism and consequently the intracellular concentration of some amino acids (see Introduction), we measured the intracellular concentration of lysine, glutamate, aspartate, asparagine as well as glutamine to which melanoma cells are addicted (see Introduction). While lysine (K) and glutamine (Q) intracellular concentration was not affected by the MAPKi treatment, the intracellular

concentration of glutamate (E) and aspartate (D) strongly decreased in the presence of MAPKi (Figure 4A). There was also a lower intracellular concentration of asparagine (N) in MAPKi-treated cells when compared to control cells although the difference was not statistically significant (Figure 4A). This result raised the possibility that MAPKi treatment could have a selective effect on the translation-dependent degradation of glutamate- and/or aspartate-enriched mRNAs owing to the decrease of the intracellular concentration of these amino acids.

To challenge this possibility, melanoma cells were grown in the absence of aspartate and/or glutamate. However, we did not observe any significant effect of aspartate- and/or glutamate-deprivation neither on aspartate- and glutamate-intracellular concentration, nor on cell viability and nor on gene expression level (Supplementary Figures S2E and S2F). One possible explanation is that aspartate and glutamate can be synthesized in melanoma cells either from glutamine or from metabolites of the TCA cycle (i.e, oxaloacetate and α -ketoglutarate, respectively). In other words, the metabolic plasticity of melanoma cells may compensate the absence of aspartate and glutamate in the growth media.

To test whether melanoma cells produce glutamate and/or aspartate from glutamine, melanoma cells were grown in the absence of glutamine. As shown on Figure 4B, glutamine depletion decreased the intracellular concentration of glutamine (Q) as well as glutamate (E) and aspartate (D) supporting a model where the intracellular concentration of glutamate (E) and aspartate (D) depend at least in part on glutamine in the melanoma cell line (Figure 4B).

Since glutamine deprivation somehow mimics the decrease of glutamate and aspartate that we observed in the presence of MAPKi (compared Figures 4A and 4B), we analyzed the effect of glutamine deprivation on gene expression and ribosome profile. So doing, we first observed that many of the MAPKi-downregulated mRNAs were also downregulated in glutamine-depleted cells (Figure 4C). However, in contrast to proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs, proteins encoded by glutamine deprivation-downregulated mRNAs did not show any significant enrichment in neither glutamate (E) nor

aspartate (D). Proteins encoded by glutamine deprivation-downregulated mRNAs were neither enriched in glutamine (Q) (Figure 4D, upper panel). However, glutamine deprivation-downregulated mRNAs were enriched in the GAG, GAC, and CAG codons corresponding to glutamate (E), aspartate (D), and glutamine (Q), respectively while they were impoverished for the synonymous codons, namely GAA (E), GAT (D) and CAA (Q) (Figure 4D, lower panel).

Furthermore, ribosome profiling experiments revealed that glutamine deprivation induced ribosomal peaks that were enriched in glutamine (Q) and glutamate (E) even though the glutamate enrichment did not reach statistical significance (Figure 4E, upper panel). In agreement with the codon composition bias observed in glutamine deprivation-downregulated mRNAs (Figure 4D, lower panel), the CAG (Q) and GAG (E) codons were enriched in ribosomal peaks induced by glutamine depletion (Figure 4E, lower panel).

Three important conclusions can be drawn from the glutamine deprivation experiments. First, depletion of glutamine decreased the intracellular concentration of glutamate and aspartate in agreement with the facts that melanoma cells are addicted to glutamine that can be used to generate glutamate and aspartate (see Introduction). The second conclusion is that depletion of an amino acid like glutamine can induce ribosomal peaks on some of its cognate codons as it has already been shown [46]. In other words, our results confirmed the fact that the bioavailability of amino acids can impact the ribosome dynamics on mRNAs in function of the composition of the proteins they encode. The third conclusion is that the nature of the codons on which ribosomes pause is selective and context dependent as already proposed (see Introduction). For example, while the decrease of the intracellular concentration of glutamate in response to MAPKi treatment was associated with ribosomal peaks enriched in the GAA codon (Figures 3A and 3F), the decrease of the intracellular concentration of glutamate in response to glutamine deprivation was associated with ribosomal peaks enriched in the GAG codon (Figure 4E, lower panel).

Several explanations have been proposed regarding the codon-selective pause of ribosomes. For example, the codon-selective pause of ribosomes in response to amino acid

starvation has been explained by the expression of tRNA synthetases that can preferentially charge some tRNAs (see Introduction). In this setting, we observed that EPRS1 that charges glutamate on tRNAs was upregulated in glutamine deprivation experiments but not in MAPKi treated cells. Therefore, the role of EPRS1 in mediating a context-specific pause of ribosome on different codons needs further investigations.

Another explanation of the codon-selective pause of ribosomes concerns tRNA modifications. Indeed, the chemical modifications of the first nucleotide of anti-codons can change the codon/anti-codon interaction with consequences on ribosome dynamics during translation (see Introduction). In this setting, we noticed that the CTU2 (*Cytosolic Thiouridylase Subunit 2*) enzyme was downregulated in MAPKi-treated cells but not in glutamine deprivation experiments, as validated by RT-qPCR (Supplementary Figure S2G). We were particularly interested in CTU2 for two main raisons. The first one is that an important role of CTU2 in melanoma has already been reported [53]. But more importantly, CTU2 that modifies uracil on position 34 of some tRNAs is known to modulate the interaction between anti-codons and some codons ending by A, in particular the AAA (lysine) codon and the GAA (glutamate) codon [53]. Since we observed an enrichment of these codons in MAPKi-downregulated mRNAs (Figure 1), TDD-induced mRNAs (Figure 2), and MAPKi-induced ribosomal peaks (Figure 3), we tested a potential role of CTU2 by transfecting melanoma cells with an siRNA targeting CTU2 (siCTU2). Remarkably, we observed that siCTU2 transfection downregulated the expression of a large set of MAPKi-downregulated mRNAs (Figure 4F). Furthermore, siCTU2-downregulated mRNAs encoded protein that were enriched in lysine (K) and glutamate (E) (Figure 4G, upper panel) and in the AAA (K) and GAA (E) codons (Figure 4G, lower panel).

Collectively these observations support a model where MAPKi treatment may have a selective effect on the translation-dependent degradation of a subset of mRNAs in function of their amino acid- and codon-composition biases and depending on a combination of extrinsic parameters such as amino acid intracellular concentration and CTU2- dependent tRNA modifications.

Protein amino acid composition bias and cellular functions.

We identified a subset of mRNAs whose expression was decreased and whose TDD was increased in response to 24h of MAPKi treatment (Figures 1 and 2). Since TDD is expected to be transient, we next wondered whether the downregulation of this subset of mRNAs persist in the so-called persister cell (PC) population (see Introduction). For this purpose, we performed total RNAseq using cells exposed for 3 days to MAPKi followed by two additional days without MAPKi (PC, Figure 5A).

As shown on Figure 5A, a large number of TDD-dependent downregulated mRNAs after 24h of MAPKi treatment was still downregulated in persister cells. In addition, proteins encoded by mRNAs that were downregulated in persister cells were enriched in lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), and asparagine (N) as did proteins encoded in MAPKi-downregulated mRNAs (Figure 5B). Likewise, mRNAs that were downregulated in persister cells were enriched in the AAA (K), GAA (E), GAT (D), and AAT (N) codons as did MAPKi-downregulated mRNAs (Figure 5C).

We next questioned the biological functions of the proteins encoded by different mRNA populations such as mRNAs regulated by short term exposure to MAPKi, mRNAs those TDD increased and/or persister cell-downregulated mRNAs. As shown on Figure 5D, some biological function like “Cell division”, “kinetochore” and “DNA repair” were statistically frequently associated with the analyzed mRNA populations. Very interestingly, we noticed that the proportion of mRNAs associated with the “proliferation”, “kinetochore” and “DNA repair” biological functions increased in MAPKi-downregulated mRNAs those TDD increased in response to MAPKi and that were still downregulated in persister cells (Figure 5E). For example, ~11% of all MAPKi-downregulated mRNAs encoded for proteins involved in cell proliferation while more that ~33% of the MAPKi-downregulated mRNAs those TDD increased and that were downregulated in persister cells encoded proteins involved in cell proliferation (Figures 5D and 5E). Likewise, ~7% of all MAPKi-downregulated mRNAs encoded for proteins involved in DNA repair while ~14% of the MAPKi-downregulated mRNAs those

TDD increased and that were downregulated in persister cells encoded proteins involved in DNA repair (Figures 5D and 5E).

These observations prompted us to investigate the relationship between amino acid composition biases and biological functions. When compared to the whole proteome, there was a strong enrichment in amino acids like lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), and asparagine (N) in proteins involved in proliferation, kinetochore, and DNA repair (Figure 6A and left panels of Figures 6B, 6C and 6D). In addition, mRNAs encoding proteins involved in proliferation, kinetochore, and DNA repair were enriched in the AAA (K), GAA (E), GAT (D), and AAT (N) codons (right panels of Figures 6B, 6C and 6D). In this setting, it is important to note that mRNAs encoding proteins involved in proliferation have been shown to be enriched in A/T-ending codons (see Discussion).

Proteins encoded by MAPKi-repressed mRNAs that are involved in proliferation, kinetochore, or DNA repair seem to have the same compositional bias compared to the average of all the proteins involved in these biological functions (Figures 6B-6D). However, proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs that were associated with biological functions like proliferation, kinetochore, or DNA repair had stronger amino acid- and codon-composition biases when compared to the other sets of MAPKi-downregulated mRNAs (Figure 6E). For example, proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs that were involved in proliferation were enriched in lysine (K) and glutamate (E) when compared to all the MAPKi-downregulated mRNAs (left panel, Figure 6E). Likewise, MAPKi-downregulated mRNAs encoding proteins involved in DNA repair were enriched in the AAA (K), GAA (E), and GAT (D) codons when compared to all down-regulated mRNAs (right panel, Figure 6E).

Collectively, our data support a model where MAPKi induce changes in cellular metabolism resulting in the decrease of the bioavailability of certain amino acids such as glutamate and aspartate (Figure 7). This would lead to the formation of ribosome pause sites on compositionally-biased mRNA regions and thus on the selective degradation of a subset of mRNAs according to their compositional biases in certain codons and corresponding amino

acids. Since the biological functions of proteins depend on their composition in certain amino acids, the degradation of mRNAs according to their compositional bias would have consequences on particular functions such as proliferation and DNA repair. In addition, since this mode of regulation persists in cells after MAPKi withdrawal, one hypothesis is that it may simultaneously contribute to the appearance of cells with a decreased proliferation rate, but if these cells had a chance to replicate, their daughter cells would have a higher probability to contain mutated DNA mutations.

4.5 - Discussion

After having observed amino acid-composition biases of proteins encoded by MAPKi-regulated mRNAs, we propose that MAPKi treatment decreases the intracellular concentration of glutamate and aspartate which triggers ribosome pauses and translation-dependent degradation of compositionally-biased mRNAs encoding proteins involved in proliferation and DNA repair. We will discuss below, step by step, how the obtained results and the proposed model fit with the literature.

It has been proposed that as a consequence of the hyper-activation of the MAPK pathway resulting from the BRAF^{V600E} mutations, melanoma cells are “addicted” to glutamine used to generate i) energy through glycolysis; and ii) other amino acids (e.g., glutamate and aspartate) and the biogenesis of proteins as well as the biogenesis of nucleotides on which the growing cells depend [67, 79-83][84-87]. In agreement with this model, glutamate- and/or aspartate-depletion from the growth medium did not induce a decrease of their intracellular concentration since melanoma cells can produce them from glutamine, and indeed, glutamine depletion induced the decrease of glutamate- and aspartate-intracellular concentration (Supplementary Figure S2F and Figure 4B). Importantly, it has been shown that MAPK inhibitors that are used to treat melanoma counteract the anabolic pathway by instead “reactivating” the use of glutamine, glutamate and aspartate toward oxidative phosphorylation, explaining the decrease of glutamate- and aspartate-intracellular concentration in response to MAPKi (Figure 4A) [67, 74-76, 79-82]. The MAPKi-dependent

metabolic switch could depend at least in part on the GOT1 (glutamic oxaloacetic transaminase 1) enzyme, whose expression is increased in response to BRAFi and glutamine depletion (Supplementary Figure S2H). Indeed, GOT1 converts in a reversible and interdependent manner glutamate and aspartate into oxaloacetate and α -ketoglutarate [67, 79-82, 88, 89]. The role of GOT1 and GOT2 – the mitochondria paralogous of GOT1 – in the decrease of glutamate- and aspartate-intracellular concentration in response to MAPKi needs to be further investigated.

Although we could not directly test this hypothesis through the depletion of aspartate and glutamate from the growth media (see above), our results suggest that the MAPKi-dependent decrease in the aspartate- and glutamate-intracellular concentration explains at least in part, the observed compositional biases of i) the MAPKi-downregulated mRNAs (Figure 1), ii) the mRNAs whose TDD increased in response to MAPKi (Figure 2), and iii) the MAPKi-induced ribosomal peaks (Figure 3). This model is supported by the literature.

First, it has been shown that the decrease of the intracellular concentration of an amino acid triggers the slowing down of ribosomes going through mRNA regions requiring the limiting amino acid to be translated (see Introduction). Importantly, the slowing down of ribosomes depends at least in part on the nature of the synonymous codons that they encounter in a cellular context-dependent manner (see below). Accordingly, we observed that downregulated mRNAs and ribosome peaks formed in response to glutamine depletion – that also triggers the decrease in the glutamate- and aspartate-intracellular concentration – are enriched in a subset of codons corresponding to glutamine, glutamate, and aspartate (Figures 4B-4E).

Second, it has been shown that the slowing down of ribosomes going through sub-optimal A/T-ending codons can trigger the selective degradation of mRNAs (see introduction). In this setting, we noticed that i) the MAPKi-downregulated mRNAs (Figure 1), ii) the mRNAs whose TDD increased in response to MAPKi (Figure 2), and iii) the MAPKi-induced ribosomal peaks (Figure 3) are enriched in A/T-ending codons. Quite remarkably, it has been shown that

i) the over-activation of the MAPK pathway owing to the BRAF^{V600E} mutation increases the translation efficiency of mRNAs enriched in A/T-ending codons, and ii) the MAPK pathway inhibition reverse this effect and decreases the translation efficiency of mRNAs enriched in A/T-ending codons [78]. With respect to our results, the work of Peterson et al [78] is very complementary since the effect of the MAPK pathway and its inhibition was studied in the context of reporter genes that were mutated to change the ratio between A/T- and G/C-ending codons. Thus the model that we propose where MAPKi trigger, in a translation depending manner, the degradation of mRNAs enriched in AT-ending codons (Figures 1G, 2C, and 3A) is in agreement with the observations made by Peterson et al [78]. How such an effect could be explained? A potential explanation may rely on the Ccr4-NOT complex. Indeed, it has been shown that the Ccr4-NOT complex – involved in mRNA degradation – plays an important role in co-translational mRNA degradation depending on codon optimality [49, 90]. More precisely, the Ccr4-NOT complex inhibition induces the upregulation of mRNA enriched in G/C-ending codons and the downregulation of mRNAs enriched in A/T-ending codons [49, 90]. In this setting, we noticed that several members of the Ccr4-NOT complex, including CNOT9, are downregulated and/or have an increased TDD in response to MAPKi (see Supplementary Table S1). Therefore, the selective effect on A/T- versus G/C-rich codons mediated by the MAPK pathway-activation and -inhibition could in part be dependent on the Ccr4-NOT complex activity. Of note, it has also been shown that Ccr4-NOT complex inhibition modulates the velocity of ribosomes at aspartate- and glutamate-codons [49]. Based on these considerations, the role of the Ccr4-NOT complex in the MAPKi-mediated effects needs to be further investigated.

A third set of results already published and to which our observations agree with, concerns the role of enzymes involved in tRNA modifications and that modulate mRNA translation and degradation. In the context of our results, the role of the CTU2 (cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 2) enzyme is particularly relevant. The CTU2 enzyme is one of the so-called U₃₄ enzymes that chemically modify the first uracil in tRNA-position 34 of the UUU, UUC, and UUG anti-codons. U34 chemical modification mediated by U₃₄ enzymes modifies the

interactions between the UUU, UUC, and UUG anti-codons with their cognate codons, namely the AAA, GAA and CAA codons. It has been shown that *CTU2* is over-expressed in melanoma cells bearing the BRAF^{V600E} mutation and plays a major role in the etiology of melanoma cells [53]. Indeed, *CTU2* supports the translation of mRNAs enriched in AAA, GAA, and CAA codons, in particular the mRNA coding the HIF1 α protein [53]. Indeed, in the absence of the U₃₄ enzyme, HIF α mRNA is poorly translated except if the naturally occurring AAA, GAA and CAA codons of the HIF1 α mRNA are replaced by their AAG, GAG, and CAG synonymous codons [53]. In agreement with these results, we observed that MAPKi treatment inhibits the expression level of *CTU2* and that *CTU2* depletion induces the downregulation of mRNAs enriched in the AAA, GAA and CAA codons (Figure 4F-4G and Supplementary Figure S2G). In addition, we noticed that HIF α is among the mRNAs that are downregulated and that contained ribosomal peaks in response to MAPKi (Supplementary Table S1). Therefore, our results are in agreement with the observations made by Rapino et al [53]. Very interestingly, Rapino et al recently demonstrated that codon biases are not sufficient to explain the U₃₄ enzyme-dependent effect on translation [91]. Indeed, they demonstrate that U₃₄ enzyme-dependent effect on translation depend on the presence in nascent peptides of hydrophilic amino acids, in particular charged amino acids [91]. It is proposed that stretches of hydrophilic amino acids can form intrinsically disordered domains (IDR) that can form co-translational aggregates when translation elongation is disturbed and/or that can cross-react with the negative and positive charges of ribosomal RNAs and ribosomal proteins, respectively [91-93]. Thus, stretches of charged amino acids in nascent peptides could contribute to impair the ribosome dynamics when they go through sub-optimal codons such as the AAA, GAA and CAA codons [91]. Collectively, the *CTU2*- and the charged amino acid-depending effects would explain why among the sub-optimal codons enriched in MAPKi-downregulated mRNAs, those ending with A and coding for charged amino acids, namely the AAA, GAA and CAA codons are the most enriched in particular in mRNAs those TDD increased in response to MAPKi (Figures 1G, 2C and 3B).

To summarize, the compositional biases of BRAFi-downregulated mRNAs could be explained by the additive effect of several interdependent parameters. In terms of amino acid compositional biases, the decrease of glutamate- and aspartate-intracellular concentration could trigger the slowing down of ribosomes when they encounter regions enriched for these amino acids. The slowing down of ribosomes would be even more pronounced when the nascent peptide chains contain successions of charged amino acids cross-reacting with ribosomes. In terms of codons, those corresponding to the above-mentioned amino acids would be enriched especially those being suboptimal, i.e. those ending with an A, due to the already reported effect of MAPK pathway on codon optimality that is potentially dependent on the CCR4-NOT complex and the U₃₄ enzymes.

As mentioned in the Introduction, the biological properties and activities of proteins – without being summarized by – emerge from the physicochemical properties of their amino acid composition. As a matter of fact, proteins with different biological properties and activities have different amino acid compositional biases (see Introduction). For example, as illustrated in Figure 6 and as already reported, proteins involved in nucleic acid metabolism, and in particular in DNA-replication and -repair, are enriched in hydrophilic amino acids – contributing to their solubility – and in particular in charged-amino acids – contributing to protein-nucleic acid interactions. The link between protein-composition biases and protein-functions implies two hypotheses with respect to our results. The first hypothesis, which derives from the concept of a “genetic programs”, is that the MAPK pathway was selected during evolution based on its “functional effects”, i.e., based the cellular functions, such as proliferation, that the MPAK pathway regulates. Because proteins involved in proliferation have compositional biases, the compositional biases that we observed could be a consequence of the fact that the MAPK pathway regulates this cellular function. Although attractive, this hypothesis would not explain the link between composition biases of MAPKi-regulated proteins and the MAPKi-depend effect on amino acid bioavailability. It would only be by chance that MAPKi decreases the availability of amino acids that the genes that MAPKi otherwise and independently represses need. In other words, by focusing on the gene

functions, the concept of “genetic programs” forces to decouple the different cellular activities, i.e. cell metabolism and biological functions depending on gene expression regulation (see Introduction).

A second hypothesis is that mRNA/protein-compositional biases establish a direct link between regulation and function. More precisely, from the view point of mRNA/protein-compositional biases, biological-regulation and biological -functions are two sides of the same coin explaining why biological functions are regulated by the cell resources. Thus, the decrease in the bioavailability of amino acids such as aspartate and glutamate – which are used either for the synthesis of protein- and nucleic acid-building blocks or for the production of ATP molecules (i.e. energy) – implies that when these amino acids are used to generate sufficient energy to survive they become limiting for the biogenesis of aspartate- and glutamate-enriched proteins, including those involved in proliferation, which concomitantly saves energy. Thus, considering gene product composition biases help to explain how cellular resources regulate in a straightforward manner cellular biological function without the need of deterministic genetic programs. From the view point of compositional biases, the decrease of the expression of genes involved in cell proliferation is somehow a side effect of the “metabolic choice” made by the cells. And consequently, some low proliferative cells could emerge in response to MAPKi just because they survive by fully degrading some amino acids to generate energy instead of using them to generate protein- and nucleic acid-building blocks.

From the view point of compositional biases as well, another secondary effect of the MAPKi-induced “cell decision” on metabolism would be the emergence of cells expressing a low level of genes those products contribute to the so-called “DNA repair”. As a consequence, the cell survival relying on the use of amino acids to generate energy through oxidative phosphorylation, would increase the probability of DNA “damages” while decreasing “DNA repair”, which collectively would increase the probability that mutated cells emerge if some low proliferative cells manage to replicate at certain point. To conclude, the emergence of persistent cells and subsequent resistant clones would be a consequence of survival-

associated metabolic changes induced by MAPKi and potentially other anti-cancer therapies as already proposed [74, 94-99]. This would in turn explain why resistance to anti-cancer therapies is the rule.

4.6 - Materials and Methods

Cell culture

A375 cells were obtained from ATCC and cultured in DMEM (Gibco, 10938025) containing all amino-acids except glutamine and supplemented with 10% FBS, 2mM glutamine and penicillin-streptomycin, at 37°C and 5% CO₂. Cells were passed at around 80% confluency, 3 times a week. For the glutamine depletion experiment, the medium was not supplemented with glutamine. Cells were plated and the following day, the culture medium was removed and replaced with fresh medium containing 500 nM of vemurafenib and 500 nM of cobimetinib (Euromedex, SE-S8041).

Persister cells

Cells were plated and the following day, the culture medium was removed and replaced with fresh medium containing 1μM vemurafenib and cobimetinib (500nM vemurafenib + 500nM cobimetinib) or DMSO, in 3 identical batches A B C. 3 days after treatment, batch A cells were harvested (D0 samples), and batches B and C cells were washed with warm PBS and had their medium replaced with fresh drug-free DMEM for recovery. 2 days after this, batch B cells were harvested (D2 samples), while batch C cells were harvested after 9 days of recovering (D9 samples).

TDD experiment

Cells were plated and the following day, the culture medium was removed and replaced with fresh medium containing 1μM vemurafenib and cobimetinib (500nM vemurafenib + 500nM cobimetinib) or DMSO. 18h later, cells were treated with fresh cycloheximid (100μg/ml) or DMSO. 5 minutes later, cells were treated with tryptolide (25μM)

or DMSO, making a total of $2 \times 2 \times 2 = 8$ samples so far. This was prepared in 4 identical batches A B C D, and batch A was immediately harvested after +/- tryptolide treatment (T0 samples). Batches B, C and D were harvested 1h, 3h and 5h later, respectively (samples T1, T3 and T5).

siRNA transfections

For each gene of interest, 2 different siRNAs targetting constitutive exons and with minimum predicted off-targets were designed and pooled together. siRNAs were ordered lyophilysed from Merck and resuspended in sterile water at 50 μ M, and stored at -20°C. Cells were reverse-transfected with lipofectamine RNAimax (Thermofischer 13778030) according to the manufacturer's instructions,

Cells harvesting

Cells were washed twice with ice cold PBS, then scrapped with 1ml of PBS. Then they were centrifuged (500g for 1min at 4°C) and slowly resuspended in 1ml of lysis buffer (10mM Tris-HCL pH7.5; 5mM MgCl₂; 100 mM KCl; 1% Triton X-100), and incubated on ice for 10 minutes. After this, lysates were centrifuged (1000g for 10minutes at 4°C), and the cytoplasmic supernatants were used for the subsequent experiments.

RNA Extraction

RNAs were extracted from cytoplasmic fractions using tri-reagent (Sigma, T9424) following the manufacturer's instructions.

qRT-PCR

1 μ g of extracted RNAs were retro-transcribed using the Maxima First Strand Synthesis Kit (ThermoFischer, K167), following the manufacturer's instructions. Obtained cDNAs were then diluted 20 times with qPCR grade water (corresponding to 2.5ng/ μ l of starting RNA material). Primers pairs were designed on constitutive exons of targeted genes, pooled by pairs and diluted to 2.5 μ M. qPCR reactions were then run in triplicates on a LightCycler 480

(Roche) in 10µL reactions, following the manufacturer's instructions (5µL of 2X TB Green Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus, Takara), 2µl of diluted primers, and 3µl of diluted cDNAs).

Ribosome Profiling

Ribosome profiling experiments were prepared as described in (Labaronne et. al 2022) with a few modifications. Briefly: cells were harvested as described above, excepted that the PBS and lysis buffer were supplemented with 100µg/ml cycloheximide (Sigma, 01810) and 2mM DTT the day of use. 260nm absorbance of the lysate was measured to estimate the total quantity of material and then subjected to nuclease digestion. For 5 units of A260 absorbance, 6µl of MNase (Nuclease S7 10107921001, Roche, 1mg/ml) were added to the lysate, along with CaCl₂ to a final concentration of 10mM. The tubes were then incubated at 25°C for 30 minutes and transferred on ice, and the digested lysates were then carefully laid on top of 10%-50% sucrose gradients containing cycloheximide (100µg/ml). The gradients were then ultra-centrifuged at 35,000 rpm for 2h40min at 4°C and run on a fraction collector. The fractions containing the digested monosome fragments (80S) were kept and SDS was added to a final concentration of 1%, before the digestion with proteinase K (Roche, 03115828001, final concentration of 2µg/ml) for 45min at 42°C. Protected RNA fragments were then purified using an acidic phenol-chloroform extraction (Fishcer, BP1753I) and precipitated overnight at -20°C with 0.1x volume of sodium acetate (3 M, pH 5.2), 1x vol isopropanol, 1µl GlycoBlue and 10mM MgCl₂ (use 10mM MgCl₂ at every precipitation step, helps to recover smaller nucleic acids). Purified RNA fragments were then 3'-end dephosphorylated using PNK and run on a 10% acrylamide denaturing gel, and smears of interest (26-32bp) were cut from the gel and purified. Size-selected fragments were then rRNA-depleted by hybridization using RNA probes, and successively RNase H and DNase-treated, and purified with a new phenol-chloroform extraction before the Omniprep Library preparation.

Omniprep library preparation

An adaptor sequence is ligated to RNAs, before being retrotranscribed with barcoded primers. The barcoded cDNAs are then size-selected on a 10% denaturing acrylamide gel, and

purified before a circularization step (CircLigase, Lucigen). After this, the libraries are amplified with barcoded primers with a few PCR cycles (5-8) using a high-fidelity polymerase (Q5, NEB). Amplified libraries were finally size-selected on a non-denaturing 8% acrylamide gel, purified and their quality and concentrations assessed using Tapestation DNA 1000 screentapes.

Sequencing

Ribosome profiling Omniprep libraries were sequenced by GenomEast (Hiseq 4000 1x50bp). RNA samples from the very same experiment, as well as RNA samples from persister cells experiment were sent for sequencing at Novogene (rRNA depletion library preparations, sequencing on Novaseq 6000 2x150). We prepared QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit (Lexogen, LEX113.96) libraries from RNA samples of the TDD, siRNA and amino acid depletions experiments, following the manufacturer's instructions. 500ng of RNA were spiked-in with 1µL of a 1:100 dilution of ERCC Spike-In Mix (ThermoFisher, 4456740) before the library preparation. Libraries were then quantified, pooled and sent for sequencing at Novogene (Novaseq 6000 2x150).

Amino acid analysis

Cytoplasmic lysates prepared as described above were sent for analysis to different companies (AltaBioscience, Xell).

Annotation

Bioinformatics analyses on this project were performed using the GRCh38.p13 assembly and annotation provided by the NCBI (https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/refseq/vertebrate_mammalian/Homo_sapiens/all_assembly_versions/GCF_000001405.39_GRCh38.p13/). Only coding genes located on primary assembly chromosomes with at least one coding sequence (CDS), one start and stop codon were kept in the annotation. Merged genes were discarded from the annotation. CDSs overlapping several exons, with an ambiguous coding frame or containing a stop codon were filtered out. A total of 19143 coding genes and 196652 CDS were selected for further analyses.

In the following analyses the mRNAs are considered to be the concatenation of the CDSs of a gene, thus a gene is associated with one mRNA only.

RNA-seq and QuantSeq analyses

Adapters were removed from raw reads and trimmed using fastp version 0.20.1 with parameters `--qualified_quality_phred 30, -l 25, --detect_adapter_for_pe` for RNAseq data and with parameters `--qualified_quality_phred 20 -3 --cut_tail_window_size 10 --adapter_sequence=AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA --adapter_sequence=AAAAAA` for QuantSeq data. Reads were mapped against the human genome GRCh38.p13 with hisat2 version 2.2.1. They were counted on our filtered annotation using htseq-count version 0.13.5. Then, a differential expression analysis was performed using the DESeq2 package.

Ribosome profiling analyses

Adapters were removed from raw reads using cutadapt version 2.1 with the parameters `-a AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC -u 13 --maximum-length=40 --minimum-length=20 -q 28,28` for Ribo-Seq data and parameters `-a AGATCGGAAGAG -g CTCTTCCGATCT -A AGATCGGAAGAG -G CTCTTCCGATCT` for RNA-seq data. After that, a trimming step was performed using UrQt version 1.0.18, and reads were mapped to GRCh38.p13 genes sequences using hisat2 version 2.2.1 with parameters `--rna-strandness 'F' --norc` for Ribo-Seq data. Next, alignment files were converted, with deeptools version 3.0.2, to bigWig files containing CPM (count per million mapped reads) normalized coverage at one nucleotide resolution. Then, a peak calling step and a statistical analysis were performed to check if ribosome peaks have a codon compositional bias or if peptides encoded in peak regions have an amino acid bias (see sections below).

Peak calling analyses

For a replicate i , and a gene G , a normalized coverage $cNorm$ was computed for a test T and a control C condition using the following formula:

$$cNorm = \frac{coverage_{ribo}(G_i)}{coverage_{rna}(G_i)}$$

Where $coverage_{ribo}$ was obtained from Ribo-Seq data and $coverage_{rna}$ was obtained from RNA-seq data. Nucleotide positions where no coverage was detected from RNA-seq data were skipped. Then, the difference $cDiff_i$ between normalized coverage in T and C condition was computed for each replicate i . Thus, for a number N of replicates we got a set of coverage $CDIFF$ per replicates:

$$CDIFF = \{cDiff_1, \dots, cDiff_i, \dots, cDiff_N\}$$

Then, the average coverage $cMean = \{cMean_0, \dots, cMean_p, \dots, cMean_{L-1}\}$ at each CDS position p of a gene G of length L was computed between replicates, where $cMean_p$ was computed as follow:

$$cMean_p = \frac{\sum_{i=1}^N cDiff_{i,p}}{N}, \forall 0 \leq p < L; p \in CDS$$

Next, the average coverage $MeanCov$ and standard error $StdMean$ were computed for the gene G and a coverage threshold T was defined with $T = MeanCov + (StdMean) \times 3$, where $MeanCov$ and $StdMean$ were computed using the formulas:

$$MeanCov = \frac{\sum_{p=0}^{L-1} cMean_p}{L} \quad StdMean = \sqrt{\frac{\sum_{p=0}^{L-1} (cMean_p - MeanCov)^2}{L}}$$

Each region where $cMean$ was above T was considered as a peak. Peaks inside CDS with an average coverage below 3, across RNA-seq replicates, were removed. Peaks defined by a region where the average RNA-seq coverage was below 3 were discarded. A score was given for each peak, beginning at a position s and ending at a position e in a gene. Only peaks with a score above 3 were kept. The score was computed using the formula below:

$$Score = \left(\frac{\sum_{p=s}^e cMean_p}{(e-s)T} - 1 \right) \times 100$$

One analysis was done by taking the MAPKi or glutamine deprived condition as the test condition and the DMSO or untreated condition as the control condition respectively. For each analysis performed with this method another one was carried out by reversing the control and test condition.

Statistical analysis of peaks

To test whether a set of peaks P had a codon compositional bias or if peptides encoded in peak regions had an amino acid bias a randomization test was done. 10,000 sets of control peaks C similar to P (same peak number and peak size) located in CDS were sampled. Then, for each peak of P and C the frequency of a given feature X (*i.e.* codon or encoded amino acid) was computed using the formula: $Freq(X) = Count(X)/s$ where $Count(X)$ is the number of X in a peak and s is the total number of codons in this peak. Then, the average frequency of X , $Mean_X$, was computed for P and the 10,000 sets of C $MEAN_C = \{Mean_{C1}, \dots, Mean_{C10000}\}$. To calculate an empirical P-value, the number of control frequencies $Mean_{Ci}$ upper or equal or lower or equal than the frequency $Mean_X$ was determined. Then, the smaller number between those two was kept and divided by the number of control peak sets (*i.e.* 10,000). Note that the p-value cannot be lower than 1 / 10,000. The p-value was then corrected using the Benjamini–Hochberg procedure.

Compositional bias analysis

To test whether the codon content of different sets of genes was different (Figure 1G, 1H, 5C, 2G and 6B to E left panel, 4D and G bottom panel) the frequencies of each codon in genes according to their size and set was modeled with a generalized linear model for the beta distribution with zero inflation (with R `glmmTMB` function of the `glmmTMB` package). Then, a pairwise comparison for the ‘set’ factor was done (with R `emmeans` and `pairs` functions of the `emmeans` package). The same procedure was applied to test whether the amino acid content of different sets of proteins was different (Figure 1C, 1E, 5B, 2G and 6B to E right panel, 4D and G bottom panel). This procedure was also applied for the Figure 1D and S1C between MAPKi-downregulated mRNAs and expressed mRNAs and MAPKi-upregulated mRNA and

expressed mRNA respectively. Then, the relative frequency of a feature X was computed as follow:

$$Refreq(X) = \frac{Freq(X)_t - Freq(X)_c}{Freq(X)_c}$$

Where $Freq(X)_t$ is the average frequency of a codon or amino acid X in a test set of mRNAs or proteins and $Freq(X)_c$ is the average frequency of a codon X or amino acid X encoded by this codon in a the set of mRNA Expressed in A375 cells.

TDD index analysis

Raw reads of TDD experiment were preprocessed in the same way as described in section ‘RNA-seq and QuantSeq analyses’ for RNA-seq data. Only the differential analysis step differs. From the raw count tables obtained with htseq-count, the CPM was computed for each gene. Then, we searched genes with a stable expression in MAPKi and DMSO condition. A gene was considered as stable if 1) its CPM count is at least 0,2 in initial condition, 2) its CPM count after 3h or 5h hours of transcription inhibitor treatment is at least 10% greater than its CPM at initial condition and 3) its CPM at initial condition is greater than 10% of its CPM after 3h or 5h hours of transcription inhibitor treatment. Only genes that are stable in all replicates for the MAPKi and and DMSO condition are kept. Those stable genes were used as normalization factors in DESeq2 package to normalize reads counts. The TDD index was computed, for each mRNA produced by a gene G using the following formula:

$$TTDindex = \frac{R_{Tci+Tli,t} - R_{Tci,t}}{R_0}$$

Where R_0 is the normalized number of G reads at 0h (initial condition), $R_{Tci+Tli,t}$ is the normalized number of G reads after t hour of exposition to a transcription (Tci) and a translation inhibitor (Tli) and $R_{Tci,t}$ is the normalized number of G reads after t hour of exposition to a Tci. The TDD index was computed, for mRNA each replicate, with $t = 3$ and $t = 5$ for cell treated with MAPKi and DMSO. The TDD index according to the condition (MAPKi or DMSO), the time (5 or 3 hours) and the replicate was modeled using a linear model (in R

function `lm`) for each mRNA. With those models, a student test was computed in order to test if the TDD index of a mRNA was increased or decreased in MAPKi condition when compared to DMSO condition.

Intracellular amino acid concentration

To test whether the intracellular amino acid concentration was different between two groups of cells, a linear model was built (with R, `lm` function) with the following formula:

$$\text{Concentration} \sim \text{Condition} * \text{AA} + \text{Rep}$$

Where *Concentration* is the log-transformed or square root-transformed concentration of amino acids when DMSO-treated cells and MAPKi-treated cells are compared or when control cells and glutamine depleted cells are compared respectively. Then, a pairwise comparison for the 'condition' factor was done (with R `emmeans` and `contrast` functions of the `emmeans` package) using this model.

Functional enrichment analysis

The gene ontology (GO) enrichment analysis was performed using DAVID website (<https://david.ncifcrf.gov/>).

Heatmaps

An annotation file containing GO terms and a gene association file (that links proteins to their most specific go terms) were downloaded from <http://geneontology.org/>. We developed an homemade tool to extract all proteins associated with the following GO terms: GO:0051301 (Cell division), GO:0000776 (Kinetochore), GO:0006281 (DNA repair). Proteins associated with child terms of these 4 GO terms were also treated as belonging to these terms. Only child terms linked to their parents with the qualifiers 'involved_in', 'located_in', 'is_active_in', or 'part_of', were considered. Next, proteins associated with the Uniprot keywords KW-0131 (Cell Cycle), KW-0137 (Centromere) and KW-0227 (DNA damage) were downloaded from <https://www.uniprot.org/keywords/> website. Only reviewed human

proteins were kept. Then, the average frequency of each amino acid in those six lists of proteins was calculated using FasterDB (<http://fasterdb.ens-lyon.fr/faster/home.pl>) that is based on hg19 annotation. 10,000 sets of proteins were randomly sampled for each list of proteins and the average frequency of each amino acid for each set was computed. Finally, an empirical p-value was computed for an amino acid X in a given protein list P as:

$$P_{emp} = \frac{\min(k, l) + 1}{10,000 + 1}$$

Where k is the number of control sets with an average frequency of X higher or equal to P and l is the number of control sets with an average frequency of X lower or equal to P . For each list of proteins, the p-value were corrected using the Benjamini-Hotchberg procedure and then transformed using the following formula: $T = 1 - P_{adj} \times s$.

Where P_{adj} is the corrected p-value and $s = 1$ if $k > l$; $s = -1$ otherwise.

4.7 - References

1. Hansberg W: A critical analysis on the conception of "Pre-existent gene expression programs" for cell differentiation and development. *Differentiation* 2022, 125:1-8.
2. McKenna KZ, Gawne R, Nijhout HF: The genetic control paradigm in biology: What we say, and what we are entitled to mean. *Prog Biophys Mol Biol* 2022, 169-170:89-93.
3. Nicholson DJ: Is the cell really a machine? *J Theor Biol* 2019, 477:108-126.
4. Peluffo AE: The "Genetic Program": Behind the Genesis of an Influential Metaphor. *Genetics* 2015, 200(3):685-696.
5. Pigliucci M: Genotype-phenotype mapping and the end of the 'genes as blueprint' metaphor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010, 365(1540):557-566.
6. Teschendorff AE, Feinberg AP: Statistical mechanics meets single-cell biology. *Nat Rev Genet* 2021, 22(7):459-476.
7. Mojtahedi M, Skupin A, Zhou J, Castano IG, Leong-Quong RY, Chang H, Trachana K, Giuliani A, Huang S: Cell Fate Decision as High-Dimensional Critical State Transition. *PLoS Biol* 2016, 14(12):e2000640.
8. Paldi A: What makes the cell differentiate? *Prog Biophys Mol Biol* 2012, 110(1):41-43.
9. Gandrillon O, Kolesnik-Antoine D, Kupiec JJ, Beslon G: Chance at the heart of the cell. *Prog Biophys Mol Biol* 2012, 110(1):1-4.
10. Paldi A: Stochastic gene expression during cell differentiation: order from disorder? *Cell Mol Life Sci* 2003, 60(9):1775-1778.
11. Kaern M, Elston TC, Blake WJ, Collins JJ: Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nat Rev Genet* 2005, 6(6):451-464.

12. Kurakin A: Self-organization versus Watchmaker: stochastic dynamics of cellular organization. *Biol Chem* 2005, 386(3):247-254.
13. Gapa L, Alfardus H, Fischle W: Unconventional metabolites in chromatin regulation. *Biosci Rep* 2022, 42(1).
14. Liu X, Zhang Y, Li W, Zhou X: Lactylation, an emerging hallmark of metabolic reprogramming: Current progress and open challenges. *Front Cell Dev Biol* 2022, 10:972020.
15. Boon R: Metabolic Fuel for Epigenetic: Nuclear Production Meets Local Consumption. *Front Genet* 2021, 12:768996.
16. Harvey A, Caretti G, Moresi V, Renzini A, Adamo S: Interplay between Metabolites and the Epigenome in Regulating Embryonic and Adult Stem Cell Potency and Maintenance. *Stem Cell Reports* 2019, 13(4):573-589.
17. Katada S, Imhof A, Sassone-Corsi P: Connecting threads: epigenetics and metabolism. *Cell* 2012, 148(1-2):24-28.
18. Walker MC, van der Donk WA: The many roles of glutamate in metabolism. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2016, 43(2-3):419-430.
19. Yelamanchi SD, Jayaram S, Thomas JK, Gundimeda S, Khan AA, Singhal A, Keshava Prasad TS, Pandey A, Somani BL, Gowda H: A pathway map of glutamate metabolism. *J Cell Commun Signal* 2016, 10(1):69-75.
20. Garcia-Bermudez J, Baudrier L, La K, Zhu XG, Fidelin J, Sviderskiy VO, Papagiannakopoulos T, Molina H, Snuderl M, Lewis CA *et al*: Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours. *Nat Cell Biol* 2018, 20(7):775-781.
21. Wang H, Zheng X, Liu B, Xia Y, Xin Z, Deng B, He L, Deng J, Ren W: Aspartate Metabolism Facilitates IL-1beta Production in Inflammatory Macrophages. *Front Immunol* 2021, 12:753092.

22. Melendez-Rodriguez F, Urrutia AA, Lorendeau D, Rinaldi G, Roche O, Bogurcu-Seidel N, Ortega Muelas M, Mesa-Ciller C, Turiel G, Bouthelier A *et al*: HIF1alpha Suppresses Tumor Cell Proliferation through Inhibition of Aspartate Biosynthesis. *Cell Rep* 2019, 26(9):2257-2265 e2254.
23. Eniafe J, Jiang S: The functional roles of TCA cycle metabolites in cancer. *Oncogene* 2021, 40(19):3351-3363.
24. Loayza-Puch F, Rooijers K, Buil LC, Zijlstra J, Oude Vrielink JF, Lopes R, Ugalde AP, van Breugel P, Hofland I, Wesseling J *et al*: Tumour-specific proline vulnerability uncovered by differential ribosome codon reading. *Nature* 2016, 530(7591):490-494.
25. Kay EJ, Paterson K, Riera-Domingo C, Sumpton D, Dabritz JHM, Tardito S, Boldrini C, Hernandez-Fernaund JR, Athineos D, Dhayade S *et al*: Cancer-associated fibroblasts require proline synthesis by PYCR1 for the deposition of pro-tumorigenic extracellular matrix. *Nat Metab* 2022, 4(6):693-710.
26. Bacigalupa ZA, Rathmell WK: Upcycling the TCA cycle-rewiring tumour-associated fibroblasts. *Nat Metab* 2021, 3(11):1439-1440.
27. Kay EJ, Koulouras G, Zanivan S: Regulation of Extracellular Matrix Production in Activated Fibroblasts: Roles of Amino Acid Metabolism in Collagen Synthesis. *Front Oncol* 2021, 11:719922.
28. Shen L, Yu Y, Zhou Y, Pruett-Miller SM, Zhang GF, Karner CM: SLC38A2 provides proline to fulfill unique synthetic demands arising during osteoblast differentiation and bone formation. *Elife* 2022, 11.
29. Vernone A, Ricca C, Merlo D, Pescarmona G, Silvagno F: The analysis of glutamate and glutamine frequencies in human proteins as marker of tissue oxygenation. *R Soc Open Sci* 2019, 6(4):181891.

30. Loayza-Puch F, Rooijers K, Zijlstra J, Moumbeini B, Zaal EA, Oude Vrielink JF, Lopes R, Ugalde AP, Berkers CR, Agami R: TGFbeta1-induced leucine limitation uncovered by differential ribosome codon reading. *EMBO Rep* 2017, 18(4):549-557.
31. Passarelli MC, Pinzaru AM, Asgharian H, Liberti MV, Heissel S, Molina H, Goodarzi H, Tavazoie SF: Leucyl-tRNA synthetase is a tumour suppressor in breast cancer and regulates codon-dependent translation dynamics. *Nat Cell Biol* 2022, 24(3):307-315.
32. Thandapani P, Kloetgen A, Witkowski MT, Glytsou C, Lee AK, Wang E, Wang J, LeBoeuf SE, Avrampou K, Papagiannakopoulos T *et al*: Valine tRNA levels and availability regulate complex I assembly in leukaemia. *Nature* 2022, 601(7893):428-433.
33. Banh RS, Biancur DE, Yamamoto K, Sohn ASW, Walters B, Kuljanin M, Gikandi A, Wang H, Mancias JD, Schneider RJ *et al*: Neurons Release Serine to Support mRNA Translation in Pancreatic Cancer. *Cell* 2020, 183(5):1202-1218 e1225.
34. Kampen KR, Fancello L, Girardi T, Rinaldi G, Planque M, Sulima SO, Loayza-Puch F, Verbelen B, Vereecke S, Verbeeck J *et al*: Translatome analysis reveals altered serine and glycine metabolism in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Nat Commun* 2019, 10(1):2542.
35. Darnell AM, Subramaniam AR, O'Shea EK: Translational Control through Differential Ribosome Pausing during Amino Acid Limitation in Mammalian Cells. *Mol Cell* 2018, 71(2):229-243 e211.
36. Pavlova NN, King B, Josselson RH, Violante S, Macera VL, Vardhana SA, Cross JR, Thompson CB: Translation in amino-acid-poor environments is limited by tRNA(Gln) charging. *Elife* 2020, 9.
37. Mazor KM, Dong L, Mao Y, Swanda RV, Qian SB, Stipanuk MH: Effects of single amino acid deficiency on mRNA translation are markedly different for methionine versus leucine. *Sci Rep* 2018, 8(1):8076.

38. Veltri AJ, D'Orazio KN, Lessen LN, Loll-Krippelber R, Brown GW, Green R: Distinct elongation stalls during translation are linked with distinct pathways for mRNA degradation. *Elife* 2022, 11.
39. Morris C, Cluet D, Ricci EP: Ribosome dynamics and mRNA turnover, a complex relationship under constant cellular scrutiny. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2021, 12(6):e1658.
40. Heck AM, Wilusz J: The Interplay between the RNA Decay and Translation Machinery in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018, 10(5).
41. Pelechano V, Wei W, Steinmetz LM: Widespread Co-translational RNA Decay Reveals Ribosome Dynamics. *Cell* 2015, 161(6):1400-1412.
42. Bae H, Collier J: Codon optimality-mediated mRNA degradation: Linking translational elongation to mRNA stability. *Mol Cell* 2022, 82(8):1467-1476.
43. Presnyak V, Alhusaini N, Chen YH, Martin S, Morris N, Kline N, Olson S, Weinberg D, Baker KE, Graveley BR *et al*: Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* 2015, 160(6):1111-1124.
44. Mishima Y, Han P, Ishibashi K, Kimura S, Iwasaki S: Ribosome slowdown triggers codon-mediated mRNA decay independently of ribosome quality control. *EMBO J* 2022, 41(5):e109256.
45. Hia F, Yang SF, Shichino Y, Yoshinaga M, Murakawa Y, Vandenbon A, Fukao A, Fujiwara T, Landthaler M, Natsume T *et al*: Codon bias confers stability to human mRNAs. *EMBO Rep* 2019, 20(11):e48220.
46. Wu Q, Medina SG, Kushawah G, DeVore ML, Castellano LA, Hand JM, Wright M, Bazzini AA: Translation affects mRNA stability in a codon-dependent manner in human cells. *Elife* 2019, 8.
47. Hanson G, Collier J: Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018, 19(1):20-30.

48. Saikia M, Wang X, Mao Y, Wan J, Pan T, Qian SB: Codon optimality controls differential mRNA translation during amino acid starvation. *RNA* 2016, 22(11):1719-1727.
49. Gillen SL, Waldron JA, Bushell M: Codon optimality in cancer. *Oncogene* 2021, 40(45):6309-6320.
50. Bazzini AA, Del Viso F, Moreno-Mateos MA, Johnstone TG, Vejnar CE, Qin Y, Yao J, Khokha MK, Giraldez AJ: Codon identity regulates mRNA stability and translation efficiency during the maternal-to-zygotic transition. *EMBO J* 2016, 35(19):2087-2103.
51. Rashad S, Byrne SR, Saigusa D, Xiang J, Zhou Y, Zhang L, Begley TJ, Tominaga T, Niizuma K: Codon Usage and mRNA Stability are Translational Determinants of Cellular Response to Canonical Ferroptosis Inducers. *Neuroscience* 2022, 501:103-130.
52. Martin S, Allan KC, Pinkard O, Sweet T, Tesar PJ, Collier J: Oligodendrocyte differentiation alters tRNA modifications and codon optimality-mediated mRNA decay. *Nat Commun* 2022, 13(1):5003.
53. Rapino F, Delaunay S, Rambow F, Zhou Z, Tharun L, De Tullio P, Sin O, Shostak K, Schmitz S, Piepers J *et al*: Codon-specific translation reprogramming promotes resistance to targeted therapy. *Nature* 2018, 558(7711):605-609.
54. Aharon-Hefetz N, Frumkin I, Mayshar Y, Dahan O, Pilpel Y, Rak R: Manipulation of the human tRNA pool reveals distinct tRNA sets that act in cellular proliferation or cell cycle arrest. *Elife* 2020, 9.
55. Torrent M, Chalancon G, de Groot NS, Wuster A, Madan Babu M: Cells alter their tRNA abundance to selectively regulate protein synthesis during stress conditions. *Sci Signal* 2018, 11(546).
56. Gingold H, Tehler D, Christoffersen NR, Nielsen MM, Asmar F, Kooistra SM, Christophersen NS, Christensen LL, Borre M, Sorensen KD *et al*: A dual program for translation regulation in cellular proliferation and differentiation. *Cell* 2014, 158(6):1281-1292.

57. Cascarina SM, Ross ED: Proteome-scale relationships between local amino acid composition and protein fates and functions. *PLoS Comput Biol* 2018, 14(9):e1006256.
58. Zhao B, Kurgan L: Compositional Bias of Intrinsically Disordered Proteins and Regions and Their Predictions. *Biomolecules* 2022, 12(7).
59. Harrison PM: Exhaustive assignment of compositional bias reveals universally prevalent biased regions: analysis of functional associations in human and Drosophila. *BMC Bioinformatics* 2006, 7:441.
60. Karlin S, Brocchieri L, Bergman A, Mrazek J, Gentles AJ: Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(1):333-338.
61. Bigman LS, Iwahara J, Levy Y: Negatively Charged Disordered Regions are Prevalent and Functionally Important Across Proteomes. *J Mol Biol* 2022, 434(14):167660.
62. Zarin T, Strome B, Peng G, Pritisanac I, Forman-Kay JD, Moses AM: Identifying molecular features that are associated with biological function of intrinsically disordered protein regions. *Elife* 2021, 10.
63. Kurotani A, Tokmakov AA, Sato KI, Stefanov VE, Yamada Y, Sakurai T: Localization-specific distributions of protein pI in human proteome are governed by local pH and membrane charge. *BMC Mol Cell Biol* 2019, 20(1):36.
64. Chasapis CT, Konstantinoudis G: Protein isoelectric point distribution in the interactomes across the domains of life. *Biophys Chem* 2020, 256:106269.
65. Wang HC, Chou CC, Hsu KC, Lee CH, Wang AH: New paradigm of functional regulation by DNA mimic proteins: Recent updates. *IUBMB Life* 2019, 71(5):539-548.
66. Pavlova NN, Zhu J, Thompson CB: The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metab* 2022, 34(3):355-377.

67. Avagliano A, Fiume G, Pelagalli A, Sanita G, Ruocco MR, Montagnani S, Arcucci A: Metabolic Plasticity of Melanoma Cells and Their Crosstalk With Tumor Microenvironment. *Front Oncol* 2020, 10:722.
68. Yoo HC, Yu YC, Sung Y, Han JM: Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp Mol Med* 2020, 52(9):1496-1516.
69. Falletta P, Goding CR, Vivas-Garcia Y: Connecting Metabolic Rewiring With Phenotype Switching in Melanoma. *Front Cell Dev Biol* 2022, 10:930250.
70. Chen C, Wang Z, Qin Y: Connections between metabolism and epigenetics: mechanisms and novel anti-cancer strategy. *Front Pharmacol* 2022, 13:935536.
71. Huo M, Zhang J, Huang W, Wang Y: Interplay Among Metabolism, Epigenetic Modifications, and Gene Expression in Cancer. *Front Cell Dev Biol* 2021, 9:793428.
72. Izzo LT, Affronti HC, Wellen KE: The Bidirectional Relationship Between Cancer Epigenetics and Metabolism. *Annu Rev Cancer Biol* 2021, 5(1):235-257.
73. Crispo F, Condelli V, Lepore S, Notarangelo T, Sgambato A, Esposito F, Maddalena F, Landriscina M: Metabolic Dysregulations and Epigenetics: A Bidirectional Interplay that Drives Tumor Progression. *Cells* 2019, 8(8).
74. Karki P, Angardi V, Mier JC, Orman MA: A Transient Metabolic State in Melanoma Persister Cells Mediated by Chemotherapeutic Treatments. *Front Mol Biosci* 2021, 8:780192.
75. Alkaraki A, McArthur GA, Sheppard KE, Smith LK: Metabolic Plasticity in Melanoma Progression and Response to Oncogene Targeted Therapies. *Cancers (Basel)* 2021, 13(22).
76. Karki P, Sensenbach S, Angardi V, Orman MA: BRAF-Inhibitor-Induced Metabolic Alterations in A375 Melanoma Cells. *Metabolites* 2021, 11(11).

77. Bristot IJ, Kehl Dias C, Chapola H, Parsons RB, Klamt F: Metabolic rewiring in melanoma drug-resistant cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 2020, 153:102995.
78. Peterson J, Li S, Kaltenbrun E, Erdogan O, Counter CM: Expression of transgenes enriched in rare codons is enhanced by the MAPK pathway. *Sci Rep* 2020, 10(1):22166.
79. Wasinger C, Hofer A, Spadiut O, Hohenegger M: Amino Acid Signature in Human Melanoma Cell Lines from Different Disease Stages. *Sci Rep* 2018, 8(1):6245.
80. Ratnikov BI, Scott DA, Osterman AL, Smith JW, Ronai ZA: Metabolic rewiring in melanoma. *Oncogene* 2017, 36(2):147-157.
81. Haq R, Fisher DE, Widlund HR: Molecular pathways: BRAF induces bioenergetic adaptation by attenuating oxidative phosphorylation. *Clin Cancer Res* 2014, 20(9):2257-2263.
82. Scott DA, Richardson AD, Filipp FV, Knutzen CA, Chiang GG, Ronai ZA, Osterman AL, Smith JW: Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. *J Biol Chem* 2011, 286(49):42626-42634.
83. Yang L, Venneti S, Nagrath D: Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng* 2017, 19:163-194.
84. Ratnikov B, Aza-Blanc P, Ronai ZA, Smith JW, Osterman AL, Scott DA: Glutamate and asparagine cataplerosis underlie glutamine addiction in melanoma. *Oncotarget* 2015, 6(10):7379-7389.
85. Alkan HF, Walter KE, Luengo A, Madreiter-Sokolowski CT, Stryeck S, Lau AN, Al-Zoughbi W, Lewis CA, Thomas CJ, Hoefler G *et al*: Cytosolic Aspartate Availability Determines Cell Survival When Glutamine Is Limiting. *Cell Metab* 2018, 28(5):706-720 e706.
86. Gorgoglione R, Impedovo V, Riley CL, Fratantonio D, Tiziani S, Palmieri L, Dolce V, Fiermonte G: Glutamine-Derived Aspartate Biosynthesis in Cancer Cells: Role of Mitochondrial Transporters and New Therapeutic Perspectives. *Cancers (Basel)* 2022, 14(1).

87. Helenius IT, Madala HR, Yeh JJ: An Asp to Strike Out Cancer? Therapeutic Possibilities Arising from Aspartate's Emerging Roles in Cell Proliferation and Survival. *Biomolecules* 2021, 11(11).
88. Song Z, Yang Y, Wu Y, Zheng M, Sun D, Li H, Chen L: Glutamic oxaloacetic transaminase 1 as a potential target in human cancer. *Eur J Pharmacol* 2022, 917:174754.
89. Zhou X, Curbo S, Li F, Krishnan S, Karlsson A: Inhibition of glutamate oxaloacetate transaminase 1 in cancer cell lines results in altered metabolism with increased dependency of glucose. *BMC Cancer* 2018, 18(1):559.
90. Buschauer R, Matsuo Y, Sugiyama T, Chen YH, Alhusaini N, Sweet T, Ikeuchi K, Cheng J, Matsuki Y, Nobuta R *et al*: The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality. *Science* 2020, 368(6488).
91. Rapino F, Zhou Z, Roncero Sanchez AM, Joiret M, Seca C, El Hachem N, Valenti G, Latini S, Shostak K, Geris L *et al*: Wobble tRNA modification and hydrophilic amino acid patterns dictate protein fate. *Nat Commun* 2021, 12(1):2170.
92. Charneski CA, Hurst LD: Positively charged residues are the major determinants of ribosomal velocity. *PLoS Biol* 2013, 11(3):e1001508.
93. Requiao RD, Fernandes L, de Souza HJA, Rossetto S, Domitrovic T, Palhano FL: Protein charge distribution in proteomes and its impact on translation. *PLoS Comput Biol* 2017, 13(5):e1005549.
94. Labrie M, Brugge JS, Mills GB, Zervantonakis IK: Therapy resistance: opportunities created by adaptive responses to targeted therapies in cancer. *Nat Rev Cancer* 2022, 22(6):323-339.
95. Ramirez M, Rajaram S, Steininger RJ, Osipchuk D, Roth MA, Morinishi LS, Evans L, Ji W, Hsu CH, Thurley K *et al*: Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nat Commun* 2016, 7:10690.

96. Turgeon MO, Perry NJS, Poulogiannis G: DNA Damage, Repair, and Cancer Metabolism. *Front Oncol* 2018, 8:15.
97. Sobanski T, Rose M, Suraweera A, O'Byrne K, Richard DJ, Bolderson E: Cell Metabolism and DNA Repair Pathways: Implications for Cancer Therapy. *Front Cell Dev Biol* 2021, 9:633305.
98. Cucchi D, Gibson A, Martin SA: The emerging relationship between metabolism and DNA repair. *Cell Cycle* 2021, 20(10):943-959.
99. Moretton A, Loizou JI: Interplay between Cellular Metabolism and the DNA Damage Response in Cancer. *Cancers (Basel)* 2020, 12(8).

4.8 - Figure legends

Figure 1

A. GO term statistical analysis of genes regulated in MAPKi-treated cells (TC) compared to control cells (CC).

B. Averaged-hydrophobicity index of proteins – divided into 100 bins – that were either encoded by MAPKi-upregulated mRNAs (in red) or by MAPKi-downregulated mRNAs (in blue). The red- and blue-background represent the variability of the hydrophobicity index insight each of the two protein groups. The black lines represent the statistical analysis (adjusted p-value < 0.05) computed at each position.

C. The x-axis corresponds to the relative frequency (%) of each amino acid computed from proteins encoded by MAPKi-upregulated mRNAs in comparison to the amino acid frequency in control proteins, i.e. proteins encoded by mRNAs expressed in the A375 cells. The y-axis corresponds to the relative frequency (%) of each amino acid computed from proteins encoded by the MAPKi-downregulated mRNAs in comparison to the amino acid frequency in the control proteins. * in red means that the frequency of an amino acid is statistically different (adjusted p-value < 0.05) when comparing proteins encoded by MAPKi-upregulated mRNAs to control proteins. * in blue means that the frequency of an amino acid is statistically different (adjusted p-value < 0.05) when comparing proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs to control proteins.

D. Relative frequency of amino acids in proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs compared to proteins encoded by MAPKi-upregulated mRNAs. The blue background means that an amino acid is more frequent in proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs compared to proteins encoded by MAPKi-upregulated mRNAs. The red background means that an amino acid is more frequent in proteins encoded by MAPKi-upregulated mRNAs compared to proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs. * means that the frequency

of an amino acid is statistically different (adjusted p-value < 0.05) when comparing the two protein groups.

E. Amino acid frequency in proteins encoded by MAPKi-upregulated mRNAs (red) or by MAPKi-downregulated mRNAs (blue). *** in blue means that amino acids are statistically (adjusted p-value<0.05) more frequent in proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs than in proteins encoded by MAPKi-upregulated mRNAs. *** in red means amino acids are statistically (adjusted p-value<0.05) more frequent in proteins encoded by MAPKi-upregulated mRNAs than in proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs.

F. Distribution curves of the proportion (density) of proteins encoded by MAPKi-upregulated mRNAs (red) or by MAPKi-downregulated mRNAs (blue) as a function of the frequency of lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), tryptophan (W), phenylalanine (F), or leucine (L).

G. The x-axis corresponds to the relative frequency (%) of each codon computed in MAPKi-upregulated mRNAs in comparison to control mRNAs, i.e., mRNAs expressed in A375 cells. The y-axis corresponds to the relative frequency (%) of each codon computed in MAPKi-downregulated mRNAs in comparison to control mRNAs. * in red means that the frequency of a codon is statistically different (adjusted p-value < 0.05) in the MAPKi-upregulated mRNAs compared to the control mRNAs. * in blue means that the frequency of a codon is statistically different (adjusted p-value < 0.05) in MAPKi-downregulated mRNAs compared to the control mRNAs. Green, red, orange, and blue dots represent A-, T-, G-, and C-ending codons, respectively.

H. Codon frequency in MAPKi-upregulated mRNAs (red) or in MAPKi-downregulated mRNAs (blue) mRNAs. *** in blue means that codons are statistically (adjusted p-value<0.05) more frequent in MAPKi-downregulated mRNAs when compared to MAPKi-upregulated mRNAs. *** in red means that codons are statistically (adjusted p-value<0.05) more frequent in MAPKi-upregulated mRNAs when compared to MAPKi-downregulated mRNAs.

Figure 2

A. A375 cells were grown for 24h hours in the absence (CC) or in the presence of MAPKi (TC) and were exposed to transcription inhibitors (Tc inhibitors or Tci) and/or to translation inhibitors (Ti inhibitors or Tli) for 0, 3, or 5 hours. The TDD index of each A375-expressed mRNA was computed by subtracting the normalized-number of reads (R) obtained in the presence of both Tci and Tli ($R(Tci + Tli)$) to the normalized-number of reads obtained in the presence of only Tci ($R(Tci)$). This subtraction was next divided by the initial normalized-number of reads (R_0).

B. The x-axis corresponds to the relative frequency (%) of each amino acid computed from proteins encoded by mRNAs those TDD index was decreased in comparison to control proteins, i.e. proteins encoded by mRNAs expressed in the A375 cells. The y-axis corresponds to the relative frequency (%) of each amino acid computed from proteins encoded by mRNAs those TDD index was increased in comparison to control proteins. * in red means that the frequency of an amino acid is statistically different (adjusted p-value < 0.05) when comparing proteins encoded by mRNAs those TDD index was decreased to control proteins. * in blue means that the frequency of an amino acid is statistically different (adjusted p-value < 0.05) when comparing proteins encoded by mRNAs those TDD index was decreased to control proteins.

C. The x-axis corresponds to the relative frequency (%) of each codon computed from mRNAs those TDD increased in comparison to control mRNAs, i.e., mRNAs expressed in A375 cells. The y-axis corresponds to the relative frequency (%) of each codon computed from mRNAs those TDD decreased in comparison to control mRNAs. * in red means that the frequency of a codon is statistically different (adjusted p-value < 0.05) in mRNAs those TDD decreased compared to the control mRNAs. * in blue means that the frequency of a codon is statistically different (adjusted p-value < 0.05) in mRNAs those TDD increased in comparison to control mRNAs. Green, red, orange, and blue dots represent A-, T-, G-, and C-ending codons, respectively.

D. On the left, the TDD index measured in control cells of each MAPKi-downregulated mRNA (x-axis) was plotted against their TDD index measured in MAPKi-treated cells (y-axis). On the right, the TDD index measured in control cells of each MAPKi-upregulated mRNAs (x-axis) was plotted against the TDD index measured in MAPKi-treated cells (y-axis). Grey dots represent mRNAs those TDD index was not statistically different (NS) when comparing treated cells to control cells. Black dots represent mRNAs those TDD index was statistically different (S, p -adjusted < 0.05) when comparing treated cells to control cells.

E. The relative frequency of amino acids computed from proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs (x-axis) was plotted against the relative frequency of amino acids computed from proteins encoded by mRNAs those TDD was increased (y-axis). * means that the frequency of an amino acid computed from proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs was statistically different (p -adjusted < 0.05) when compared to control proteins. ° means that the frequency of an amino acid computed from proteins encoded by mRNAs whose TDD increased was statistically different (p -adjusted < 0.05) when compared to control proteins.

F. The relative frequency of codons computed from MAPKi-downregulated mRNAs (x-axis) was plotted against the relative frequency of codons computed from mRNAs those TDD was increased (y-axis). * means that the frequency of a codon computed from MAPKi-downregulated mRNAs was statistically different (p -adjusted < 0.05) when compared to control mRNAs. ° means that the frequency of a codon computed from mRNAs whose TDD increased was statistically different (p -adjusted < 0.05) when compared to control mRNAs.

G. On the left, amino acid frequency in proteins encoded by control (CTRL) mRNAs, MAPKi-downregulated mRNAs those TDD increased, and MAPKi-downregulated mRNAs those TDD was not increased. On the right, codon frequency in control (CTRL) mRNAs, MAPKi-downregulated mRNAs those TDD increased, and MAPKi-downregulated mRNAs those TDD was not increased. *** means that the amino acid or codon frequency was statistically

different (adjusted p-value<0.05) by comparing two groups as indicated. NS: Not statically significant.

Figure 3

A. A375 cells were grown for 24h hours in the absence (CC) or in the presence of MAPKi (TC) before measuring the presence of ribosomal peaks in either control cells compared to treated cells (“CC peaks”) or in treated cells compared to control cells (“TC peaks”).

B. On the left, the x-axis corresponds to the relative frequency (%) of each amino acid computed from “CC peaks” and the y-axis corresponds to the relative frequency (%) of each amino acid computed from “TC peaks”. On the right, the x-axis corresponds to the relative frequency (%) of each codon computed from “CC peaks” and the y-axis corresponds to the relative frequency (%) of each codon computed from “TC peaks”. Green, red, orange, and blue dots represent A-, T-, G-, and C-ending codons, respectively. * in red means that the frequency of an amino acid or that of a codon is statistically different (adjusted p-value < 0.05) when comparing “CC peaks” to control peaks. * in blue means that the frequency of an amino acid or that of a codon is statistically different (adjusted p-value < 0.05) when comparing “TC peaks” to control peaks.

C. % of “TC peaks” (in blue) and “CC peaks” (in red) containing different numbers of lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), asparagine (N), alanine (A), or glycine (G) residues.

D. The TDD index measured in control cells of each MAPKi-downregulated mRNA containing TC peaks those TDD increased (x-axis) was plotted against the TDD index measured in MAPKi-treated cells (y-axis). Grey dots represent mRNAs those TDD index was not statistically different (NS) when comparing treated cells to control cells. Black dots represent mRNAs those TDD index was statistically different (S, p-adjusted < 0.05) when comparing treated cells to control cells.

E. The log2 fold change of the expression level of each MAPKi-downregulated mRNAs those TDD increased and that contained “TC peaks” (x-axis) was plotted against the TDD index

measured in MAPKi-treated cells (y-axis). On the left, red, green, blue, and black dots represent mRNAs whose frequency in lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), or at least 2 of these amino acids was higher in proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs those TDD increased and that contained “TC peaks” when compared to control proteins. On the right, red, green, blue, and black dots represent mRNAs whose frequency in AAA (K), GAA (E), GAT (D), or at least 2 of these codons was higher in MAPKi-downregulated mRNAs those TDD increased and that contained “TC peaks” when compared to control mRNAs.

Figure 4

A. Intracellular concentration of lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), asparagine (N), and glutamine (Q) in control cells (CC) and MAPKi-treated cells (TC). * p-value < 0.05.

B. Intracellular concentration of lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), asparagine (N), and glutamine (Q) in control cells (CC) and glutamine-deprived cells (-Q). * p-value < 0.05.

C. The log₂ fold change of the expression level of each MAPKi-downregulated mRNAs (x-axis) was plotted against the log₂ fold change of the corresponding mRNA in glutamine-deprived cells (y-axis). Black dots represent mRNAs those expression level was statistically decreased (p-adjusted < 0.05) when comparing glutamine-deprived cells to control cells.

D. In the upper panel, frequency (%) of glutamate (E), aspartate (D), and glutamine (Q) computed from proteins encoded by control mRNAs (CTRL) and by mRNAs downregulated in glutamine-deprived cells (Down (-Q)). In the lower, frequency of all codons corresponding to glutamate (E), aspartate (D), and glutamine (Q) in control mRNAs (CTRL) and in mRNAs downregulated in glutamine-deprived cells (Down (-Q)). *** means that the codon frequency was statistically different (adjusted p-value<0.05) when comparing two mRNA groups as indicated. NS: Not statically significant.

E. Relative frequency (%) of glutamate (E), aspartate (D), and glutamine (Q) in ribosomal peaks detected in glutamine-deprived cells compared to ribosomal peaks detected in control cells (upper panel). Relative enrichment (%) of the GAG, GAC, and CAG codons in

ribosomal peaks detected in glutamine-deprived cells compared to ribosomal peaks detected in control cells (lower panel). *** means that the amino acid or codon frequency was statistically different (adjusted p-value<0.05) when comparing the two groups.

F. The log2 fold change of the expression level of each MAPKi-downregulated mRNAs (x-axis) was plotted against the log2 fold change of their expression level in siCTU2-transfected cells compared to control cells (y-axis). Black dots represent mRNAs those expression level was statistically decreased (p-adjusted < 0.05) when comparing siCTU2-transfected cells to control cells.

G. In the upper panel, frequency (%) of lysine (K) and glutamate (E) computed from proteins encoded by control mRNAs (CTRL) and by mRNAs that were downregulated in siCTU2-transfected cells (Down siCTU2). In the lower panel, frequency of the AAA and GAA codons in control mRNAs (CTRL) and in mRNAs that were downregulated in siCTU2-transfected cells (Down siCTU2). *** adjusted p-value<0.05.

Figure 5

A. The log2 fold change of each MAPKi-downregulated mRNAs those TDD index was increased (x-axis) was plotted against the log2 fold change of their expression level when comparing persister cells (PC) to control cells (y-axis). Black dots represent mRNAs those expression level was statistically decreased (p-adjusted < 0.05) when comparing persister cells to control cells.

B. Frequency (%) of lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), and asparagine (N) computed from proteins encoded by control mRNAs (CTRL) and by mRNAs that were downregulated in persister cells (Down PC). *** adjusted p-value<0.05.

C. Frequency (%) of AAA, GAA, GAT, and AAT codons in control mRNAs (CTRL) and mRNAs that were downregulated in persister cells (Down PC). *** adjusted p-value<0.05.

D. GO term statistical analysis of genes those mRNAs that were downregulated in response to MAPKi, mRNAs that had an increased TDD in response to MAPKi, mRNAs that

were downregulated in response to MAPKi and those TDD was increased, and mRNAs that were downregulated in response to MAPKi and those TDD was increased and that were downregulated in persister cells.

E. % of genes producing different mRNA populations as indicated that are associated with the “proliferation”, “kinetochore”, and “DNA repair” cellular functions. The red line indicates the % obtained using the MAPKi-downregulated mRNA population.

Figure 6

A. Heat map representing the relative frequency of amino acids in proteins involved in different cellular functions as indicated compared to the human proteome.

B. Frequency (%) of lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), and asparagine (N) computed from control proteins (“CTRL”), or from proteins involved in Proliferation, or from proteins involved in Proliferation and that are encoded by MAPKi-downregulated mRNAs (left panel). Frequency (%) of the AAA (K), GAA (E), GAT (D), and AAT (N) codons in control mRNAs (“CTRL”), or in mRNAs encoding proteins involved in Proliferation, or in mRNAs encoding proteins involved in Proliferation that are downregulated by MAPKi (right panel). The red line indicates the CTRL mean value. *** adjusted p-value<0.001, ** adjusted p-value<0.005, * adjusted p-value<0.05. NS: not statistically significant.

C. Frequency (%) of lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), and asparagine (N) computed from control proteins (“CTRL”), or from proteins involved in Kinetochore, or from proteins involved in Kinetochore and that are encoded by MAPKi-downregulated mRNAs (left panel). Frequency (%) of the AAA (K), GAA (E), GAT (D), and AAT (N) codons in control mRNAs (“CTRL”), or in mRNAs encoding proteins involved in Kinetochore, or in mRNAs encoding proteins involved in Kinetochore and that are downregulated by MAPKi (right panel). The red line indicates the CTRL mean value. *** adjusted p-value<0.001, ** adjusted p-value<0.005, * adjusted p-value<0.05. NS: not statistically significant.

D. Frequency (%) of lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), and asparagine (N) computed from control proteins (“CTRL”), or from proteins involved in DNA repair, or from proteins involved in DNA repair and that are encoded by MAPKi-downregulated mRNAs (left panel). Frequency (%) of the AAA (K), GAA (E), GAT (D), and AAT (N) codons in control mRNAs (“CTRL”), or in mRNAs encoding proteins involved in DNA repair, or in mRNAs encoding proteins involved in DNA repair and that are downregulated by MAPKi (right panel). The red line indicates the CTRL mean value. *** adjusted p-value<0.001, ** adjusted p-value<0.005, * adjusted p-value<0.05. NS: not statistically significant.

E. Frequency (%) of lysine (K), glutamate (E), aspartate (D), and asparagine (N) computed from control proteins (“CTRL”), or from proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs, or from proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs and that are involved in Proliferation, Kinetochore, or DNA repair (left panel). Frequency (%) of the AAA (K), GAA (E), GAT (D), and AAT (N) codons in control mRNAs (“CTRL”), or in MAPKi-downregulated mRNAs, or in MAPKi-downregulated mRNAs encoding proteins involved in Proliferation, Kinetochore, or DNA repair (right panel). The red line indicates the mean value obtained with MAPKi-downregulated mRNAs. *** adjusted p-value<0.001, ** adjusted p-value<0.005, * adjusted p-value<0.05. NS: not statistically significant.

Figure 7

MAPKi could switch the cell metabolism by decreasing the bioavailability of certain amino acids such as glutamate and aspartate. This could trigger ribosome pause sites on some mRNA regions enriched for codons corresponding to glutamate and aspartate, that in turn could trigger the selective degradation of a subset of mRNAs according to their compositional biases in certain codons and corresponding amino acids. Since the biological functions of proteins depend on their composition in certain amino acids, the selective degradation of mRNAs according to their compositional bias would have consequences a selective set of functions such as proliferation and DNA repair. In addition, the downregulation of compositionally-biased mRNAs persists in cells after MAPKi withdrawal, the selective

degradation of compositionally-biased mRNAs could simultaneously contribute to the appearance of slow-proliferative cells that would have a higher probability to generate mutated daughter cells.

4.9 - Supplementary figures legends

Supplementary Figure S1

S1A. Hydrophobicity scale defined by Kyttle and Doolittle.

S1B. Averaged hydrophobicity index using the hydrophobicity scale of proteins defined by Kyttle and Doolittle – divided into 100 bins – that were either encoded by MAPKi-upregulated mRNAs (in red) or by MAPKi-downregulated mRNAs (in blue). The red- and blue-background represent the variability of the hydrophobicity index insight each of the two groups of proteins. The black lines represent the statistical test (adjusted p-value < 0.05) computed at each position.

S1C. Relative frequency of codons in MAPKi-downregulated mRNAs and MAPKi-upregulated mRNAs when compared to the frequency of codons in A375-expressed mRNAs.

S1D. Amino acid frequency in proteins encoded by mRNAs those TDD index increased or decreased in response to MAPKi (left panel). Codon frequency in mRNAs those TDD index increased or decreased in response to MAPKi (right panel). *** in blue means that amino acids or codons are statistically (adjusted p-value<0.05) more frequent in proteins encoded by mRNAs those TDD increased than in proteins encoded by mRNAs those TDD decreased in response to MAPKi. *** in red means amino acids or codons are statistically (adjusted p-value<0.05) more frequent in proteins encoded by mRNAs those TDD decreased than in proteins encoded by mRNAs those TDD increased in response to MAPKi.

Supplementary Figure S2

S2A. Principle of the computational strategy to measure “CC peaks” and “TC peaks”.

S2B. Amino acid frequency in “CC peaks” and in “TC peaks” (left panel). Codon frequency in “CC peaks” and in “TC peaks” (right panel). *** in blue means that amino acids or codons are statistically (adjusted p-value<0.05) more frequent in “TC peaks” than in “CC peaks”. *** in red means amino acids or codons are statistically (adjusted p-value<0.05) more frequent in “CC peaks” than in “TC peaks”.

S2C. The relative frequency of amino acids computed from proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs and those TDD index increased (x-axis) was plotted against the relative frequency of amino acids computed in “TC peaks” of MAPKi-downregulated mRNAs (y-axis). * means that the frequency of an amino acid computed in proteins encoded by MAPKi-downregulated mRNAs those TDD index increased was statistically different (p-adjusted < 0.05) when compared to the frequency in control proteins. ° means that the frequency of an amino acid computed in “TC peaks” of MAPKi-downregulated mRNAs was statistically different (p-adjusted < 0.05) when compared to the frequency in control peaks.

S2D. The relative frequency of codons computed from MAPKi-downregulated mRNAs those TDD index increased (x-axis) was plotted against the relative frequency of codons in “TC peaks” of MAPKi-downregulated mRNAs (y-axis). * means that the frequency of a codon computed in MAPKi-downregulated mRNAs those TDD index increased was statistically different (p-adjusted < 0.05) when compared to the frequency in control mRNAs. ° means that the frequency of a codon computed in “TC peaks” of MAPKi-downregulated mRNAs was statistically different (p-adjusted < 0.05) when compared to the frequency in control peaks.

S2E. Cell viability measured by the CCK8 assay after 24h of MAPKi treatment in aspartate (D)-, glutamate (E)-, or aspartate/glutamate (DE)-free medium.

S2F. Aspartate (D) and glutamate (E) intracellular concentration in control cells or cells grown for 24h in aspartate- or glutamate-free media.

S2G. Fold change of the expression level of CTU2 mRNA measured by RT-pPCR in cells exposed to MAPKi compared to control cells (MAPKi), or in glutamine-free media compared to control cells (-Q).

S2H. Fold change of the expression level of GOT1 mRNA measured by RT-pPCR in cells exposed to MAPKi compared to control cells (MAPKi), or in glutamine-free media compared to control cells (-Q).

Fig1

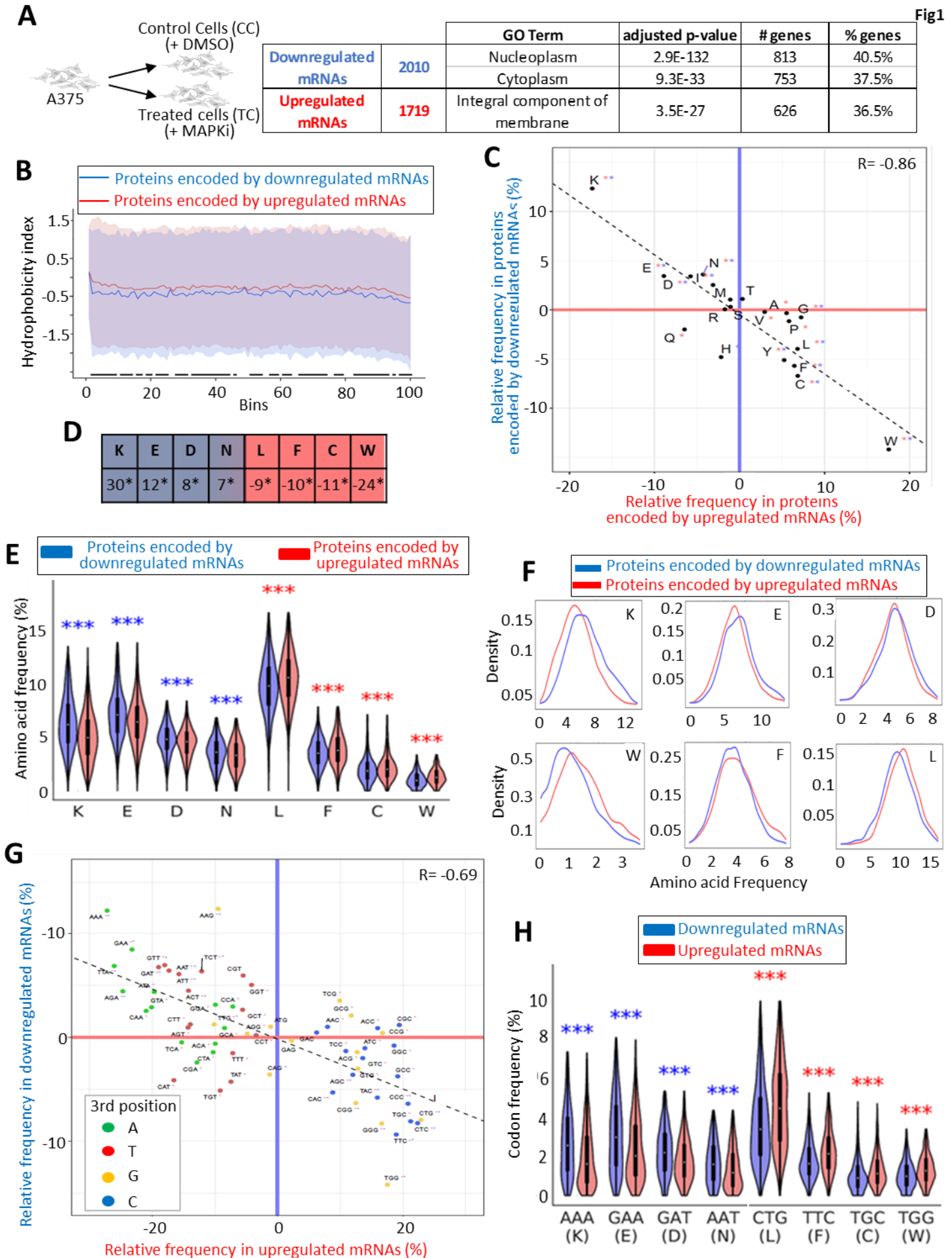


Fig2

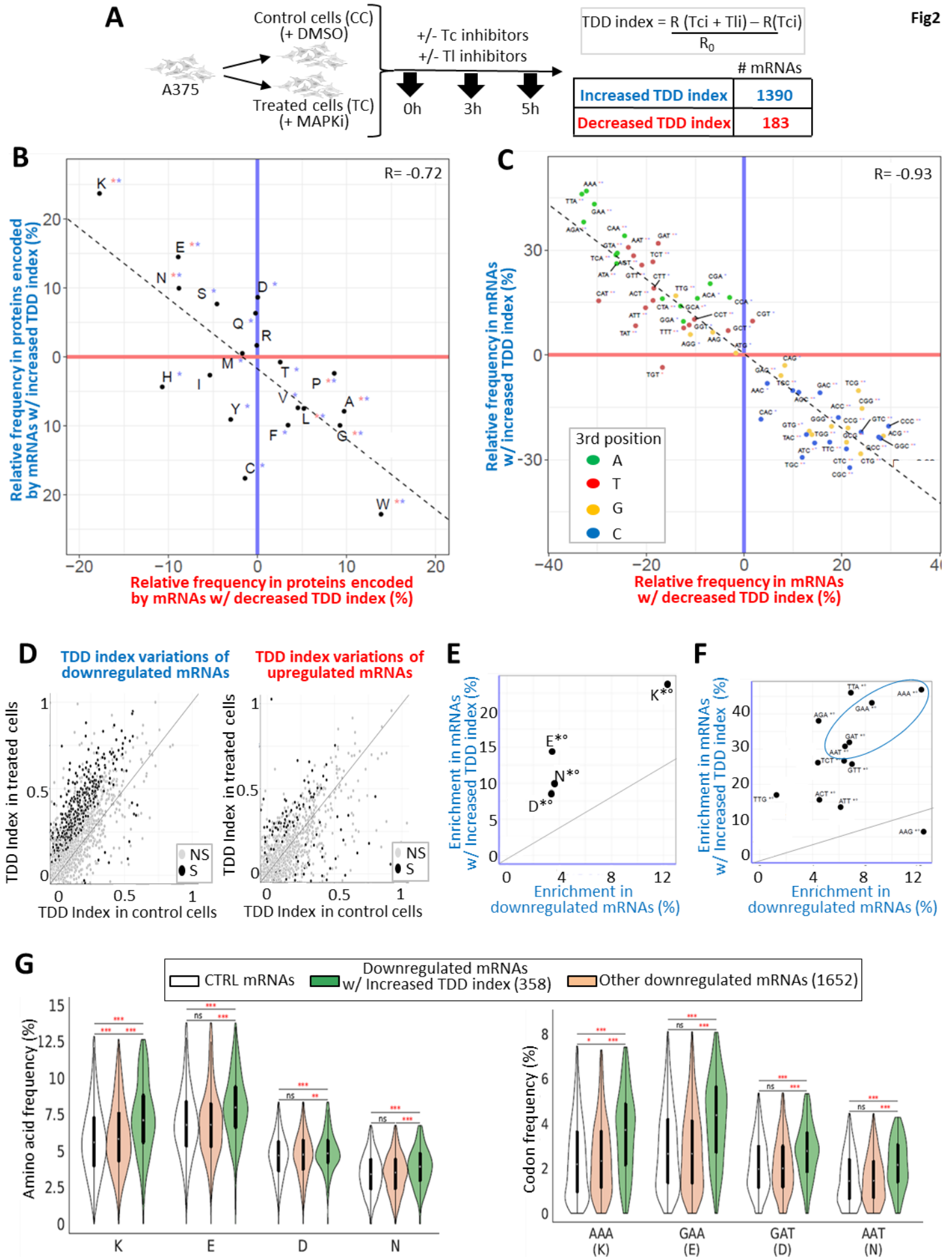


Fig3

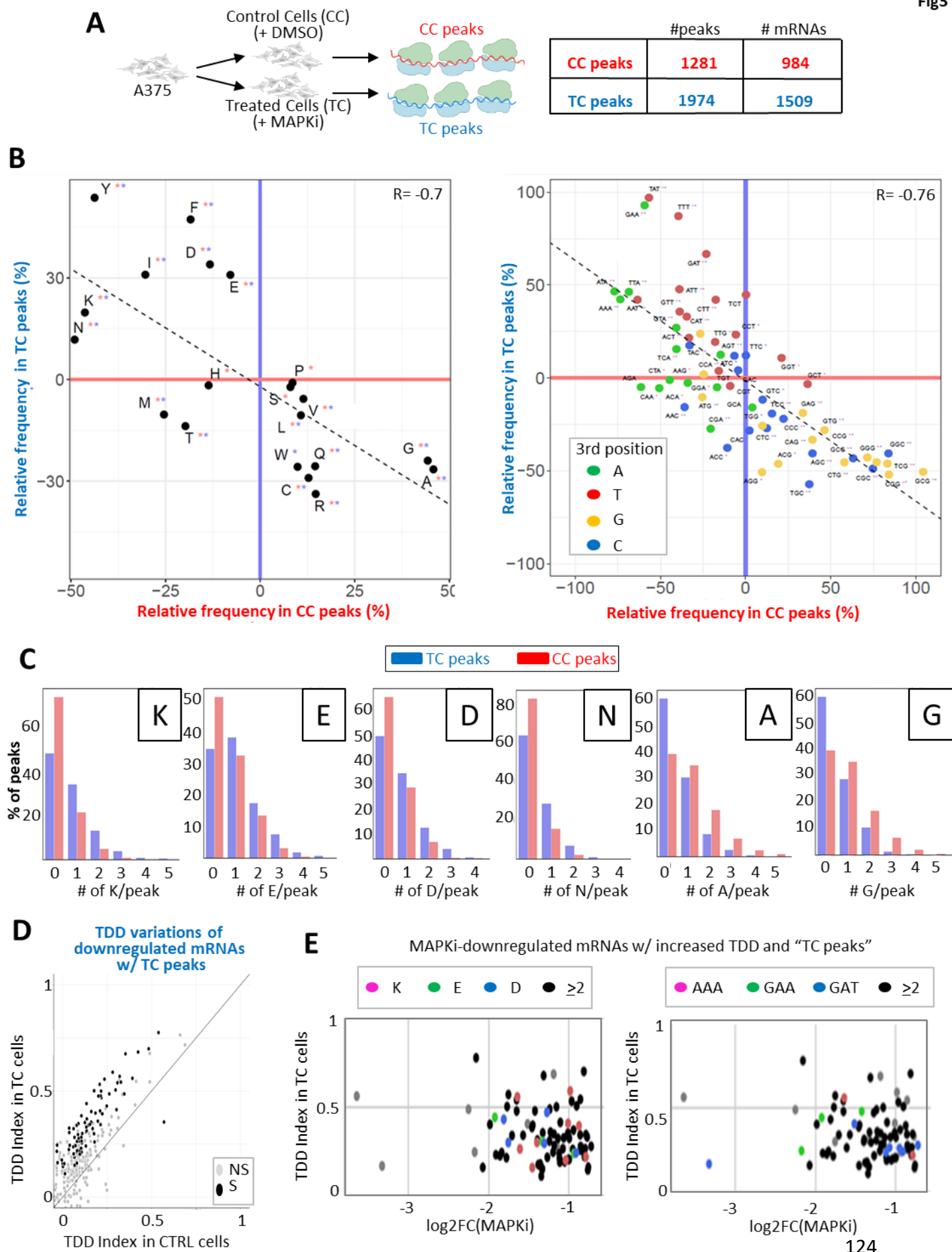
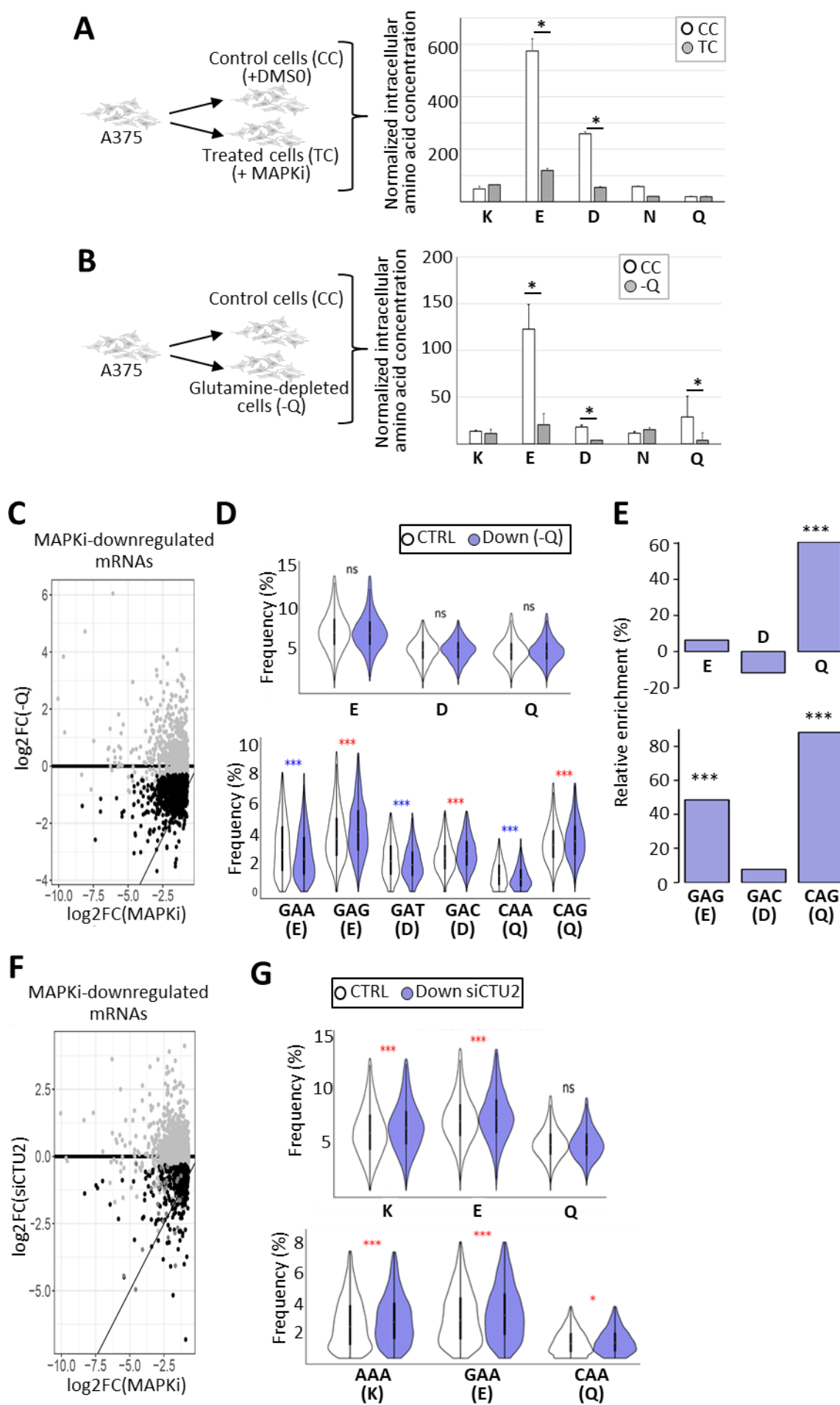


Fig4



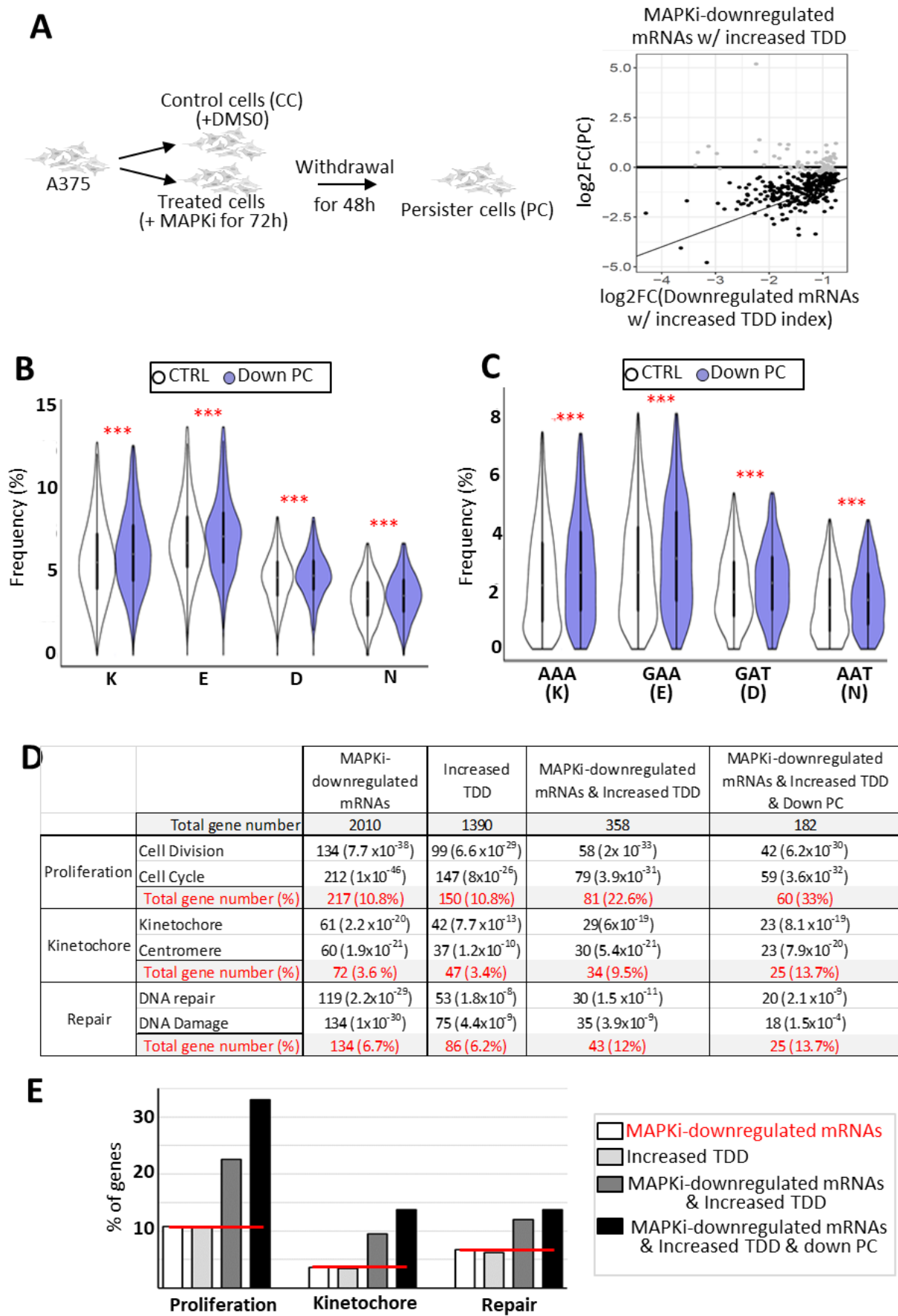


Fig6

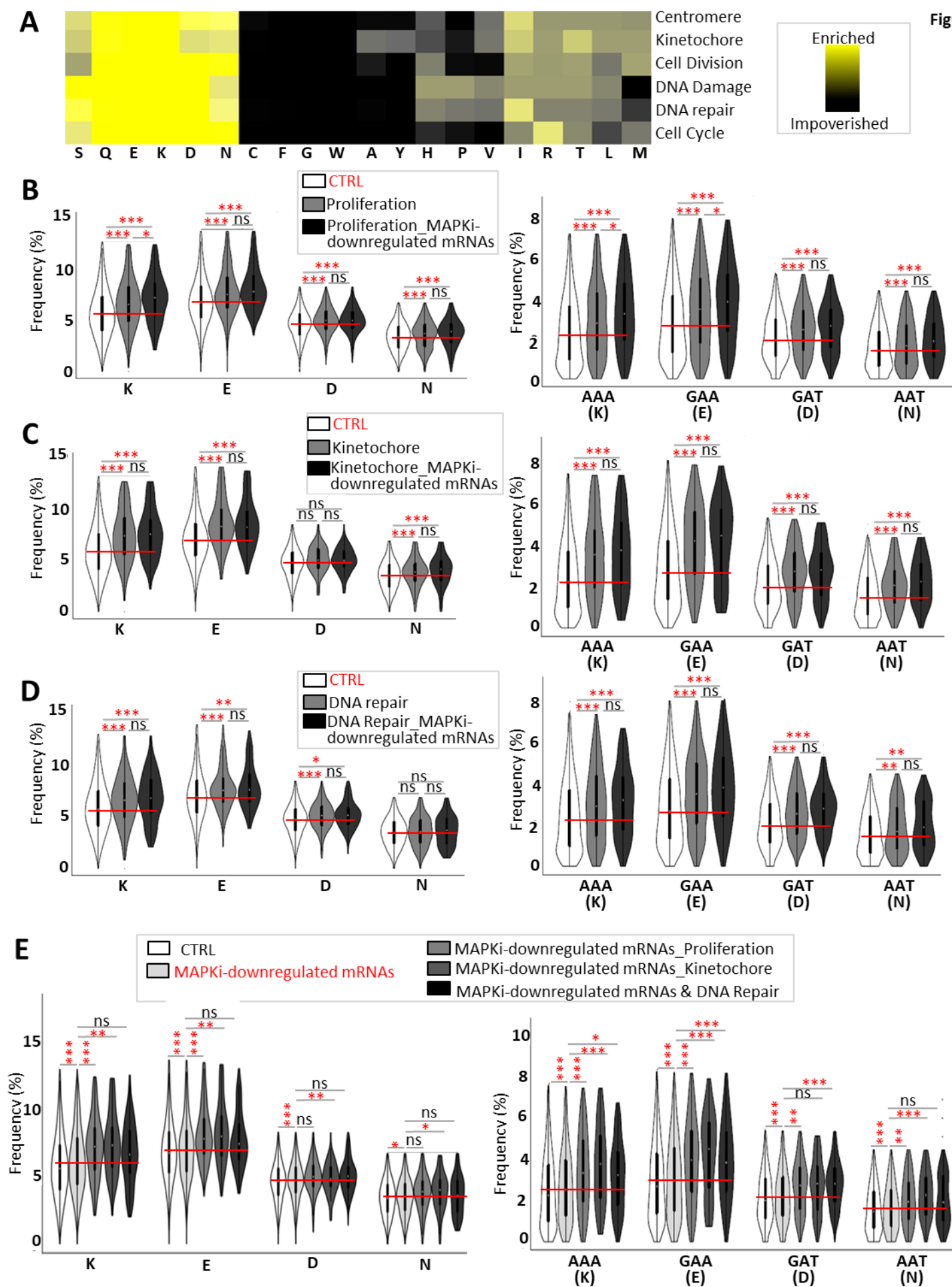
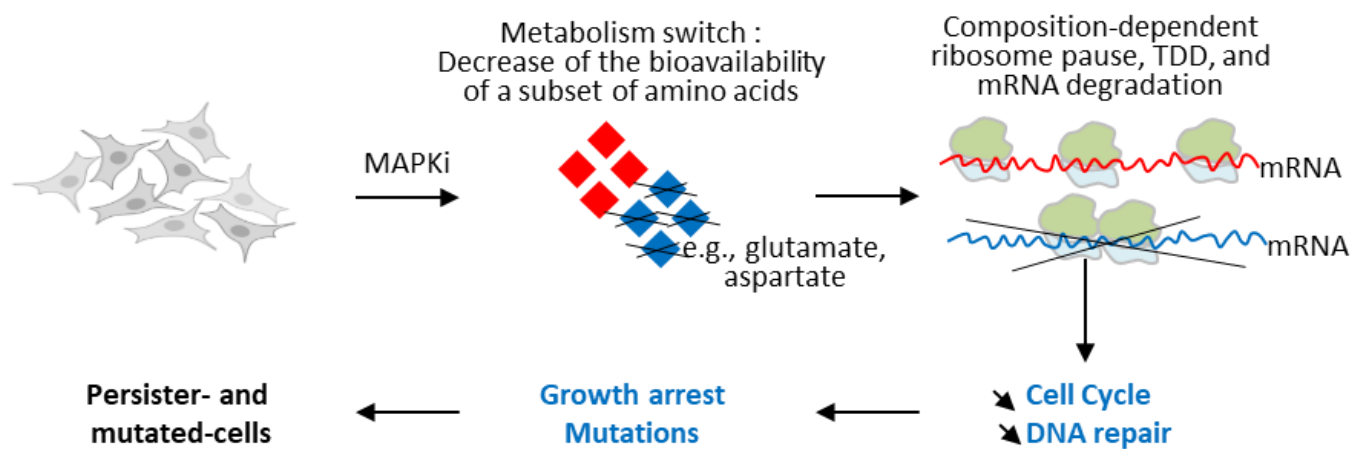


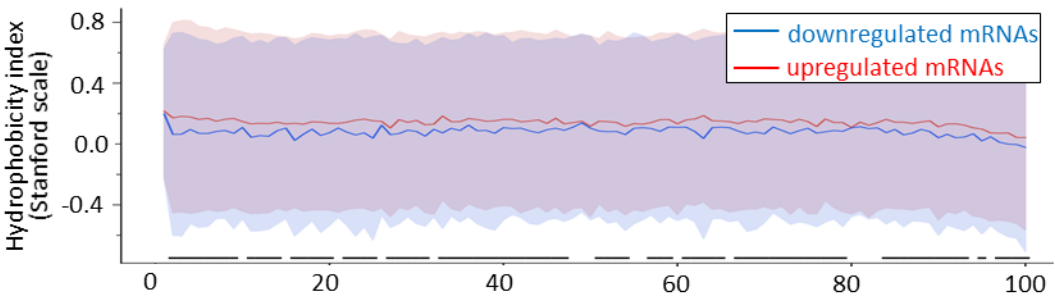
Fig7



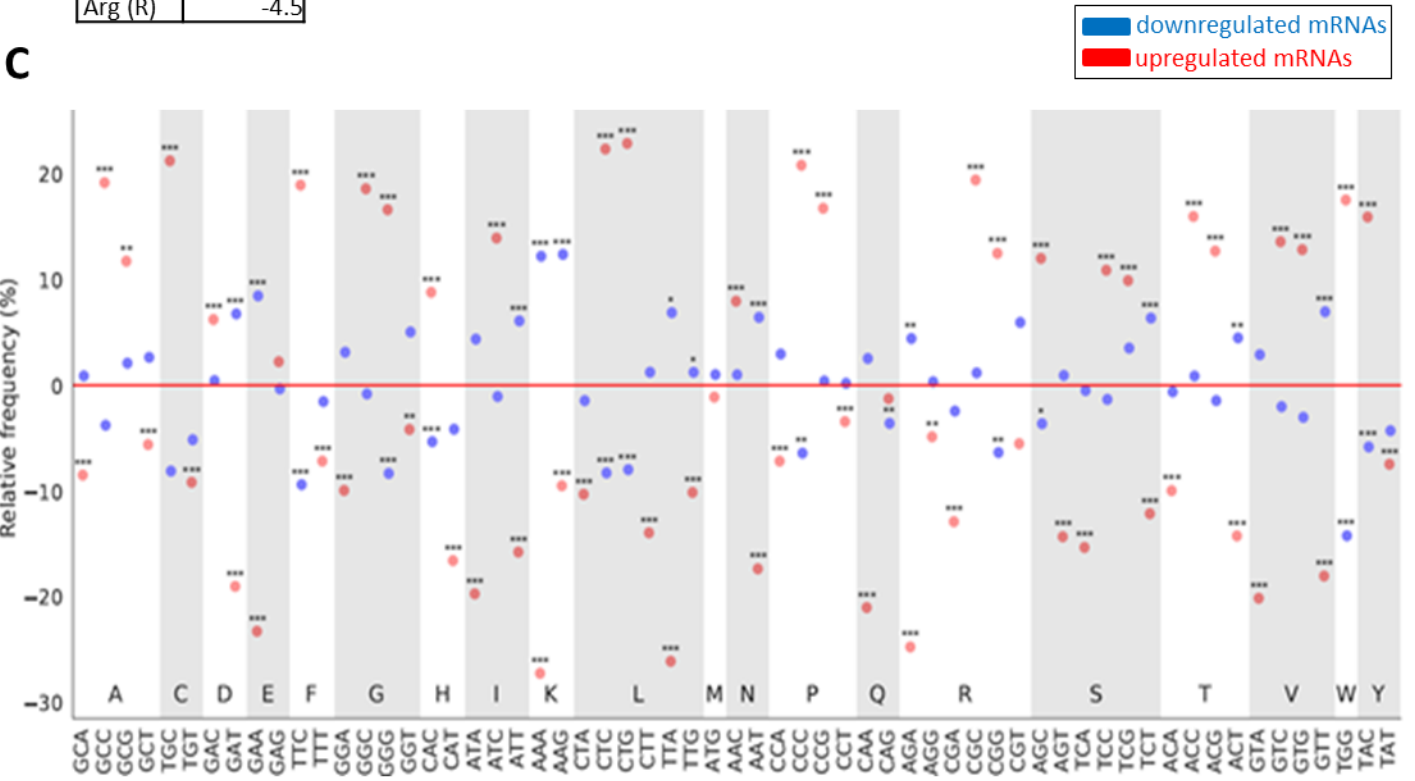
A

Amino Acid	Kyte and Doolittle
Ile (I)	4.5
Val (V)	4.2
Leu (L)	3.8
Phe (F)	2.8
Cys (C)	2.5
Met (M)	1.9
Ala (A)	1.8
Gly (G)	-0.4
Thr (T)	-0.7
Ser (S)	-0.8
Trp (W)	-0.9
Tyr (Y)	-1.3
Pro (P)	-1.6
His (H)	-3.2
Glu (E)	-3.5
Asn (N)	-3.5
Gln (Q)	-3.5
Asp (D)	-3.5
Lys (K)	-3.9
Arg (R)	-4.5

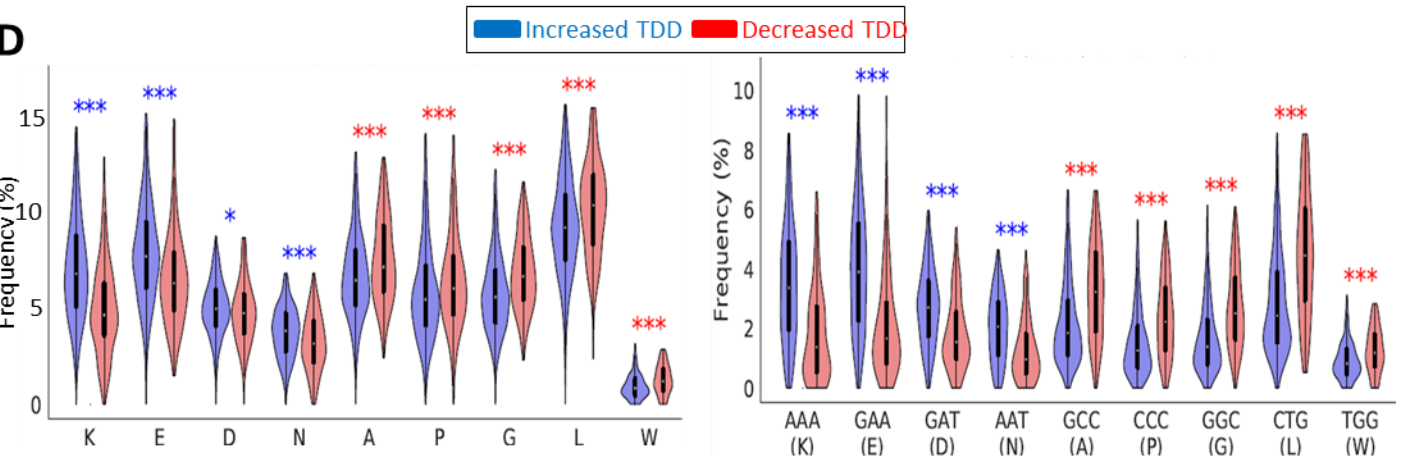
B



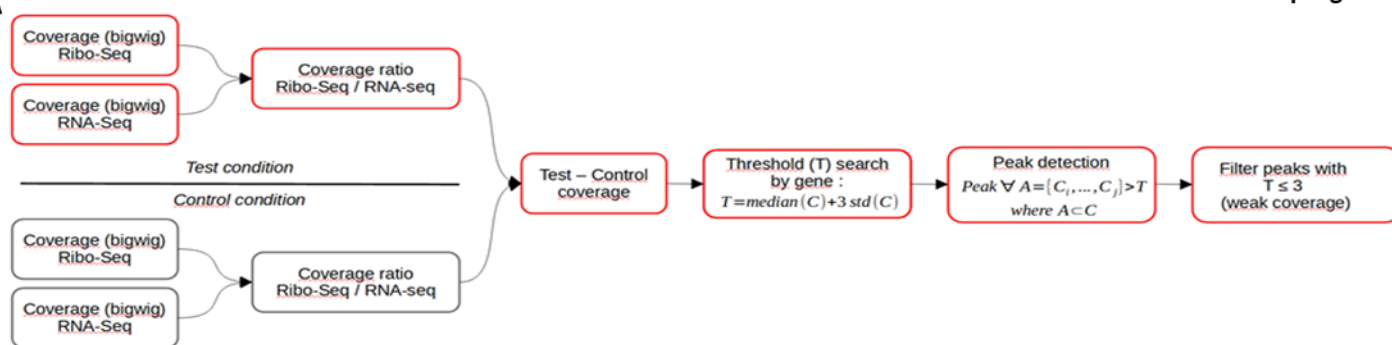
C



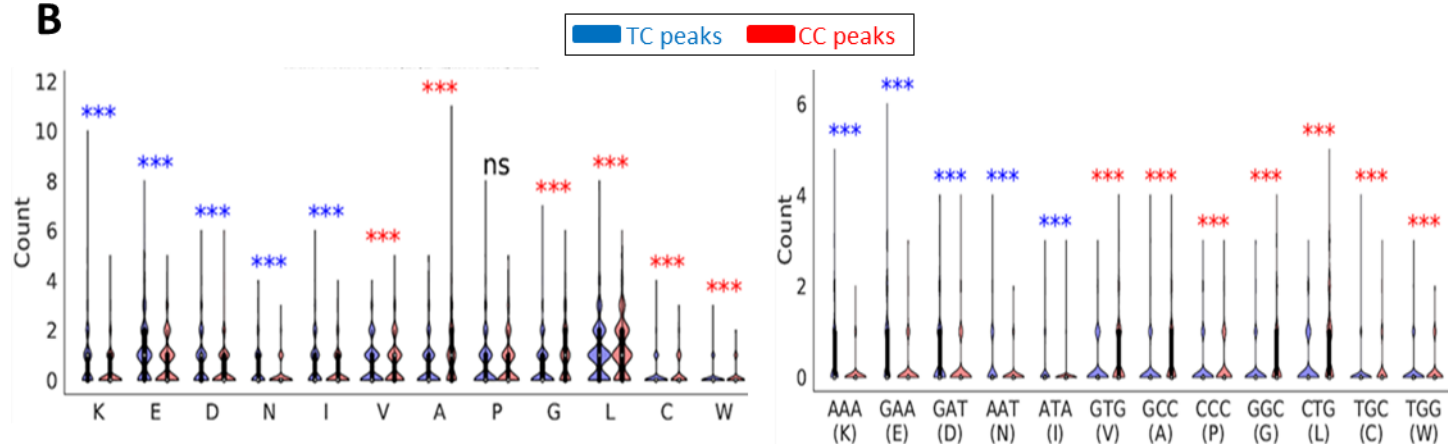
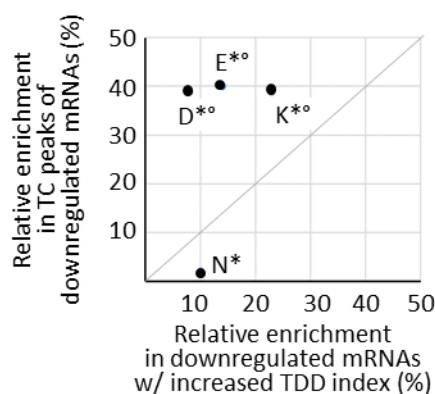
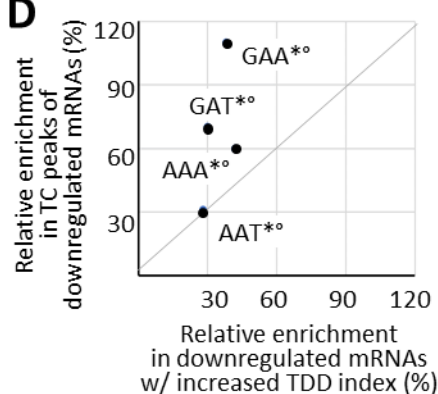
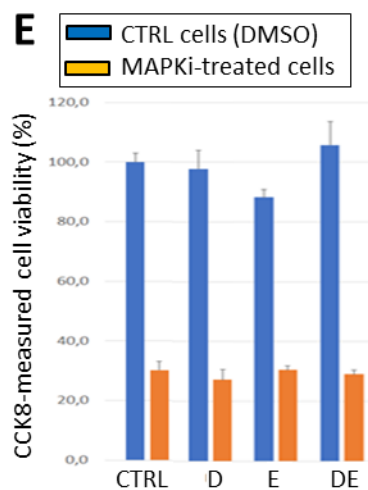
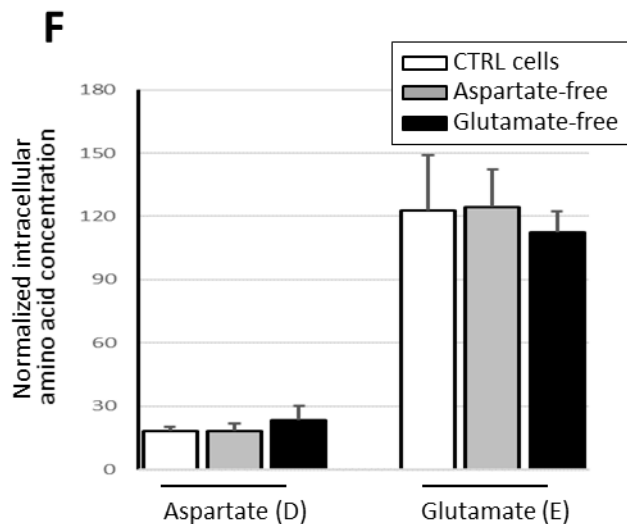
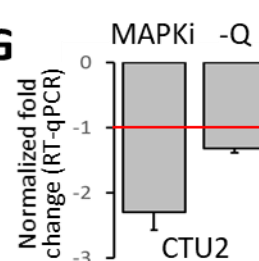
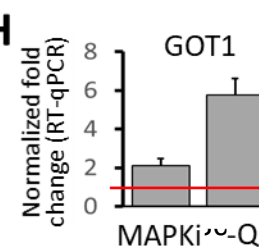
D



F

A

Where C is the coverage vector at each nucleotide position of a gene coding sequences.
Nucleotide position with no coverage were eliminated from C

B**C****D****E****F****G****H**

Partie 5 : Discussion et perspectives

Mes travaux de recherche ont montré que des cellules de mélanome traitées avec des inhibiteurs de la voie MAPK présentent des concentrations intracellulaires en aspartate (D) et glutamate (E) grandement diminuées. J'ai montré que dans ce contexte, des ARN messagers codant pour des protéines riches en aspartate en en glutamate présentaient des accumulations de ribosomes dans leurs régions riches en codons correspondant en particulier à ces acides aminés et ont leur niveau d'expression diminué, en partie au moins à cause de leur dégradation co-traductionnelle. Dans cette partie discussion et perspectives, je discuterai des tenants et aboutissants de ces observations.

5.1 - Origine de la baisse de biodisponibilité d'acides aminés induite par les inhibiteurs MAPK

A partir des données que nous avons obtenues pour l'instant, nous n'expliquons pas complètement l'origine de la baisse de biodisponibilité d'aspartate et de glutamate suite au traitement MAPKi. Cependant, comme évoqué dans la discussion de l'article, de nombreux éléments de la littérature suggèrent que les cellules de mélanome BRAF^{V600} possèdent un métabolisme dépendant fortement de la glutamine, utilisée pour synthétiser l'aspartate et le glutamate et donc les protéines nécessaires à maintenir leur état prolifératif (réplication et cycle cellulaire). La glutamine est également utilisée pour générer de l'énergie via la glutaminolyse qui génère notamment du pyruvate et du lactate permettant de générer de l'ATP en condition hypoxique. Le fait que les cellules de mélanome BRAF^{V600} ont un métabolisme dépendant de la glutamine (dans le sens où la glutamine permet la synthèse de glutamate et d'aspartate) est en accord avec le fait que dans nos expériences de déprivation en aspartate et/ou glutamate pendant 24h (et même jusqu'à 72h), nous n'observons pas de variations des concentrations intracellulaires en glutamate et d'aspartate. Par contre, priver les cellules de glutamine pendant 24h a révélé une baisse intracellulaire de glutamine, mais également d'aspartate et de glutamate, ainsi qu'une augmentation du niveau d'expression de

GOT1, une enzyme convertissant le glutamate et l'aspartate en α -kétoglutarate (α -KG) et oxaloacétate. Au vu de la littérature, une hypothèse est que l'hyperactivation de la voie MAPK liée à la mutation BRAF^{V600} diminue la production d'ATP via la phosphorylation oxydative dépendante des mitochondries et favorise un métabolisme énergétique peu consommateur d'oxygène basé sur la glutaminolyse (c'est-à-dire la dégradation de la glutamine en lactate et acétate). Dans ces conditions, les inhibiteurs MAPKi induiraient un « switch métabolique » en favorisant le métabolisme énergétique dépendant de la phosphorylation oxydative. Dans ces conditions, des métabolites comme l' α -kétoglutarate (α -KG) et l'oxaloacétate du cycle de Krebs seraient moins « disponibles » pour la synthèse d'aspartate et de glutamate et/ou l'aspartate et le glutamate seraient « consommés » par les cellules pour générer α -kétoglutarate (α -KG) et oxaloacétate qui seraient ensuite dégradés en totalité via la phosphorylation oxydative.

Pour résumer, des expériences complémentaires sont nécessaires pour expliquer la baisse de la concentration intracellulaire de l'aspartate et du glutamate en réponse aux MAPKi dans ces cellules de mélanome.

Par exemple, il serait intéressant de réaliser des expérimentations dans lesquelles les cellules seraient privées à la fois de glutamine, d'aspartate et de glutamate puisque l'on suppose que la double privation aspartate + glutamate est compensée par l'utilisation de glutamine. En effet, la glutamine est le point d'entrée de la synthèse de nombreux autres acides-aminés non-essentiels : d'une part, elle peut se cataboliser de façon successive en glutamate, aspartate et asparagine, et de plus, des groupements amines peuvent également être libérés à chacune de ces étapes, permettant la synthèse d'autres métabolites et acides aminés (Figure 28, Jiang *et al.* 2019). En privant les cellules de ces 3 acides aminés à la fois, les cellules ne parviendraient sans doute plus à maintenir leur homéostasie, ce qui compromettrait leur survie cellulaire.

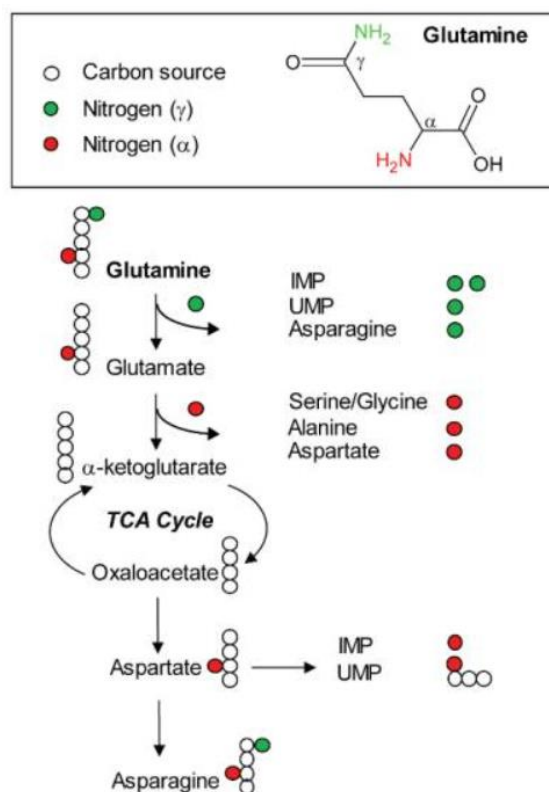


Figure 28 : Le catabolisme de la glutamine permet la production d'autres acides aminés et métabolites via la libération de groupements amine. Tiré de Jiang et al. 2019.

Dans l'optique de contrecarrer l'adaptabilité métabolique des cellules face à la thérapie, nous avons tenté de cibler des gènes impliqués dans le catabolisme de la glutamine tels que GOT1, GLUL, ainsi que le transporteur de glutamate SLC1A2 qui sont surexprimés en réponse à MAPKi. Ainsi, si on émet l'hypothèse que la plasticité métabolique des cellules nécessite l'activité de ces enzymes, on devrait pouvoir la contrecarrer en limitant leur expression. Nous avons donc utilisé des siRNA contre ces ARNm en présence ou non de MAPKi pour mener des analyses de viabilité cellulaire et de RNAseq, et mesuré les concentrations intracellulaires en acides aminés de ces échantillons, que nous nous attendions à voir varier également. Cependant, les trop grandes variabilités observées des concentrations intracellulaires en acides aminés ont fait que nous n'avons pas poursuivi l'analyse des données même si cela reste une voie très intéressante à explorer. Par ailleurs, en termes de viabilité cellulaire, seule la combinaison MAPKi+siSLC1A2 (transporteur du glutamate) a donné des résultats probants (Figure 29), il sera donc intéressant de poursuivre les investigations sur ce transporteur.

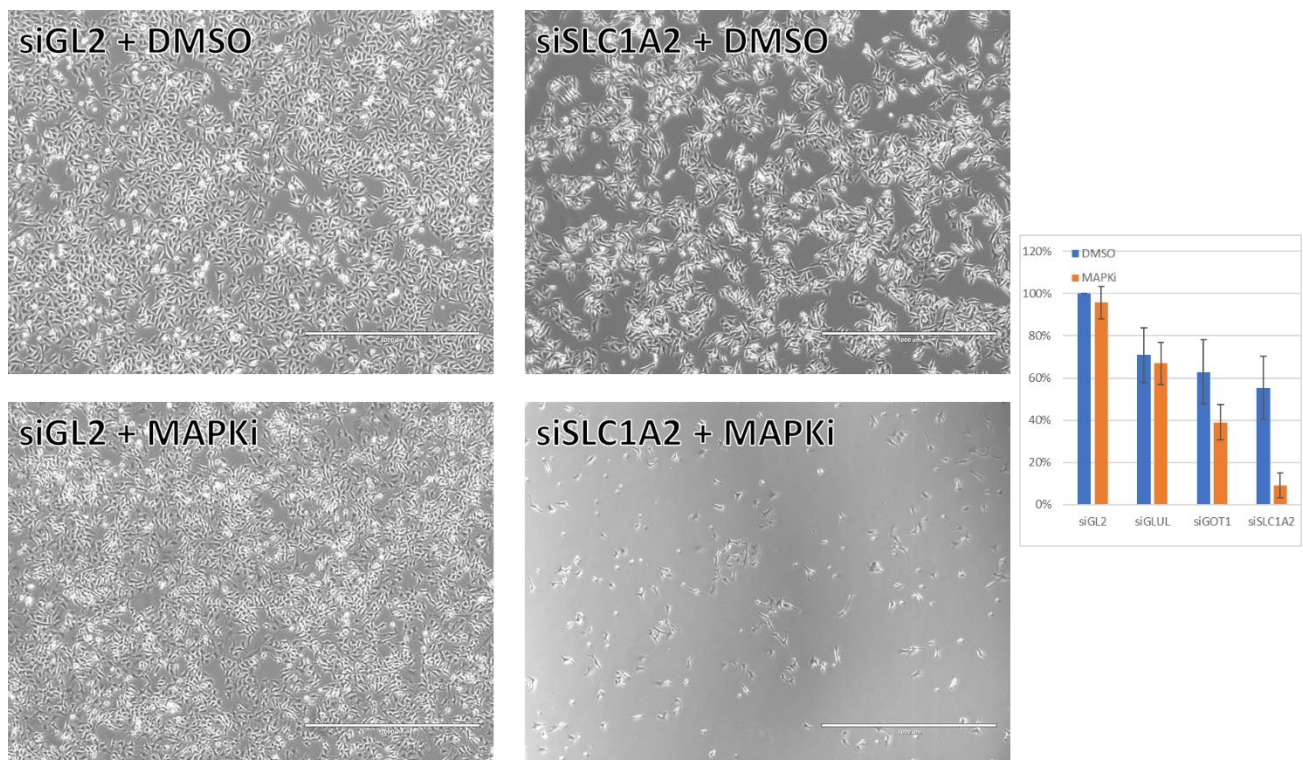


Figure 29: La déplétion de SLC1A2 en combinaison avec le traitement MAPKi impacte très fortement la prolifération cellulaire, alors que les déplétions de GLUL ou GOT1 semble avoir un effet plus modéré. A gauche : photographies de cellules A375 traitées ou non avec les MAPKi et traitées ou non avec le siSLC1A2. A droite : nombre de cellules comptées après 48h de traitement +/- MAPKi +/- siRNA (normalisé par rapport à la condition contrôle sans MAPKi et sans siRNA).

Il a été montré que des cellules cancéreuses étaient capables de « stocker » du glutamate sous forme de N-acétyl-aspartyl-glutamate (NAAG), pouvant être utilisé comme source de glutamate en cas d'avarie grâce à la glutamate carboxypeptidase II (GCP II ou FOLH1) (Nguyen *et al.* 2019). Il pourrait donc être intéressant de suivre la concentration de ce métabolite et le niveau d'expression de FOLH1 dans nos conditions expérimentales. De façon intéressante, nous retrouvons FOLH1 surexprimé dans nos cellules traitées 24h avec les MAPKi. Le rôle de FOLH1 est donc potentiellement une piste à investiguer. Au cours de ce projet nous avons envisagé d'autres approches pour potentialiser l'effet des MAPKi. En effet, au-delà de présenter des biais de composition en acides aminés, nous avons montré que les ARN messagers dont le niveau d'expression diminuait en réponse à la thérapie étaient enrichis en certains codons, et notamment en codons dont les 2^{ème} et 3^{ème} nucléotides sont des adénines (codons XAA) et dont le décodage lors de la traduction nécessite la thiolation de leurs ARNt correspondants par l'enzyme CTU2 (voir discussion de l'article). La baisse du niveau

d'expression de CTU2 lors du traitement MAPKi s'accorde donc bien avec ces observations, et lorsque nous avons ciblé CTU2 avec un siRNA, nous avons retrouvé les mêmes biais de composition dans les ARNm dont le niveau d'expression diminue en l'absence de CTU2. Nous avons donc combiné les deux approches en traitant les cellules avec les MAPKi tout en déplaçant CTU2, mais cela n'a eu qu'un effet limité sur la prolifération cellulaire (Figure 30). Des résultats similaires ont été obtenus en ciblant une autre enzyme de modification des ARNt : ADAT2, dont le niveau d'expression diminue également dans nos cellules suite au traitement MAPKi.

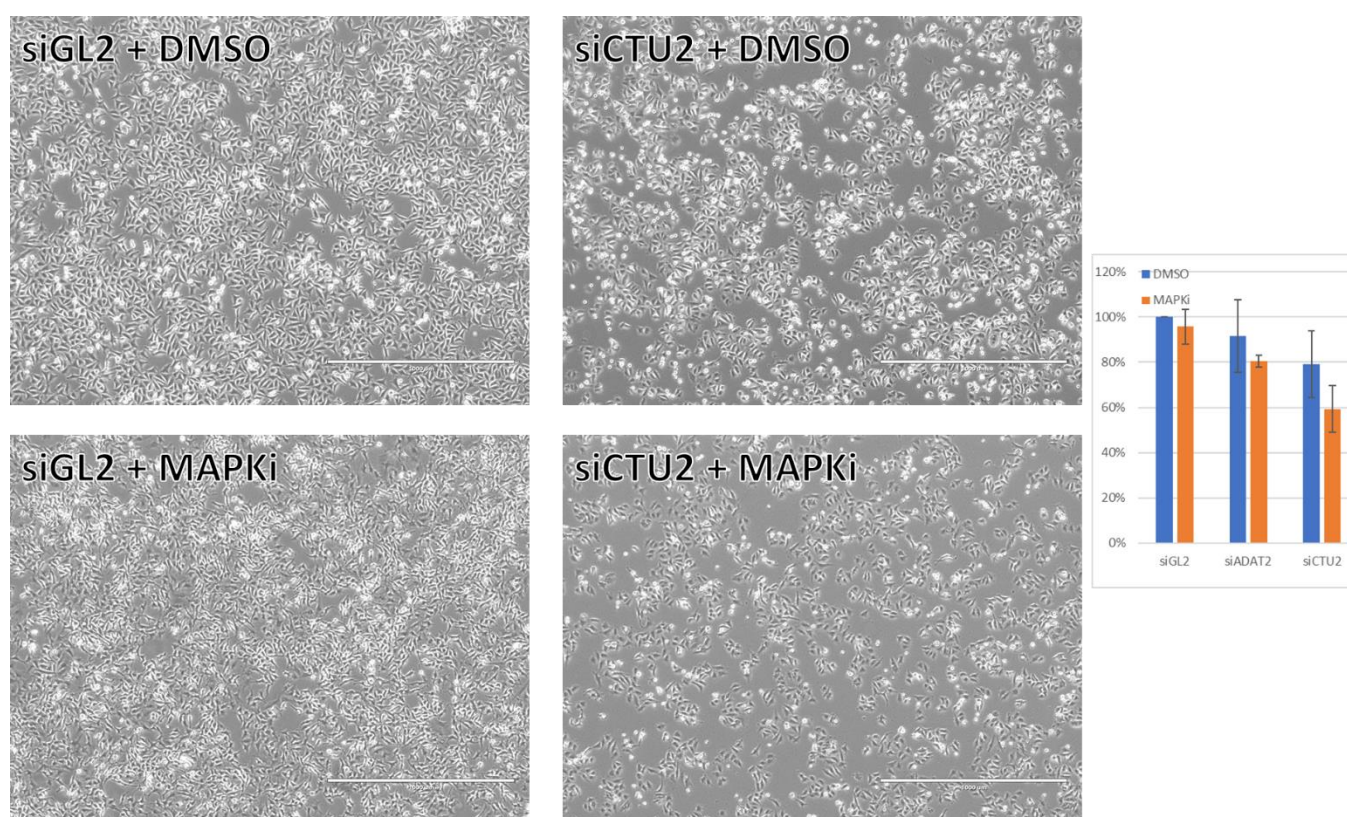


Figure 30: Les déplétions de CTU2 et ADAT2 en combinaison avec le traitement MAPKi impactent modérément la prolifération cellulaire. A gauche : photographies de cellules A375 traitées ou non avec les MAPKi et traitées ou non avec le siCTU2. A droite : nombre de cellules comptées après 48h de traitement +/- MAPKi +/- siRNA (normalisé par rapport à la condition contrôle sans MAPKi et sans siRNA).

5.2 - TDD et épissage alternatif

Nous avons également remarqué lors de nos analyses que de nombreuses protéines de liaison à l'ARN (RBP pour RNA-binding protein) étaient dérégulées par le traitement MAPKi. De façon intéressante, 90% d'entre-elles étaient sous-exprimées. La plupart d'entre elles sont des facteurs d'épissage (voir introduction), on s'attend donc à observer de nombreux changements d'inclusion ou d'exclusion d'exons en réponse au traitement MAPKi. Effectivement, nous avons détecté 579 exons régulés, les deux tiers étant des exons exclus. Nous pensions en effet que l'adaptabilité métabolique passerait par la dégradation co-traductionnelle d'isoformes riches en codons codant pour des acides aminés dont la biodisponibilité serait limitée, et que ces biais de composition pourraient être « apportés » de façon locale par l'inclusion d'un exon possédant plusieurs de ces codons. On aurait ainsi un exemple parfait d'une adaptabilité directe en réponse d'une baisse de biodisponibilité d'un acide aminé X, sans passer par des voies de signalisation et des réactions en cascades complexes. En effet dans ce modèle, les isoformes contenant des exons enrichis en codons X seraient dégradées de façon co-traductionnelle par rapport aux isoformes ne contenant pas ces exons. Un autre effet direct de la dégradation d'isoformes riches en codons X est tout simplement la baisse de consommation de l'acide aminé X. En effet la biodisponibilité d'un acide aminé est un équilibre entre sa synthèse et sa consommation, et en ne traduisant plus les ARNm riches en ces codons, on augmente de façon directe la biodisponibilité de cet acide aminé. L'ajout ou le retrait d'un exon au sein d'une protéine peut en effet complètement changer sa localisation cellulaire ou sa fonction, et on peut analyser si un set d'exons est enrichi en telle ou telle fonction par ontologie. J'ai d'ailleurs participé à la construction d'un tel outil lors de travaux précédents dans l'équipe (Tranchevent *et al.* 2017).

Après avoir observé les baisses intracellulaires en aspartate et glutamate en conséquence du traitement MAPKi, on s'attendrait donc en suivant cette logique à ce que les exons exclus soient enrichis en codons codant pour ces acides aminés, mais cela ne semble pas être le cas. Cela peut s'expliquer en partie parce que ce phénomène de dégradation

n'apporte qu'une partie du signal observé, et que ce signal serait « dilué » par les séquences des autres exons exclus, qui le sont parce que les facteurs d'épissage qui régulent leur inclusion sont sous-exprimés. De façon très intéressante, si on analyse les biais de composition des facteurs d'épissage trouvés dérégulés par le traitement MAPKi, on s'aperçoit qu'ils sont fortement enrichis en aspartate et glutamate eux aussi. Il se pourrait donc que l'adaptation physiologique des cellules aux MAPKi passe en partie par l'expression d'isoformes régulées par des facteurs d'épissage riches en aspartate et glutamate, car ces derniers ne seraient pas traduits en l'absence de ces acides aminés. Confortant cette hypothèse, nous observons que plus d'un tiers de ces RBP possèdent au moins un pic de ribosome lorsque l'on traite les cellules aux MAPKi, et on retrouve également que plus d'un quart des ARNm correspondants à ces RBP sont dégradés de façon traduction dépendante (Figure 31).

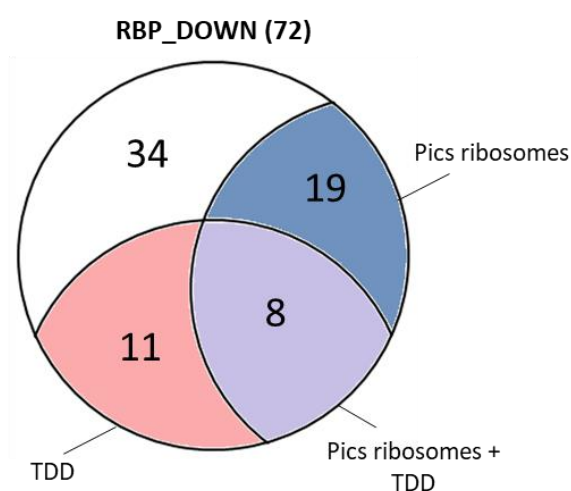


Figure 31: Répartition des caractéristiques des 72 RBP sous-exprimées suite au traitement MAPKi. Plus d'un tiers d'entre elles (27) présentent des pics de ribosomes, tandis que plus d'un quart d'entre elles (19) ont leur index TDD qui augmente suite au traitement.

Alors que les exons exclus en présence de MAPKi n'ont pas révélé de biais de composition significatif, il est intéressant de noter que les exons davantage inclus en présence de MAPKi sont pauvres en aspartate et glutamate (et plus ils sont fortement inclus et plus ce biais est fort). De façon intéressante, l'analyse ontologique de ces exons révèle qu'ils sont fréquemment porteurs de domaines de liaison aux protéines, indiquant encore une fois qu'une adaptation métabolique mène directement à des conséquences fonctionnelles.

En résumé, bien que nous nous soyons focalisés sur le lien entre biais global de composition des ARNm et TDD, il sera intéressant par la suite, d'étudier si les biais de composition à l'échelle d'exons pourraient être associés à la modulation de la dégradation sélective d'isoformes via le TDD.

5.3 - Biais de composition local VS global

Cette considération des exons soulève un autre point qui a peu été abordé dans l'article : le caractère global ou local des biais de composition observés. En effet, tous les biais de composition que nous avons présentés sont des biais globaux, c'est-à-dire à l'échelle des transcrits entiers. Or comme nous l'avons déjà évoqué, il faut garder en tête le caractère probabiliste des réactions chimiques, également valable pour le décodage des codons lors de la traduction. Ainsi, un ARNm aura plus de chances d'avoir des ribosomes en pause s'il possède en son sein des codons non-optimaux consécutifs, plutôt que répartis aléatoirement (Caponigro *et al.* 1993; Pavlova *et al.* 2020). On s'attendrait donc dans notre cas à ce que les empreintes de ribosomes détectées dans les cellules traitées aux MAPKi se trouvent sur les régions les plus enrichies en codons (non-optimaux de préférence) de l'aspartate et du glutamate, et c'est ce que nous observons. Par exemple, pour l'aspartate, nous observons un enrichissement net de la proportion en codons GAU (mais pas GAC) aux environs des pics de ribosome, et qui ne se retrouve pas ailleurs sur les transcrits. Il en va de même pour le glutamate, où de la même manière on observe un enrichissement en codons GAA (mais pas GAG) spécifiquement au niveau des pics de ribosomes (Figure 32).

Ces données permettent de souligner un élément majeur qui méritera d'être investigué. Il s'agit de la répartition ou localisation au sein des ARNm des biais de composition. Ainsi, comme mentionné ci-dessus, il est probable que pour avoir un effet biologique (par exemple la dégradation des ARNm), les biais de composition doivent être « concentrés » dans certaines régions des ARNm. Une autre possibilité à investiguer, est la localisation de ces biais, à savoir s'ils se trouvent plutôt dans la partie 5' ou en 3' des ARNm par exemple.

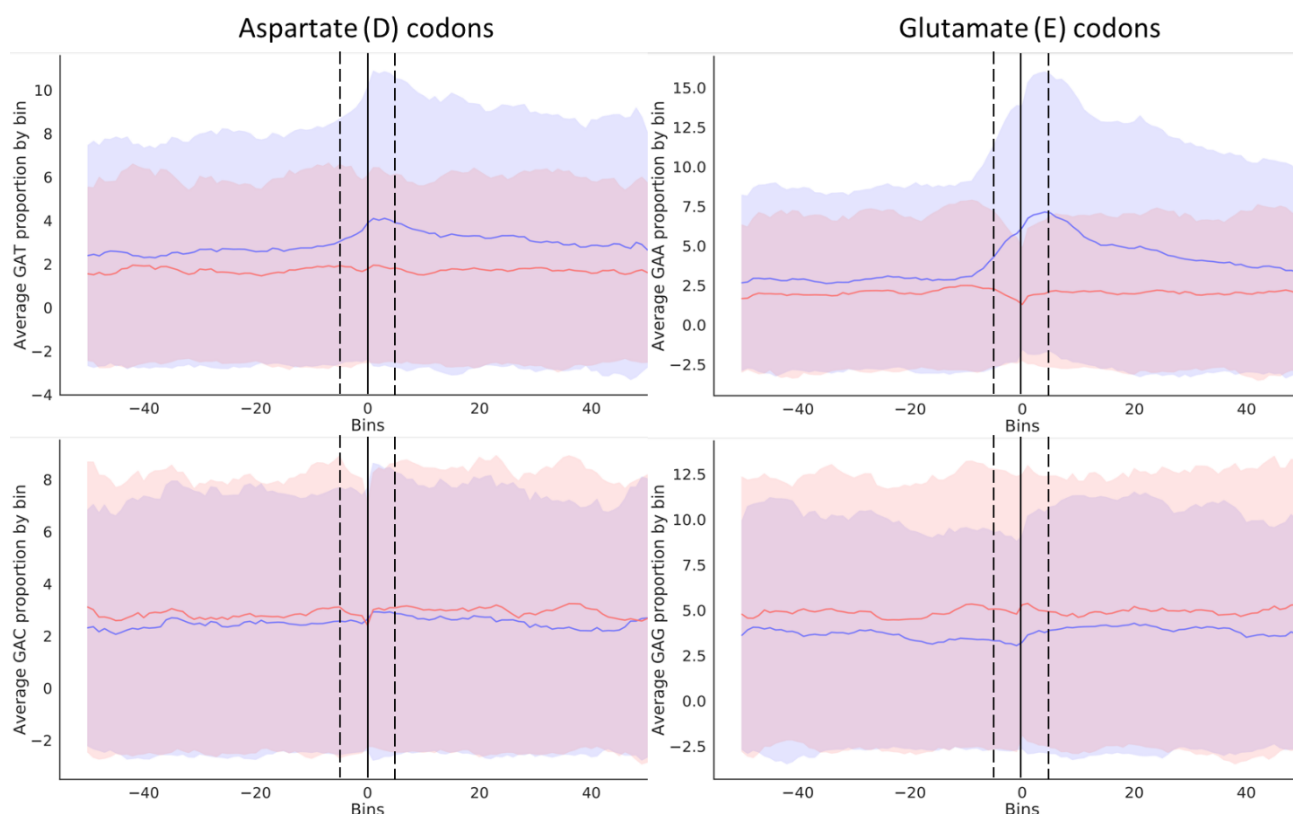


Figure 32: Les ARNm sous-exprimés en réponse aux MAPKi sont spécifiquement enrichis en codons GAU (aspartate) et GAA (glutamate) aux environs des pics de ribosome détectés.

5.4 - La thérapie anticancéreuse induit-elle l'apparition des cellules persistantes et la résistance ?

Une des questions à laquelle nos travaux ne répondent pas complètement est le fait de savoir si la thérapie anti-cancéreuse (ici MAPKi) induit l'apparition des cellules persistantes (c'est-à-dire des cellules qui survivent au traitement sans pour autant être porteuses de mutations) ou bien si elle ne fait que sélectionner leur état stochastique. En effet, on a longtemps considéré que les cellules persistantes survivaient à la thérapie de par leur état dormant, les rendant insensibles puisque leur métabolisme serait à l'arrêt. Des études de cellules cancéreuses soumises à une thérapie ciblée montrent cependant que les cellules persistantes émergent à la fois de cellules dormantes et de cellules bien actives et capables de réplication (Oren *et al.* 2021).

Dans ces conditions, une limite importante de notre étude est que nous travaillons sur des populations de millions de cellules et ne pouvons qu'observer un effet moyenné. Des analyses en cellules uniques nous permettraient certainement d'observer des effets beaucoup plus marqués et révéleraient sans doute que les cellules persistantes émergent de différentes sous-populations dans notre modèle également, car il existe vraisemblablement plusieurs « chemins » d'adaptations métaboliques en réponse aux MAPKi.

Dans l'article, nous émettons également l'hypothèse que la thérapie pourrait elle-même être à l'origine de l'apparition de mutations conférant la résistance aux cellules cancéreuses. En effet, nous avons montré que les gènes impliqués dans les fonctions cellulaires de la réplication, du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN possèdent les mêmes biais de composition en aspartate, glutamate et lysine que les gènes sous-exprimés (Figure 6A de l'article). Cela fait sens car les protéines correspondantes ont besoin d'être à la fois solubles et chargées pour interagir avec l'ADN. Étant chargés négativement, on peut s'attendre à ce que l'aspartate et le glutamate aient une capacité limitée à participer aux interactions protéine/ADN, alors qu'en fait il semblerait qu'ils puissent permettre des interactions spécifiques (Corona & Guo 2016).

Réduire les niveaux d'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN en réponse à un stress semble conférer un « avantage » aux cellules pour deux raisons. La première est que la réplication demande beaucoup d'énergie et d'acides aminés aux cellules, qu'elles ne peuvent tout simplement pas fournir lorsqu'elles sont soumises à la thérapie. La deuxième raison est que la baisse d'expression des enzymes de réparation de l'ADN pourrait augmenter la probabilité d'apparition de mutations lorsque les cellules persistantes dormantes « repartent » en cycle de réplication. Autrement dit, les cellules qui se seraient adaptées métaboliquement à la thérapie proliféreraient moins, mais dans le cas où elles parviendraient à se répliquer, elles pourraient avoir une plus grande probabilité de générer des clones mutés qui eux-mêmes pourraient permettre l'émergence de clones résistants à la thérapie.

Supportant ce modèle, les gènes de la réparation de l'ADN sont retrouvés sous-exprimés dans les cellules persistantes, indiquant bien que ces cellules seraient susceptibles de subir plus facilement des mutations plusieurs jours après l'arrêt de la thérapie. Cependant, nous ne montrons pas dans l'article que les cellules persistantes sont effectivement plus susceptibles de subir des mutations que des cellules contrôles non traitées. Pour répondre à cette question j'ai préparé une lignée clonale stable de cellules A375 ayant intégré une ORF codant à la fois pour la EGFP et une mCherry mutée. La mCherry contient en effet une mutation ponctuelle créant un codon stop (TGA) prématuré à la place du codon tryptophane (TGG), la rendant non fonctionnelle (Figure 33, Birnbaum *et al.* 2018). Les auteurs montrent également que seule une mutation ponctuelle redonnant le codon tryptophane permet de redonner une mCherry fluorescente. Ainsi, grâce à cet outil, nous serons capables de mesurer le taux de mutations A → G dans nos cellules. Ces mutations restant assez rares, on peut en complément traiter les cellules avec du N-nitroso-N-éthylurée (ENU), un puissant agent mutagène capable de créer des mutations ponctuelles, et notamment des conversions A/T → G/C dans 30 à 40% des cas (Barbaric *et al.* 2007). Ainsi, j'espère pouvoir tester l'hypothèse selon laquelle les cellules persistantes, possédant de nombreux gènes de la réparation de l'ADN sous-exprimés, génèrent plus de nouvelles mutations que les cellules non traitées. Ceci pourrait permettre de conclure que la thérapie anti-cancéreuse induit elle-même l'apparition de clones mutés résistants via ces effets sur le métabolisme cellulaire.

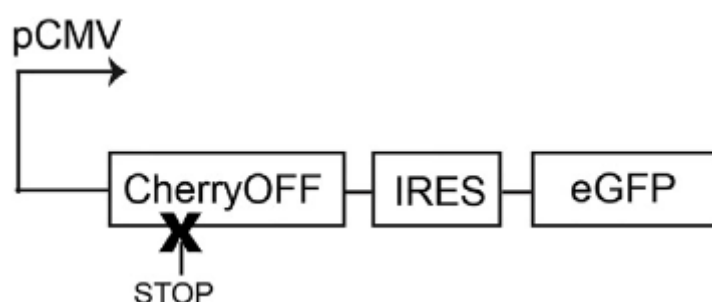


Figure 33: Représentation schématique de la construction utilisée pour monitorer la fréquence de mutation dans les cellules. Tiré de Birnbaum *et al.* 2018.

5.5 - Effet spécifique de la thérapie ou réaction générale à un stress ?

Une autre limite de nos travaux est que nous n'avons étudié ce phénomène que dans un seul type cellulaire, et face à une unique thérapie. Ainsi, nous ne savons pas si les effets observés font partie d'une réponse spécifique à une thérapie spécifique, et/ou s'ils sont globalement causés par un état général de stress cellulaire. En effet, si nous observions les mêmes biais de composition dans d'autres circonstances, cela voudrait dire que la réponse n'est pas spécifique. Nous avons déjà des éléments de réponse, puisque nous avons observé des biais de composition différents dans nos expériences de déplétion en acides aminés et avec les siRNA contre les enzymes du catabolisme de la glutamine. De plus, comme nous l'avons évoqué en introduction, d'autres études ont montré dans d'autres types cellulaires le caractère spécifique de la déplétion d'acides aminés sur les pauses de ribosomes (Darnell *et al.* 2018). Nous avons-nous même observé qu'en privant les cellules d'arginine pendant 24h, nous retrouvions un fort enrichissement de codons codant pour l'arginine dans les empreintes de ribosomes. D'autre part, j'ai réalisé des expériences similaires (RNAseq et ribosome profiling) dans un autre contexte de thérapie anti-cancéreuse : des cellules de cancer du sein (MDA-MB-231) traitées avec du paclitaxel. Nous n'avons pas encore eu l'opportunité d'analyser ces résultats en profondeur, mais nous avons pu observer que les biais de composition en codons et acides aminés n'étaient pas les mêmes, suggérant que l'adaptation métabolique se fait bien de façon spécifique à la perturbation environnementale.

5.6 - Conclusion

Nos données suggèrent qu'en réponse à une thérapie aux MAPKi, le métabolisme des cellules cancéreuses se retrouve axé sur la production énergétique via une consommation accrue d'aspartate et de glutamate pour « alimenter » le cycle de Krebs et probablement la phosphorylation oxydative dans les mitochondries. Ces acides aminés étant « utilisés » pour produire de l'énergie, les ARNt habituellement chargés de ces acides aminés deviennent limitants pour la traduction de protéines riches en ces acides aminés, réduisant ainsi rapidement et de façon directe la synthèse de ces protéines par dégradation co-traductionnelle des ARNm correspondants. Or, les gènes dont les protéines sont enrichies en ces acides aminés sont impliqués dans la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN. Nous pensons que la diminution de la biosynthèse de ces protéines d'une manière dépendante de l'état métabolique des cellules serait une étape majeure vers l'émergence de cellules persistantes puis de cellules résistantes

Ainsi, il se pourrait que les thérapies ciblées telles qu'on les conçoit aujourd'hui n'ont que très peu de chances d'aboutir à « l'éradication » des cellules cancéreuses en raison de la plasticité métabolique de ces dernières. En effet, bien qu'elle soit ciblée, la molécule utilisée ne peut pas affecter de manière égale chaque cellule d'une tumeur, d'une part à cause de l'hétérogénéité génétique de la tumeur, et d'autre part à cause de l'état stochastique des cellules. A un instant t , chaque cellule d'une tumeur (même si on considérait qu'elles soient toutes strictement identiques génétiquement) est dans un état unique et différent au moment de subir la thérapie. Cette thérapie aura donc autant d'effets différents qu'il y a de cellules, si bien que des cellules finiront toujours par « trouver » un chemin leur permettant de survivre et « persister ». Métaphoriquement, c'est comme si des millions de billes (les cellules) seraient lâchées sur la pente d'une colline (la thérapie) en bas de laquelle se trouve l'océan (la mort cellulaire). Fatalement, des billes trouveront sur leur chemin (l'adaptation métabolique) des failles dans lesquelles se loger pour stopper leur chute (minima topologique local = homéostasie) et ainsi survivre (Figure 34).

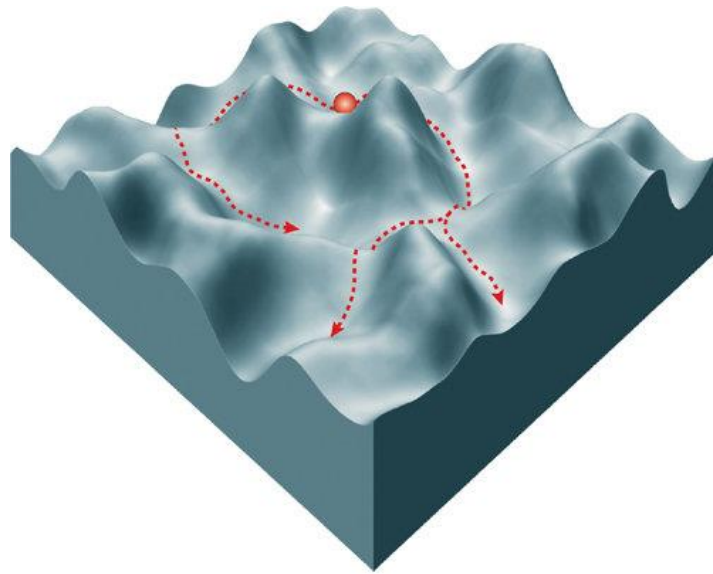


Figure 34: Représentation de la métaphore de l'adaptation cellulaire et de la persistance. Tiré de MacArthur et al. 2009)

Les thérapies ciblées sont conçues aujourd'hui en raison de la part dominante que possède la théorie des mutations somatiques. Ainsi, les thérapies ciblées visent des gènes mutés dans l'espoir de « contrecarrer » leurs effets. S'il est indéniable que des succès ont été obtenus, ceux-ci restent limités en raison de l'apparition systématique de cellules persistantes ou résistantes. Il est possible que les intrications existantes entre toutes les protéines et voies métaboliques d'une cellule sont si complexes qu'elles sont imprévisibles. Pour les futures générations de thérapies anti-cancéreuses, il sera important de considérer les effets directs de ces dernières sur le métabolisme cellulaire et leurs conséquences. Tout cela reste trop complexe aujourd'hui, mais je suis persuadé que d'ici quelques décennies, les progrès réalisés en intelligence artificielle et en informatique quantique permettront de simuler de façon proche de la réalité ce qu'il se passe au sein d'une cellule (et par extrapolation au sein d'une tumeur). Ceci permettra de tester plus rapidement de nouvelles hypothèses et pourquoi pas de nouvelles stratégies thérapeutiques avant de les tester sur des modèles biologiques appropriés.

Références bibliographiques

BAE H. & COLLIER J. 2022. — Codon optimality-mediated mRNA degradation: Linking translational elongation to mRNA stability. *Molecular Cell* 82 (8): 1467–1476. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.03.032>

BANH R.S., BIANCUR D.E., YAMAMOTO K., SOHN A.S.W., WALTERS B., KULJANIN M., GIKANDI A., WANG H., MANCIAS J.D., SCHNEIDER R.J., PACOLD M.E. & KIMMELMAN A.C. 2020. — Neurons Release Serine to Support mRNA Translation in Pancreatic Cancer. *Cell* 183 (5): 1202-1218.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.016>

BARBARIC I., WELLS S., RUSS A. & DEAR T.N. 2007. — Spectrum of ENU-induced mutations in phenotype-driven and gene-driven screens in the mouse. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48 (2): 124–142. <https://doi.org/10.1002/em.20286>

BASTIAN B.C. 2014. — The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annual Review of Pathology* 9: 239–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104658>

BELL C.C., FENNEL K.A., CHAN Y.-C., RAMBOW F., YEUNG M.M., VASSILIADIS D., LARA L., YEH P., MARTELOTTO L.G., ROGIER A., KREMER B.E., BARBASH O., MOHAMMAD H.P., JOHANSON T.M., BURR M.L., DHAR A., KARPINICH N., TIAN L., TYLER D.S., MACPHERSON L., SHI J., PINNAWALA N., YEW FONG C., PAPENFUSS A.T., GRIMMOND S.M., DAWSON S.-J., ALLAN R.S., KRUGER R.G., VAKOC C.R., GOODE D.L., NAIK S.H., GILAN O., LAM E.Y.N., MARINE J.-C., PRINJHA R.K. & DAWSON M.A. 2019. — Targeting enhancer switching overcomes non-genetic drug resistance in acute myeloid leukaemia. *Nature Communications* 10 (1): 2723. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10652-9>

BHANG H.C., RUDDY D.A., KRISHNAMURTHY RADHAKRISHNA V., CAUSHI J.X., ZHAO R., HIMS M.M., SINGH A.P., KAO I., RAKIEC D., SHAW P., BALAK M., RAZA A., ACKLEY E., KEEN N., SCHLABACH M.R., PALMER M., LEARY R.J., CHIANG D.Y., SELLERS W.R., MICHOR F., COOKE V.G., KORN J.M. & STEGMEIER F. 2015. — Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-complexity barcoding. *Nature Medicine* 21 (5): 440–448. <https://doi.org/10.1038/nm.3841>

BIRNBAUM M.D., NEMZOW L., KUMAR A., GONG F. & ZHANG F. 2018. — A Rapid and Precise Mutation-Activated Fluorescence Reporter for Analyzing Acute Mutagenesis Frequency. *Cell Chemical Biology* 25 (8): 1038-1049.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.05.010>

CAPONIGRO G., MUHLRAD D. & PARKER R. 1993. — A small segment of the MAT alpha 1 transcript promotes mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*: a stimulatory role for rare codons. *Molecular and Cellular Biology* 13 (9): 5141–5148

CHAN P.P. & LOWE T.M. 2016. — GtRNAdb 2.0: an expanded database of transfer RNA genes identified in complete and draft genomes. *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D184-189. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1309>

CHARDON F., CUEFF G., DELANNOY E., AUBÉ F., LORNAC A., BEDU M., GILARD F., PATEYRON S., ROGNIAUX H., GARGAROS A., MIREAU H., RAJJOU L., MARTIN-MAGNIETTE M.-L. & BUDAR F. 2020. — The Consequences of a Disruption in Cyto-Nuclear Coadaptation on the Molecular Response to a

Nitrate Starvation in Arabidopsis. *Plants (Basel, Switzerland)* 9 (5): E573. <https://doi.org/10.3390/plants9050573>

CORONA R.I. & GUO J.-T. 2016. — Statistical analysis of structural determinants for protein-DNA-binding specificity. *Proteins* 84 (8): 1147–1161. <https://doi.org/10.1002/prot.25061>

CRAMER P. 2019. — Organization and regulation of gene transcription. *Nature* 573 (7772): 45–54. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1517-4>

DARNELL A.M., SUBRAMANIAM A.R. & O'SHEA E.K. 2018. — Translational Control through Differential Ribosome Pausing during Amino Acid Limitation in Mammalian Cells. *Molecular Cell* 71 (2): 229–243.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.041>

DAVIES H., BIGNELL G.R., COX C., STEPHENS P., EDKINS S., CLEGG S., TEAGUE J., WOFFENDIN H., GARNETT M.J., BOTTOMLEY W., DAVIS N., DICKS E., EWING R., FLOYD Y., GRAY K., HALL S., HAWES R., HUGHES J., KOSMIDOU V., MENZIES A., MOULD C., PARKER A., STEVENS C., WATT S., HOOPER S., WILSON R., JAYATILAKE H., GUSTERSON B.A., COOPER C., SHIPLEY J., HARGRAVE D., PRITCHARD-JONES K., MAITLAND N., CHENEVIX-TRENCH G., RIGGINS G.J., BIGNER D.D., PALMIERI G., COSSU A., FLANAGAN A., NICHOLSON A., HO J.W.C., LEUNG S.Y., YUEN S.T., WEBER B.L., SEIGLER H.F., DARROW T.L., PATERSON H., MARAIS R., MARSHALL C.J., WOOSTER R., STRATTON M.R. & FUTREAL P.A. 2002. — Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417 (6892): 949–954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>

DEATON A.M. & BIRD A. 2011. — CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development* 25 (10): 1010–1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>

DEWEZ M., BAUER F., DIEU M., RAES M., VANDENHAUTE J. & HERMAND D. 2008. — The conserved Wobble uridine tRNA thiolase Ctu1-Ctu2 is required to maintain genome integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (14): 5459–5464. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709404105>

DIAZ L.A., WILLIAMS R.T., WU J., KINDE I., HECHT J.R., BERLIN J., ALLEN B., BOZIC I., REITER J.G., NOWAK M.A., KINZLER K.W., OLINER K.S. & VOGELSTEIN B. 2012. — The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 486 (7404): 537–540. <https://doi.org/10.1038/nature11219>

DING L., LEY T.J., LARSON D.E., MILLER C.A., KOBOLDT D.C., WELCH J.S., RITCHEY J.K., YOUNG M.A., LAMPRECHT T., MCLELLAN M.D., MCMICHAEL J.F., WALLIS J.W., LU C., SHEN D., HARRIS C.C., DOOLING D.J., FULTON R.S., FULTON L.L., CHEN K., SCHMIDT H., KALICKI-VEIZER J., MAGRINI V.J., COOK L., MCGRATH S.D., VICKERY T.L., WENDL M.C., HEATH S., WATSON M.A., LINK D.C., TOMASSON M.H., SHANNON W.D., PAYTON J.E., KULKARNI S., WESTERVELT P., WALTER M.J., GRAUBERT T.A., MARDIS E.R., WILSON R.K. & DIPERSIO J.F. 2012. — Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 481 (7382): 506–510. <https://doi.org/10.1038/nature10738>

DOMA M.K. & PARKER R. 2006. — Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440 (7083): 561–564. <https://doi.org/10.1038/nature04530>

DYNAN W.S. & TJIAN R. 1983. — The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35 (1): 79–87. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90210-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90210-6)

FONTRODONA N., AUBÉ F., CLAUDE J.-B., POLVÈCHE H., LEMAIRE S., TRANCHEVENT L.-C., MODOLO L., MORTREUX F., BOURGEOIS C.F. & AUBOEUF D. 2019. — Interplay between coding and exonic splicing regulatory sequences. *Genome Research* 29 (5): 711–722. <https://doi.org/10.1101/gr.241315.118>

FRISCHMEYER P.A., VAN HOOFF A., O'DONNELL K., GUERRERIO A.L., PARKER R. & DIETZ H.C. 2002. — An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science (New York, N.Y.)* 295 (5563): 2258–2261. <https://doi.org/10.1126/science.1067338>

FRUMKIN I., LAJOIE M.J., GREGG C.J., HORNUNG G., CHURCH G.M. & PILPEL Y. 2018. — Codon usage of highly expressed genes affects proteome-wide translation efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (21): E4940–E4949. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719375115>

GAPA L., ALFARDUS H. & FISCHLE W. 2022. — Unconventional metabolites in chromatin regulation. *Bioscience Reports* 42 (1): BSR20211558. <https://doi.org/10.1042/BSR20211558>

GERLINGER M., ROWAN A.J., HORSWELL S., MATH M., LARKIN J., ENDESFELDER D., GRONROOS E., MARTINEZ P., MATTHEWS N., STEWART A., TARPEY P., VARELA I., PHILLIMORE B., BEGUM S., McDONALD N.Q., BUTLER A., JONES D., RAINE K., LATIMER C., SANTOS C.R., NOHADANI M., EKLUND A.C., SPENCER-DENE B., CLARK G., PICKERING L., STAMP G., GORE M., SZALLASI Z., DOWNWARD J., FUTREAL P.A. & SWANTON C. 2012. — Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England Journal of Medicine* 366 (10): 883–892. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113205>

GILLEN S., WALDRON J. & BUSHELL M. 2021. — Codon optimality in cancer. *Oncogene* 40: 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02022-x>

GONZÁLEZ A. & HALL M.N. 2017. — Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals. *The EMBO journal* 36 (4): 397–408. <https://doi.org/10.15252/emboj.201696010>

HANAHAN D. 2022. — Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* 12 (1): 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

HANAHAN D. & FOLKMAN J. 1996. — Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 86 (3): 353–364. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80108-7)

HANAHAN D. & WEINBERG R.A. 2011. — Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144 (5): 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HIA F., YANG S.F., SHICHINO Y., YOSHINAGA M., MURAKAWA Y., VANDENBON A., FUKAO A., FUJIWARA T., LANDTHALER M., NATSUME T., ADACHI S., IWASAKI S. & TAKEUCHI O. 2019. — Codon bias confers stability to human mRNAs. *EMBO reports* 20 (11): e48220. <https://doi.org/10.15252/embr.201948220>

IKEUCHI K., TESINA P., MATSUO Y., SUGIYAMA T., CHENG J., SAEKI Y., TANAKA K., BECKER T., BECKMANN R. & INADA T. 2019. — Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways. *The EMBO journal* 38 (5): e100276. <https://doi.org/10.15252/emboj.2018100276>

- IVANOV A., MIKHAILOVA T., ELISEEV B., YERAMALA L., SOKOLOVA E., SUSOROV D., SHUVALOV A., SCHAFFITZEL C. & ALKALAEVA E. 2016. — PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. *Nucleic Acids Research* 44 (16): 7766–7776. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw635>
- IZZO L.T., AFFRONTI H.C. & WELLEN K.E. 2021. — The Bidirectional Relationship Between Cancer Epigenetics and Metabolism. *Annual Review of Cancer Biology* 5 (1): 235–257. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-070820-035832>
- JACOB F. & MONOD J. 1961. — Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* 3: 318–356. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(61)80072-7)
- JIANG J., SRIVASTAVA S. & ZHANG J. 2019. — Starve Cancer Cells of Glutamine: Break the Spell or Make a Hungry Monster? *Cancers* 11 (6): 804. <https://doi.org/10.3390/cancers11060804>
- KAY E.J., KOULOURAS G. & ZANIVAN S. 2021. — Regulation of Extracellular Matrix Production in Activated Fibroblasts: Roles of Amino Acid Metabolism in Collagen Synthesis. *Frontiers in Oncology* 11: 719922. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.719922>
- KAY E.J., PATERSON K., RIERA-DOMINGO C., SUMPTON D., DÄBRITZ J.H.M., TARDITO S., BOLDRINI C., HERNANDEZ-FERNAUD J.R., ATHINEOS D., DHAYADE S., STEPANOVA E., GJERGA E., NEILSON L.J., LILLA S., HEDLEY A., KOULOURAS G., MCGREGOR G., JAMIESON C., JOHNSON R.M., PARK M., KIRSCHNER K., MILLER C., KAMPHORST J.J., LOAYZA-PUCH F., SAEZ-RODRIGUEZ J., MAZZONE M., BLYTH K., ZAGNONI M. & ZANIVAN S. 2022. — Cancer-associated fibroblasts require proline synthesis by PYCR1 for the deposition of pro-tumorigenic extracellular matrix. *Nature Metabolism* 4 (6): 693–710. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00582-0>
- KOZAK M. 1991. — Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (30): 19867–19870
- KUPIEC J.-J. 2009. — *The Origin of Individuals*. World Scientific. 274 p.
- KUROSAKI T., POPP M.W. & MAQUAT L.E. 2019. — Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (7): 406–420. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0126-2>
- LAMBERT S.A., JOLMA A., CAMPITELLI L.F., DAS P.K., YIN Y., ALBU M., CHEN X., TAIPALE J., HUGHES T.R. & WEIRAUCH M.T. 2018. — The Human Transcription Factors. *Cell* 172 (4): 650–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>
- LEMAIRE S., FONTRODONA N., AUBÉ F., CLAUDE J.-B., POLVÈCHE H., MODOLO L., BOURGEOIS C.F., MORTREUX F. & AUBOEUF D. 2019. — Characterizing the interplay between gene nucleotide composition bias and splicing. *Genome Biology* 20. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1869-y>
- LOAYZA-PUCH F., ROOIJERS K., BUIL L.C.M., ZIJLSTRA J., OUDE VRIELINK J.F., LOPES R., UGALDE A.P., VAN BREUGEL P., HOFLAND I., WESSELING J., VAN TELLINGEN O., BEX A. & AGAMI R. 2016. — Tumour-specific proline vulnerability uncovered by differential ribosome codon reading. *Nature* 530 (7591): 490–494. <https://doi.org/10.1038/nature16982>

- LOAYZA-PUCH F., ROOIJERS K., ZIJLSTRA J., MOUMBEINI B., ZAAL E.A., OUDE VRIELINK J.F., LOPES R., UGALDE A.P., BERKERS C.R. & AGAMI R. 2017. — TGF β 1-induced leucine limitation uncovered by differential ribosome codon reading. *EMBO reports* 18 (4): 549–557. <https://doi.org/10.15252/embr.201744000>
- LONG X., LIN Y., ORTIZ-VEGA S., YONEZAWA K. & AVRUCH J. 2005. — Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current biology: CB* 15 (8): 702–713. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.053>
- LORCH Y. & KORNBERG R.D. 2017. — Chromatin-remodeling for transcription. *Quarterly Reviews of Biophysics* 50: e5. <https://doi.org/10.1017/S003358351700004X>
- MACARTHUR B.D., MA'AYAN A. & LEMISCHKA I.R. 2009. — Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (10): 672–681. <https://doi.org/10.1038/nrm2766>
- MANGEOT P.E., RISSON V., FUSIL F., MARNEF A., LAURENT E., BLIN J., MOURNETAS V., MASSOURIDÈS E., SOHIER T.J.M., CORBIN A., AUBÉ F., TEIXEIRA M., PINSET C., SCHAEFFER L., LEGUBE G., COSSET F.-L., VERHOEYEN E., OHLMANN T. & RICCI E.P. 2019. — Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Nature Communications* 10 (1): 45. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07845-z>
- MARTÍNEZ-REYES I. & CHANDEL N.S. 2020. — Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications* 11 (1): 102. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>
- MERCIER B.C., LABARONNE E., CLUET D., BICKNELL A., CORBIN A., GUIGUETTAZ L., AUBE F., MODOLO L., AUBOEUF D., MOORE M.J. & RICCI E.P. 2020. — Translation-dependent and independent mRNA decay occur through mutually exclusive pathways that are defined by ribosome density during T Cell activation: 2020.10.16.341222. <https://doi.org/10.1101/2020.10.16.341222>
- MORIYAMA E.N. & POWELL J.R. 1997. — Codon usage bias and tRNA abundance in *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution* 45 (5): 514–523. <https://doi.org/10.1007/pl00006256>
- MOSSMANN D., PARK S. & HALL M.N. 2018. — mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. *Nature Reviews. Cancer* 18 (12): 744–757. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0074-8>
- NGUYEN T., KIRSCH B.J., ASAKA R., NABI K., QUINONES A., TAN J., ANTONIO M.J., CAMELO F., LI T., NGUYEN S., HOANG G., NGUYEN K., UDUPA S., SAZEIDES C., SHEN Y.-A., ELGOGARY A., REYES J., ZHAO L., KLEENSANG A., CHAICHANA K.L., HARTUNG T., BETENBAUGH M.J., MARIE S.K., JUNG J.G., WANG T.-L., GABRIELSON E. & LE A. 2019. — Uncovering the Role of N-Acetyl-Aspartyl-Glutamate as a Glutamate Reservoir in Cancer. *Cell Reports* 27 (2): 491-501.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.036>
- NICHOLSON D.J. 2019. — Is the cell really a machine? *Journal of Theoretical Biology* 477: 108–126. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2019.06.002>
- NIJHOUT H.F. 1990. — Problems And Paradigms: Metaphors and the role of genes in development. *BioEssays* 12 (9): 441–446. <https://doi.org/10.1002/bies.950120908>

OREN Y., TSABAR M., CUOCO M.S., AMIR-ZILBERSTEIN L., CABANOS H.F., HÜTTER J.-C., HU B., THAKORE P.I., TABAKA M., FULCO C.P., COLGAN W., CUEVAS B.M., HURVITZ S.A., SLAMON D.J., DEIK A., PIERCE K.A., CLISH C., HATA A.N., ZAGANJOR E., LAHAV G., POLITI K., BRUGGE J.S. & REGEV A. 2021. — Cycling cancer persister cells arise from lineages with distinct programs. *Nature* 596 (7873): 576–582. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03796-6>

PASSARELLI M.C., PINZARU A.M., ASGHARIAN H., LIBERTI M.V., HEISSEL S., MOLINA H., GOODARZI H. & TAVAZOIE S.F. 2022. — Leucyl-tRNA synthetase is a tumour suppressor in breast cancer and regulates codon-dependent translation dynamics. *Nature Cell Biology* 24 (3): 307–315. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00856-5>

PAVLOVA N.N., KING B., JOSSELSOHN R.H., VIOLANTE S., MACERA V.L., VARDHANA S.A., CROSS J.R. & THOMPSON C.B. 2020. — Translation in amino-acid-poor environments is limited by tRNA^{Gln} charging. *eLife* 9: e62307. <https://doi.org/10.7554/eLife.62307>

PRESNYAK V., ALHUSAINI N., CHEN Y.-H., MARTIN S., MORRIS N., KLINE N., OLSON S., WEINBERG D., BAKER K.E., GRAVELEY B.R. & COLLIER J. 2015. — Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* 160 (6): 1111–1124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.029>

RADHAKRISHNAN A., CHEN Y.-H., MARTIN S., ALHUSAINI N., GREEN R. & COLLIER J. 2016. — The DEAD-Box Protein Dhh1p Couples mRNA Decay and Translation by Monitoring Codon Optimality. *Cell* 167 (1): 122–132.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.053>

RAICA M., CIMPEAN A.M. & RIBATTI D. 2009. — Angiogenesis in pre-malignant conditions. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 45 (11): 1924–1934. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.04.007>

RAMIREZ M., RAJARAM S., STEININGER R.J., OSIPCHUK D., ROTH M.A., MORINISHI L.S., EVANS L., JI W., HSU C.-H., THURLEY K., WEI S., ZHOU A., KODURU P.R., POSNER B.A., WU L.F. & ALTSCHULER S.J. 2016. — Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nature Communications* 7: 10690. <https://doi.org/10.1038/ncomms10690>

RAPINO F., DELAUNAY S., RAMBOW F., ZHOU Z., THARUN L., DE TULLIO P., SIN O., SHOSTAK K., SCHMITZ S., PIEPERS J., GHESQUIÈRE B., KARIM L., CHARLOTEAUX B., JAMART D., FLORIN A., LAMBERT C., RORIVE A., JERUSALEM G., LEUCCI E., DEWAELE M., VOOIJS M., LEIDEL S.A., GEORGES M., VOZ M., PEERS B., BÜTTNER R., MARINE J.-C., CHARIOT A. & CLOSE P. 2018. — Codon-specific translation reprogramming promotes resistance to targeted therapy. *Nature* 558 (7711): 605–609. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0243-7>

ROBERT J. 2022. — De quelques théories de l'oncogénèse. *Bulletin du Cancer* 109 (7): 742–747. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2022.03.010>

SHAFFER S.M., DUNAGIN M.C., TORBORG S.R., TORRE E.A., EMERT B., KREPLER C., BEQIRI M., SPROESSER K., BRAFFORD P.A., XIAO M., EGGAN E., ANASTOPOULOS I.N., VARGAS-GARCIA C.A., SINGH A., NATHANSON K.L., HERLYN M. & RAJ A. 2017. — Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* 546 (7658): 431–435. <https://doi.org/10.1038/nature22794>

SHEN L., YU Y., ZHOU Y., PRUETT-MILLER S.M., ZHANG G.-F. & KARNER C.M. 2022. — SLC38A2 provides proline to fulfill unique synthetic demands arising during osteoblast differentiation and bone formation. *eLife* 11: e76963. <https://doi.org/10.7554/eLife.76963>

SHOJI S., WALKER S.E. & FREDRICK K. 2009. — Ribosomal Translocation: One Step Closer to the Molecular Mechanism. *ACS chemical biology* 4 (2): 93–107. <https://doi.org/10.1021/cb8002946>

SOUFIR N. 2011. — Facteurs génétiques impliqués dans la prédisposition et la progression du mélanome: 8

SWAYDEN M., CHHOURI H., ANOUAR Y. & GRUMOLATO L. 2020. — Tolerant/Persister Cancer Cells and the Path to Resistance to Targeted Therapy. *Cells* 9 (12): E2601. <https://doi.org/10.3390/cells9122601>

TANG F., BARBACIORU C., WANG Y., NORDMAN E., LEE C., XU N., WANG X., BODEAU J., TUCH B.B., SIDDIQUI A., LAO K. & SURANI M.A. 2009. — mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature Methods* 6 (5): 377–382. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1315>

THANDAPANI P., KLOETGEN A., WITKOWSKI M.T., GLYTSOU C., LEE A.K., WANG E., WANG J., LEBOEUF S.E., AVRAMPOU K., PAPAGIANNAKOPOULOS T., TSIRIGOS A. & AIFANTIS I. 2022. — Valine tRNA levels and availability regulate complex I assembly in leukaemia. *Nature* 601 (7893): 428–433. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04244-1>

TRANCHEVENT L.-C., AUBÉ F., DULAURIER L., BENOIT-PILVEN C., REY A., PORET A., CHAUTARD E., MORTADA H., DESMET F.-O., CHAKRAMA F.Z., MORENO-GARCIA M.A., GOILLOT E., JANCZARSKI S., MORTREUX F., BOURGEOIS C.F. & AUBOEUF D. 2017. — Identification of protein features encoded by alternative exons using Exon Ontology. *Genome Research* 27 (6): 1087–1097. <https://doi.org/10.1101/gr.212696.116>

UTLEY R.T., IKEDA K., GRANT P.A., CÔTÉ J., STEGER D.J., EBERHARTER A., JOHN S. & WORKMAN J.L. 1998. — Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* 394 (6692): 498–502. <https://doi.org/10.1038/28886>

WANG C., AUBÉ F., PLANCHARD N., QUADRADO M., DARGEL-GRAFFIN C., NOGUÉ F. & MIREAU H. 2017. — The pentatricopeptide repeat protein MTSF2 stabilizes a nad1 precursor transcript and defines the 3' end of its 5'-half intron. *Nucleic Acids Research* 45 (10): 6119–6134. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx162>

WANG C., AUBÉ F., QUADRADO M., DARGEL-GRAFFIN C. & MIREAU H. 2018. — Three new pentatricopeptide repeat proteins facilitate the splicing of mitochondrial transcripts and complex I biogenesis in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 69 (21): 5131–5140. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery275>

WEI C.C., BALASTA M.L., REN J. & GOSS D.J. 1998. — Wheat germ poly(A) binding protein enhances the binding affinity of eukaryotic initiation factor 4F and (iso)4F for cap analogues. *Biochemistry* 37 (7): 1910–1916. <https://doi.org/10.1021/bi9724570>

WU C.C.-C., ZINSHTEYN B., WEHNER K.A. & GREEN R. 2019. — High-Resolution Ribosome Profiling Defines Discrete Ribosome Elongation States and Translational Regulation during Cellular Stress. *Molecular Cell* 73 (5): 959-970.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.12.009>

YANG L., VENNETI S. & NAGRATH D. 2017. — Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering* 19: 163–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>

Résumé

Selon la métaphore de « programmes génétiques » communément utilisée, les cellules s'adaptent à des fluctuations environnementales au travers de voies de signalisation plus ou moins complexes préprogrammées dans leurs génomes, conduisant à une description cloisonnée des activités cellulaires. Pourtant, les différentes activités cellulaires sont intimement liées et interdépendantes. J'ai analysé la réponse d'un modèle cellulaire, une lignée dérivée d'un mélanome, exposée à des inhibiteurs de la croissance cellulaire dirigés contre les protéines BRAF et MEK. Les résultats obtenus montrent que ces inhibiteurs diminuent la biodisponibilité de certains acides aminés comme le glutamate et l'aspartate. Ceci entraîne l'accumulation de ribosomes sur des ARNm codant pour des protéines enrichies en ces acides aminés, et nous montrons que cet arrêt de traduction entraîne la dégradation de ces ARNm dont la composition est biaisée. Or, les protéines enrichies en glutamate et aspartate sont fréquemment impliquées dans le métabolisme de l'ADN, et en particulier dans sa réparation. Ainsi, via leurs effets sur le métabolisme des acides aminés, des inhibiteurs de croissance cellulaire entraînent l'arrêt de la biosynthèse de protéines enrichies en glutamate et aspartate impliquées dans la réparation de l'ADN. Cette diminution de la biosynthèse des protéines de la réparation de l'ADN dépendante du métabolisme cellulaire est discutée dans le contexte de l'émergence de cellules cancéreuses porteuses de mutations et étant résistantes, c'est-à-dire ne répondant plus à des thérapies anti-cancéreuses comme la combinaison d'inhibiteurs BRAF et MEK souvent utilisée dans le traitement des mélanomes.

Abstract

According to the commonly used metaphor of "genetic programs", cells adapt to environmental fluctuations through more or less complex signalling pathways pre-programmed in their genomes, leading to a compartmentalized description of cellular activities. However, the different cellular activities are intimately linked and interdependent. I analyzed the response of a cell model, a melanoma-derived cell line, to cell growth inhibitors directed against BRAF and MEK proteins. The results obtained show that these inhibitors decrease the bioavailability of certain amino acids such as glutamate and aspartate. This leads to the accumulation of ribosomes on mRNAs coding for proteins enriched in these amino acids, and we show that this translation arrest leads to the degradation of these mRNAs whose composition is biased. However, proteins enriched in glutamate and aspartate are frequently involved in DNA metabolism, and in particular in its repair. Thus, through their effects on amino acid metabolism, cell growth inhibitors cause the arrest of the biosynthesis of glutamate and aspartate enriched proteins involved in DNA repair. This decrease in the biosynthesis of DNA repair proteins dependent on cell metabolism is discussed in the context of the emergence of cancer cells carrying mutations and being resistant, i.e. no longer responding to anti-cancer therapies such as the combination of BRAF and MEK inhibitors often used in the treatment of melanoma.