



HAL
open science

Validation pharmacologique d'une nouvelle cible de la résistance à l'hypoxie/ischémie

Romain Carcy

► **To cite this version:**

Romain Carcy. Validation pharmacologique d'une nouvelle cible de la résistance à l'hypoxie/ischémie. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02376604

HAL Id: dumas-02376604

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02376604v1>

Submitted on 22 Nov 2019

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.



Université de Nice Sophia-Antipolis

Faculté de Médecine de Nice
Année universitaire 2018-2019

THESE D'EXERCICE DE MEDECINE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée par Romain CARCY

Né le 16 Aout 1986

VALIDATION PHARMACOLOGIQUE D'UNE NOUVELLE CIBLE DE LA RESISTANCE A L'HYPOXIE/ISCHEMIE

Soutenue publiquement le vendredi 6 septembre 2019 à 19H00

Amphithéâtre 1 René Bourgeon-Faculté de Médecine de Nice

Composition du Jury

Madame le Professeur Carole ICHAI	Présidente
Monsieur le Professeur Jean-Francois PAYEN	Assesseur
Monsieur le Professeur Marc RAUCOULES	Assesseur
Monsieur le Docteur Christophe DURANTON	Assesseur
Monsieur le Docteur Hervé QUINTARD	Assesseur
Monsieur le Docteur Michel TAUC	Directeur de thèse

TABLE DES MATIERES

ABREVIATION.....	3
I/ INTRODUCTION	4
Une nouvelle cible dans la tolérance à l'hypoxie : eIF5A	5
Validation d'eIF5A dans un modèle de mammifère.....	8
La seryl-tRNA synthase (serRS) sous le contrôle traductionnel de eIF5a est impliquée dans la tolérance à l'ischémie.....	12
Synthèse d'un inhibiteur de forte affinité	15
Objectifs.....	15
II/MATERIELS ET METHODES	17
Détermination des constantes cinétiques de la protéine cible en présence de l'inhibiteur SFA	17
Tests in vitro sur cellules afin d'évaluer la capacité de cet inhibiteur à augmenter la tolérance anoxique.....	17
Mesures de viabilité par comptage au microscope à fluorescence	19
Mesure de la prolifération cellulaire et de la concentration de lactate	20
Mesure de la consommation d'oxygène cellulaire.....	20
Etude statistique.....	20
III/RESULTATS	21
Effet dose/réponse de l'inhibiteur SFA sur l'activité enzymatique de la luciférase.....	21
Absence de toxicité de l'inhibiteur SFA sur cellules PCT en condition de normoxie.....	21
Absence de toxicité du SFA sur les cellules neuronales corticales en condition de normoxie. .	22
Effet du SFA sur la mort cellulaire induite par l'anoxie dans des cellules PCT en culture dans différents milieux (M1, M0, HBSS).....	23
Effet du SFA sur la mort cellulaire induite par OGD dans des cellules de neurones corticaux..	24
Effet du SFA et du GC7 sur la prolifération cellulaire en conditions de normoxie sur 3 jours...	25
Effets du SFA et GC7 sur la production de lactate par les cellules proximales rénales dans des conditions de normoxie.....	25
IV/DISCUSSION	27
V /BIBLIOGRAPHIE	31
VI/SERMENT HIPPOCRATE	34

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma simplifié de la voie de synthèse des polyamines et de la voie d'activation du facteur d'initiation de la traduction eIF5A.....	6
Figure 2 : Effet du GC7 sur la survie de la drosophile en conditions hypoxiques.....	6
Figure 3 : A: Modèle 3D de eIF5A B: schéma de l'activation de eIF5a par hypusination.	7
Figure 4 : Schéma de la transposition chez le mammifère du modèle de tolérance à l'ischémie démontrée chez la drosophile.	9
Figure 5 : Le traitement par le CG7 induit une inhibition de l'hypusination d'eIF5a in vitro et in vivo qui protège contre une ischémie focale (tMCAO)..	10
Figure 6 : Schéma de l'utilisation pré clinique du GC7 dans la transplantation rénale chez le porc	11
Figure 7 : Analyse protéomique en gel bi-dimensionnel..	12
Figure 8 : Rôle de l'aminocyl tRNA synthase (aaRS) dans la traduction de l'ARN messager en protéine	13
Figure 9 : L'inhibition pharmacologique avec la serine hydroxamat (serHX) inhibiteur de faible affinité ou par inactivation de l'expression génique (siRNA) de la serRS protège les cellules de la mort cellulaire induite par l'anoxie cellulaire.	14
Figure 10 : Structure générale de l'inhibiteur synthétique sulfamoyl-séryl-adénylate (SFA)..	15
Figure 11 : Effet inhibiteur du SFA sur la synthèse de la luciférase.....	21
Figure 12 : Absence de toxicité du SFA sur la survie cellulaire en condition de normoxie. ...	22
Figure 13 : Effet du SFA (5 µM) sur la viabilité cellulaire après 3H ou 24H de traitement...	22
Figure 14 : effet du SFA sur la survie cellulaire après 24H anoxie.	23
Figure 15 : Effet du SFA sur des cultures primaires de neurones corticaux exposés ou non à 1H d'OGD.....	24
Figure 16 : Prolifération cellulaire des cellules rénales PCT mesurée sur 3 jours par l'augmentation des protéines au cours du temps dans des conditions de normoxie en présence de GC7 ou de SFA	25
Figure 17 : Production cellulaire de lactate sur 2 jours dans des conditions de normoxie	26
Figure 18: Analyse de la consommation d'oxygène des cellules PCT après un traitement de 24h de GC7 30 µM ou 4h de SFA 3µM.....	26

ABREVIATION

aaRS : Aminoacyl tRNA synthase

ARNt : Acides ribonucléiques de transfert

ATP : Adénosine triphosphate

AVC : Accident vasculaire cérébral

DHS : Deoxyhypusine

DOHH : Deoxyhypusine hydroxylase

eIF5A : Facteur d'initiation de la traduction 5A

GC7 : N1-guanyl-1,7-diaminoheptane

HIF : Hypoxia Inducible Factors

NGAL : Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

OGD : Oxygen Glucose Deprivation

PCT : Cellule tubule proximal

serRS : Seryl-tRNA synthase

SFA : Sulfamoyl-seryl-adenylate

SHX : Serine hydroxamate

tMCAO : Middle cerebral artery occlusion

I/ INTRODUCTION

La prévention des conséquences d'une privation des tissus en oxygène, due à un stress ischémique, est une des préoccupations majeures en santé humaine non seulement d'un point de vue clinique mais également d'un point de vue économique pour la collectivité (Eltzschig and Eckle, 2011). Ce type de stress intervient dans des situations pathologiques telles que les maladies de l'appareil circulatoire (comme principalement l'accident vasculaire cérébral (AVC) et l'infarctus du myocarde), lors de la transplantation d'organes (ischémie froide), lors de traumatismes crâniens ou d'hémorragies méningées responsables d'ischémies secondaires et lors de clampage artériel chirurgical (chirurgie cardio-vasculaire). Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde, on estime à 17,7 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardio-vasculaires par an (chiffre OMS) soit 31% de la mortalité mondiale totale. Parmi ces décès, on estime que 7,4 millions sont dus à une cardiopathie coronarienne et 6,7 millions à un AVC. En France les maladies cardiovasculaires sont la deuxième cause de mortalité après les causes néoplasiques (Insee 2015).

Les thérapeutiques à disposition pour les maladies cardiovasculaires et les vasospasmes compliquant l'hémorragie méningée sont la re-canalisation du vaisseau occlus, la thrombolyse pharmacologique ou l'angioplastie endovasculaire. Malgré l'efficacité prouvée des traitements de re-canalisation le facteur temps de mise en œuvre reste le paramètre déterminant mais limitant de leur utilisation avec des effets secondaires non négligeables (Young et al., 2007). Pour la prise en charge des traumatismes crâniens, les thérapeutiques sont restreintes à des mesures symptomatiques de limitation des facteurs d'agression cérébrale secondaire d'origine systémique (ACSOS). Pour finir lors de transplantations d'organes il n'existe pas de thérapeutique validée, à part l'hypothermie, pour limiter le stress ischémique. Les cliniciens sont donc malheureusement en manque de traitements rapidement efficaces limitant la morbi-mortalité de ces pathologies ischémiques en raison de l'absence de cibles pharmacologiques clairement identifiées.

En utilisant des approches *in vivo* et *in vitro*, l'équipe a développé un programme de recherche sur l'identification de nouvelles voies de signalisation impliquées dans la tolérance et l'adaptation cellulaire à des stress physiologiques ou pharmacologiques générant un stress

oxydatif, comme l'hypoxie et l'ischémie. Face à l'impasse actuelle devant laquelle se trouve la recherche médicale dans ce domaine, mon équipe d'accueil a pensé que le retour à des organismes modèles tels que la drosophile pourrait aider à mettre en évidence de nouveaux paradigmes et de nouvelles voies en matière de protection ischémique. En effet, l'utilisation de ces organismes cadre assez bien avec le défi des lésions ischémiques puisque presque tous les organismes existant sur notre planète vivent grâce à l'oxygène. On peut donc raisonnablement supposer que l'évolution a pu sélectionner certains mécanismes moléculaires communs, ou similaires, concernant la gestion de la restriction en oxygène depuis les organismes les plus simples jusqu'aux eucaryotes évolués.

Une nouvelle cible dans la tolérance à l'hypoxie : eIF5A.

En collaboration avec le Dr.Christian Frelin (Inserm U615) mon équipe d'accueil a utilisé le modèle de la drosophile pour identifier de nouvelles voies impliquées dans la tolérance hypoxique (Vigne et al., 2009). En étudiant l'effet de différents régimes alimentaires sur la survie de drosophiles lors de conditions d'hypoxie chronique, cette équipe a pu mettre en évidence que le régime alimentaire jouait un rôle important dans la résistance à ces conditions restrictives. Pour cela, ils ont exposé des drosophiles en conditions hypoxiques en présence de différents régimes alimentaires contenant, soit des sucres, soit des protéines, soit des acides aminés. Ils ont ainsi montré 1) qu'une restriction calorique permettait d'augmenter l'espérance de vie de ces organismes modèles en conditions hypoxiques, 2) que l'ajout de n'importe quel acide aminé au régime alimentaire uniquement sucré était délétère en termes de survie en hypoxie. Le cycle catabolique commun à tous ces acides aminés est le cycle de l'urée qui conduit à l'élimination de l'azote sous forme d'urée mais qui est également à l'origine de la synthèse des polyamines (Figure 1). La conséquence d'une déprivation du régime alimentaire en acides aminés conduit donc à l'arrêt de la synthèse des polyamines. L'hypothèse était donc que l'inhibition de la synthèse des polyamines était à l'origine de l'augmentation de la tolérance ischémique. Les Dr Vigne et Frelin ont confirmé cette hypothèse par le blocage spécifique d'enzymes impliquées dans la synthèse des polyamines. Une des voies spécifiques de la synthèse de ces polyamines conduit à l'activation du facteur d'initiation de la traduction 5A (eIF5A) par hypusination (Figure 1).

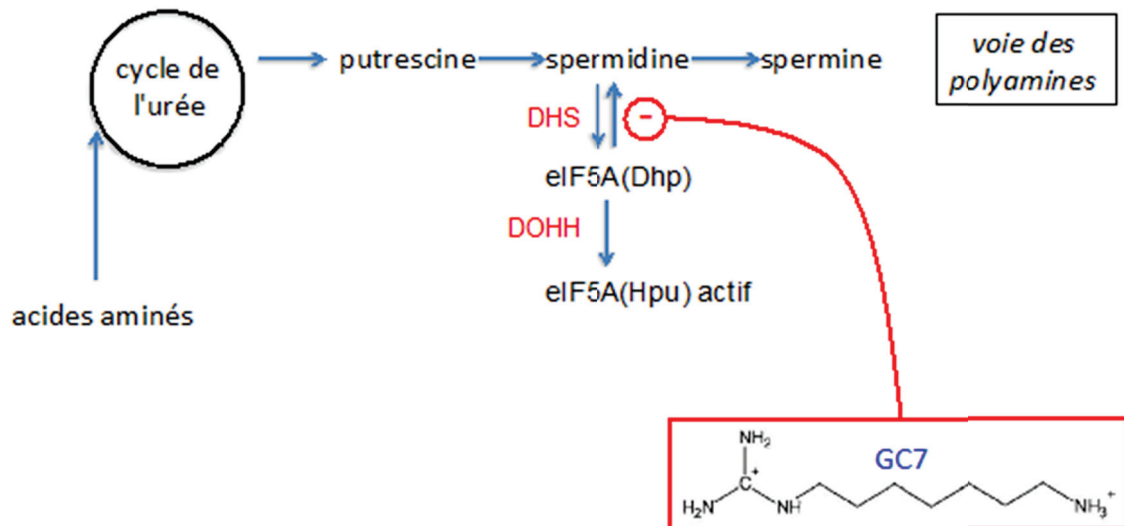


Figure 1 : Schéma simplifié de la voie de synthèse des polyamines et de la voie d'activation du facteur d'initiation de la traduction *eIF5A*. DHS, deoxyhypusine synthase ; DOHH, deoxyhypusine hydroxylase.

En voulant affiner la cible pharmacologique impliquée dans la tolérance hypoxique, les Dr Vigne et Frelin ont testé un inhibiteur hautement spécifique de l'activation de *eIF5A*: le N-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7)(Jakus et al., 1993). Ils ont ainsi montré que chez la drosophile l'inhibition de l'activation de *eIF5A* par le GC7 entraîne une augmentation de la résistance aux conditions hypoxiques (Figure 2).

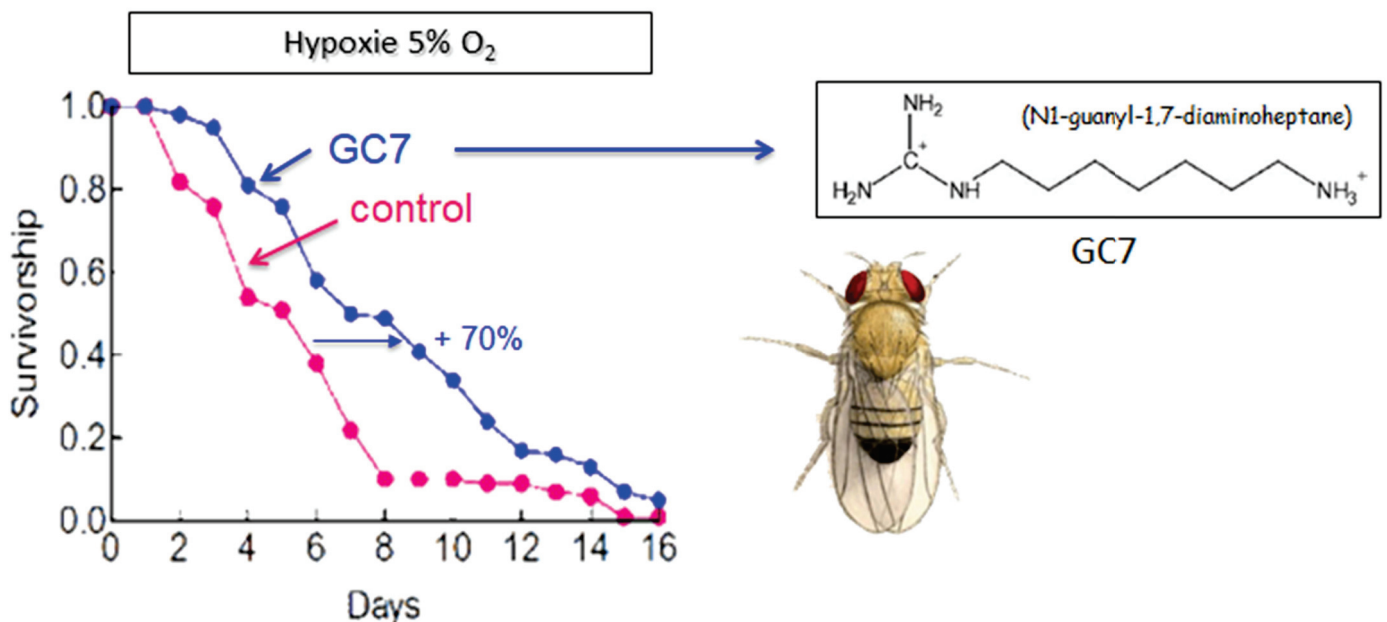


Figure 2 : Effet du GC7 sur la survie de la drosophile en conditions hypoxiques. Les drosophiles exposées à une hypoxie chronique (5% d'oxygène) sont nourries sur un milieu 10% sucrose enrichi avec 0.05% de caséine, en présence (courbe bleue) ou en absence (courbe rose) de GC7 (N1-guanyl-1,7-diaminoheptane : inhibiteur compétitif le plus spécifique de la deoxyhypusine synthase).

eIF5a est une petite protéine cytosolique acide d'environ 17 kDa composée de 154 acides aminés (Cooper et al., 1982) et a été initialement décrit comme un facteur d'initiation de la traduction (Kemper et al., 1976). Mais des études récentes ont montré que eIF5A interagit plutôt après l'initiation de la traduction dans l'étape d'élongation au niveau du ribosome (Zanelli and Valentini, 2007). eIF5A permet la traduction de protéine contenant des séquences poly-proline, PPP ou PPG (Doerfel et al., 2013; Gutierrez et al., 2013; Ude et al., 2013). En ce qui concerne son rôle au niveau cellulaire eIF5A, ses propriétés de modification post-traductionnelles sont absolument nécessaires à la prolifération cellulaire des cellules eucaryotes (Caraglia et al., 2001) et des levures (Park et al., 1998). eIF5A s'est également avéré être impliqué dans les processus physiologiques tels que la réplication du VIH, l'état inflammatoire, la progression du diabète (Kaiser, 2012) ou la prévention et le traitement de tumeur (Nakanishi and Cleveland, 2016).

L'activation post-traductionnelle très spécifique de eIF5A appelée « hypusination » consiste en l'addition d'un résidu spermidine (l'hypusine) sur une lysine spécifique de eIF5A (Park et al., 1981). Cette activation est réalisée par l'action successive de 2 enzymes : la deoxyhypusine synthase (DHS) et la deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) et nécessite la spermidine comme substrat (Figure 3). eIF5A est la seule protéine connue pour être hypusinée (Park, 2006) et est extrêmement conservé au cours de l'évolution (Wolff et al., 2007) (Rossi et al., 2014). Le GC7 bloque l'activation de eIF5A en inhibant spécifiquement la DHS (Figure 3).

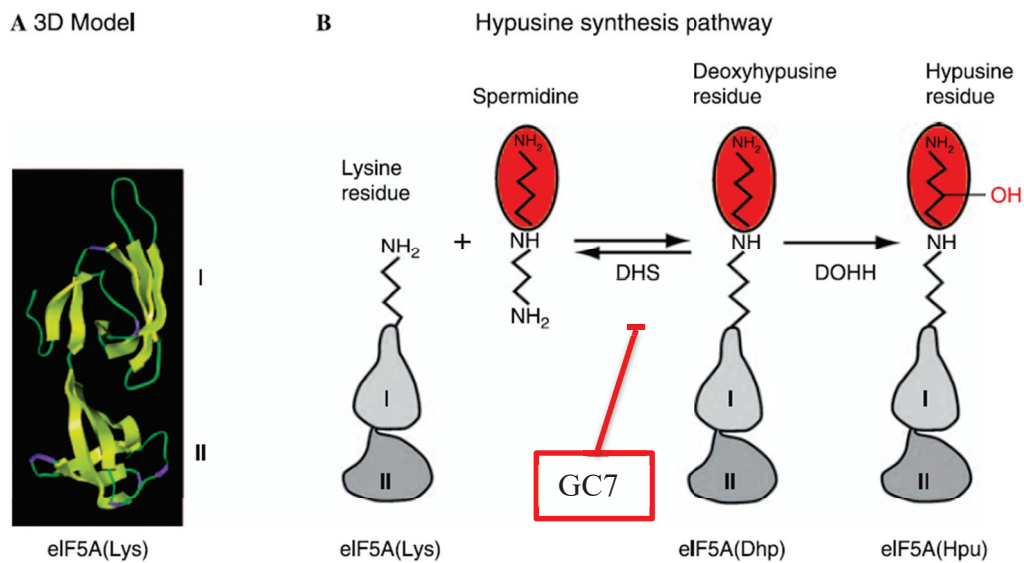


Figure 3: *A: Modèle 3D de eIF5A B: schéma de l'activation de eIF5a par hypusination. GC7 (N1-guanyl-1,7 diaminoheptane): inhibiteur compétitif le plus spécifique de la deoxyhypusine synthase (DHS), DOHH: deoxyhypusine hydroxylase, eIF5A: facteur d'initiation de la traduction 5 A.*

La spermidine qui est utilisée pour la formation de l'hypusine, fait partie des polyamines au même titre que la spermine et la putrescine. Ces biomolécules remplissent de nombreuses fonctions au sein de la cellule et notamment dans la réplication de l'ADN et ont un métabolisme extrêmement régulé. Ces polyamines peuvent modifier la synthèse de protéines et leur niveau d'acétylation (Eisenberg et al., 2009), ce qui peut mener à des phénomènes très différents, de l'autophagie à l'apoptose en passant par les interactions entre cellules et la modulation de la signalisation cellulaire (Pegg, 2016) (Hasanuzzaman et al., 2019) .

Cette étude princeps, impliquant le facteur eIF5A dans la résistance à l'hypoxie, a permis de mettre en évidence un nouveau paradigme dans le contrôle de l'ischémie. Dans un but clinique nous avons voulu transposer ces résultats chez le mammifère.

Validation d'eIF5A dans un modèle de mammifère.

Initialement nous avons choisi le rein comme organe rapporteur puisque cet organe est un des plus gros consommateurs d'oxygène (Hansell et al., 2013) et qu'il est relativement aisé de mesurer ses paramètres fonctionnels. Dans un premier temps et *in vitro*, nous avons utilisé des cultures de cellules issues du tubule proximal de souris que nous avons soumises à une forte hypoxie ($O_2 < 0,1\%$), et nous avons déterminé leur taux de survie en présence et en absence de GC7. Nous avons montré que l'inhibiteur de la DHS (le GC7) ainsi que les siARNs ciblant la DHS ou la DOHH, étaient capables de prévenir en grande partie la mort cellulaire induite par cette hypoxie (Figure 4a). Dans un second temps et *in vivo* nous avons utilisé un modèle d'ischémie/reperfusion rénale chez le rongeur pour démontrer que la voie mise en évidence chez la drosophile pouvait être pharmacologiquement modulée pour augmenter la résistance à l'ischémie. Nous avons montré que le GC7 administré en intra-péritonéal 24 heures avant l'ischémie réduisait l'apparition du marqueur de stress tubulaire NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin). De même le GC7 joue un rôle favorable sur l'excrétion fractionnelle de glucose altérée par l'ischémie. Ainsi, le GC7 protège la fonction rénale d'un stress ischémique induit par une occlusion temporaire de l'artère rénale (Figure 4b)(Melis et al., 2017).

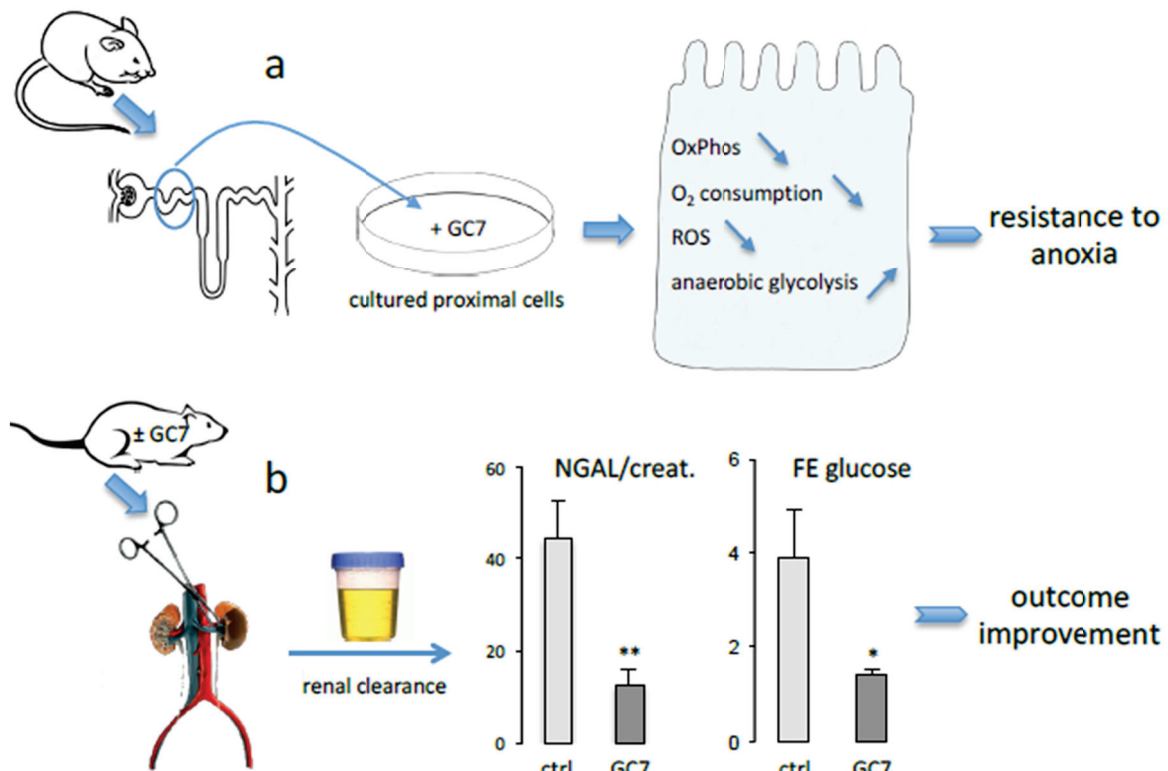


Figure 4 : Schéma de la transposition chez le mammifère du modèle de tolérance à l'ischémie démontrée chez la drosophile.(a) L'analyse in vitro des effets du GC7 a été effectuée sur des cellules proximales rénales de souris. Le préconditionnement (24 h) par le GC7 induit une tolérance à l'anoxie accompagnée par une baisse de la phosphorylation oxydative (OxPhos), une baisse de la consommation d'oxygène, une baisse de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le métabolisme bascule vers la glycolyse anaérobie anaérobie pour maintenir l'état énergétique des cellules. (b) L'analyse in vivo a été réalisé sur un modèle unilatéral d'ischémie rénale chez le rat. Un arrêt de flux sanguin de 40 minutes induit une altération de la fonction rénale qui est largement compensée au niveau structurel (NGAL) et fonctionnel (FE glucose) chez les animaux traités avec le GC7.

En étudiant le mécanisme de cette tolérance mon équipe a pu identifier que l'inhibition de eIF5A par le GC7 entraînait un profond remodelage réversible du métabolisme cellulaire. La production énergétique de la cellule essentiellement due à la phosphorylation oxydative en condition normale dans le tubule proximal (voie aérobie), devient glycolytique (voie anaérobie) entraînant un basculement métabolique rendant les cellules moins dépendantes de l'oxygène. Cette adaptation est indépendante de la voie HIF classiquement activée en condition hypoxique(Lee et al., 2004).Ce basculement métabolique se manifeste au niveau de différents paramètres cellulaires comme :

- l'augmentation de la consommation de glucose et la production de lactate permettant une réduction de la consommation d'oxygène tout en maintenant un taux d'ATP intracellulaire constant.

- Une réduction de l'activité phosphorylation oxydative de la mitochondrie permettant à la cellule de s'adapter aux conditions de stress auxquelles elle va être exposée.

Une des principales conséquences de la mise en dormance de la mitochondrie est de rendre les cellules moins sensibles au stress oxydatif en réduisant la production de radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ROS, « reactive oxygen species ») (Melis et al., 2017).

Grâce à une étroite collaboration avec une équipe travaillant sur l'accident vasculaire cérébral (Nicolas Blondeau, IPMC, Valbonne) nous avons testé l'effet du GC7 dans un modèle murin d'ischémie cérébrale focale (modèle tMCAO « middle cerebral artery occlusion »). L'inhibition pharmacologique par le GC7 de l'hypusination d'eIF5A conduit *in vitro* à la réduction significative de la mort cellulaire de neurones en culture primaire soumis à une déprivation en oxygène et en glucose (OGD) (Figure 5A), et *in vivo* à une réduction de la mortalité (Figure 5B) et de plus de 30% de la zone de pénombre (infarct volume) (Figure 5C données non encore publiées par l'équipe) chez des souris soumises à une ischémie focale transitoire (modèle tMCAO).

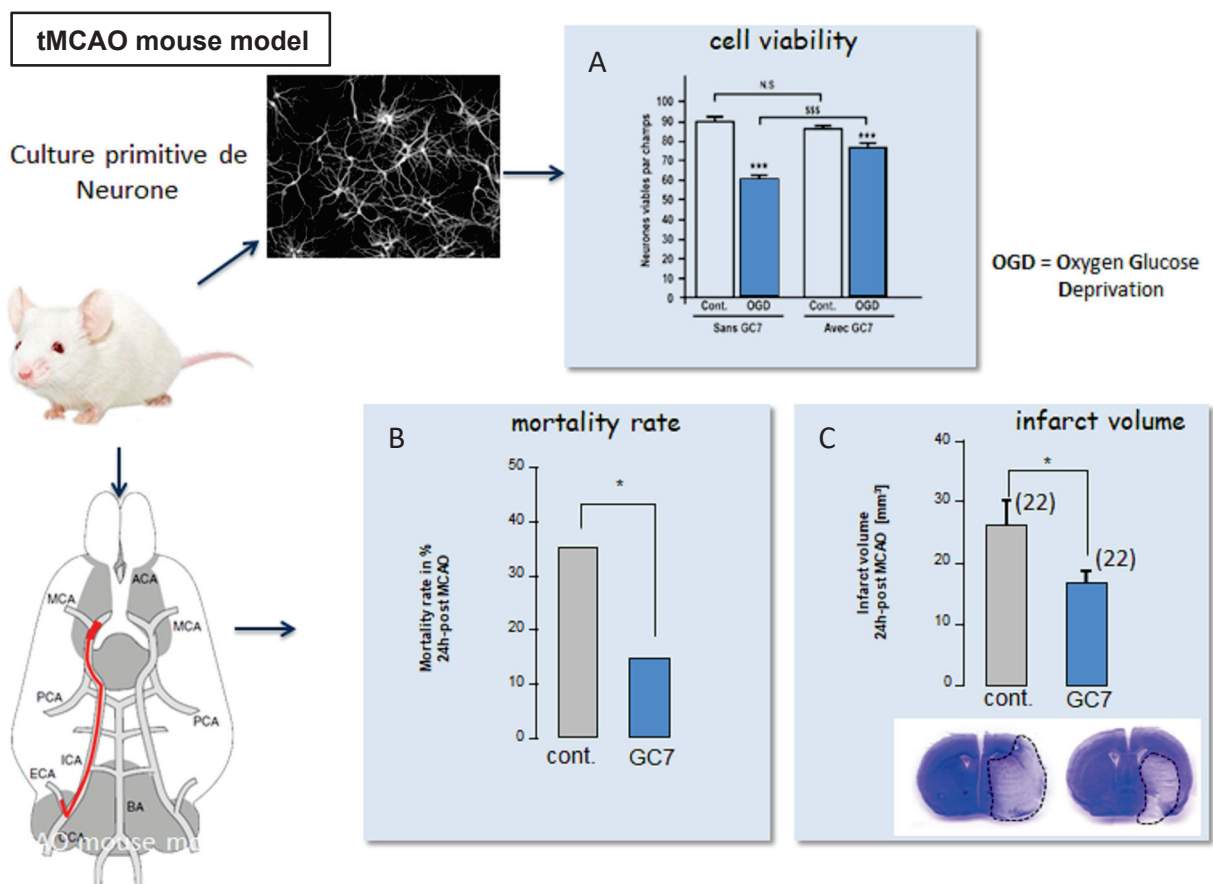


Figure 5: Le traitement par le GC7 induit une inhibition de l'hypusination d'eIF5a *in vitro* et *in vivo* qui protège contre une ischémie focale (tMCAO). (A) taux de mortalité des cellules neuronales primitives en condition contrôle et post OGD en présence ou non de GC7. (B) taux de mortalité post tMCAO (ligature ACM) pour le groupe contrôle (traitement par solution saline n=20) et groupe traité par GC7(3 mg/kg/j injection i.p pendant 3 jours n=21). le GC7 induit une réduction de la mortalité après tMCAO (*p<0.05, test fisher); (C) Coupes coronales représentatives 24H post tMCAO. Les zones délimitées par les pointillés apparaissent brillantes. Volume moyen d'infarctus mesuré chez les souris contrôles et traités. Valeurs exprimées en moyenne ± SEM, n=9-14, *p<0,05.réduction de 30% du volume infarcti.

Finalement dans une optique de développement préclinique nous avons transposé ces résultats à un modèle de transplantation rénale chez le cochon. Nous avons montré que le traitement du donneur avec le GC7 améliore très significativement la reprise fonctionnelle du greffon jusqu'à 3 mois après l'acte chirurgical (Melis et al., 2017). La reprise de la diurèse est plus rapide (Figure 6a), la créatinine plasmatique reste toujours largement inférieure chez les animaux traités (Figure 6b), le niveau de stress oxydatif est contrôlé (Figure 6c) et la fibrose ne se développe pas (Figure 6d). L'inhibition spécifique de la voie d'activation du facteur d'initiation de la traduction eIF5A est donc une nouvelle cible pharmacologique de la tolérance ischémique applicable chez le mammifère jusqu'au niveau préclinique.

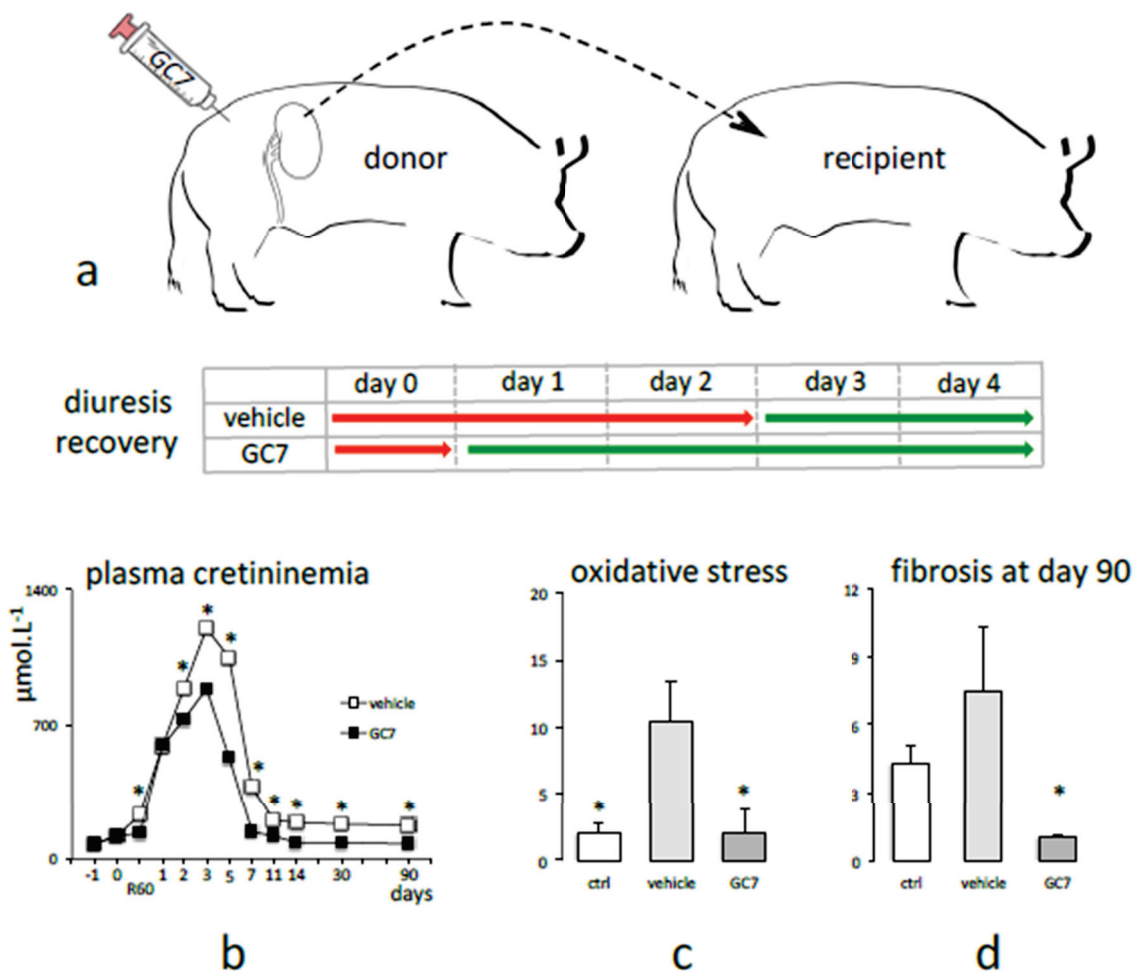


Figure 6 : Schéma de l'utilisation pré clinique du GC7 dans la transplantation rénale chez le porc. Le porc donneur a été pré-conditionné avec le GC7 avant le prélèvement du greffon. La préservation et la transplantation ont suivi des protocoles classiques utilisés en clinique humaine. a : Les animaux pré-conditionnés au GC7 ont récupéré une diurèse normale plus tôt que chez les animaux témoins. b : Les taux de créatinine plasmatique ont été systématiquement inférieurs à ceux des animaux témoins dans le groupe traité et ce jusqu'à 3 mois après la transplantation, confirmant l'effet protecteur du GC7 sur la greffe. De même, la CG7 a également empêché c : l'augmentation du stress oxydatif et le développement de la fibrose. R60 est le temps 60 min après la reperfusion ou ont été effectués les biopsies.

La seryl-tRNA synthase (serRS) sous le contrôle traductionnel de eIF5a est impliquée dans la tolérance à l'ischémie.

Par son rôle essentiel dans la traduction protéique l'inhibition de eIF5a conduit nécessairement à une altération dans la traduction d'un certain nombre de cibles en aval, même s'il a été montré que eIF5A est très sélectif pour un faible nombre de mRNA très particuliers (Xu et al., 2004). Afin de rechercher la cible primaire impliquée dans la tolérance ischémique et sous le contrôle traductionnel de eIF5A, l'équipe a effectué une étude protéomique en gel bi-dimensionnel associée à une identification par spectrométrie de masse des protéines exprimées de façon différentielle en présence de GC7. Parmi celles-ci nous avons identifié une protéine : La seryl-tRNA synthase (serRs) qui voit son expression chuter d'un facteur 12 en présence de GC7 sur des cultures de cellules rénales (Figure 7).

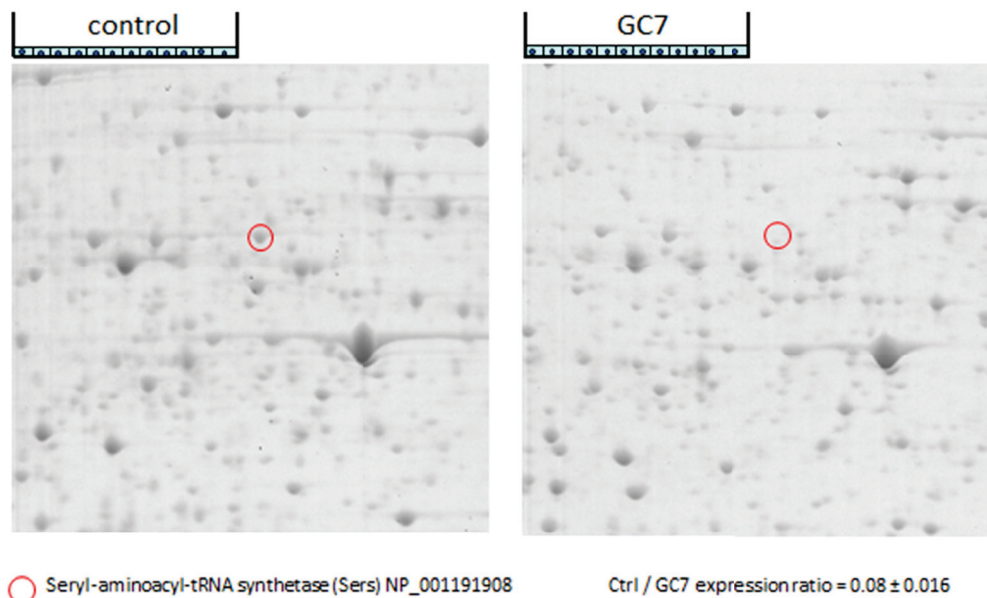


Figure 7: Analyse protéomique en gel bi-dimensionnel: Baisse de la protéine cible d'un facteur 12 en présence de GC7.

Cette protéine et plus largement l'ensemble des aminoacyl-tRNA synthases (présent chez tous les organismes vivants) participe à la traduction d'ARN messagers en protéines en catalysant la fixation d'un acide aminé sur un ARN de transfert (ARNt) spécifique (Figure 8). Ces ARNt dirigent ensuite leur acide aminé respectif au site d'élongation de la protéine en cours de synthèse. Chaque aminoacyl tRNA fixe son acide aminé unique grâce à son enzyme spécifique l'aminoacyl-tRNA synthase (20 chez les mammifères) (Richardson and First, 2015).

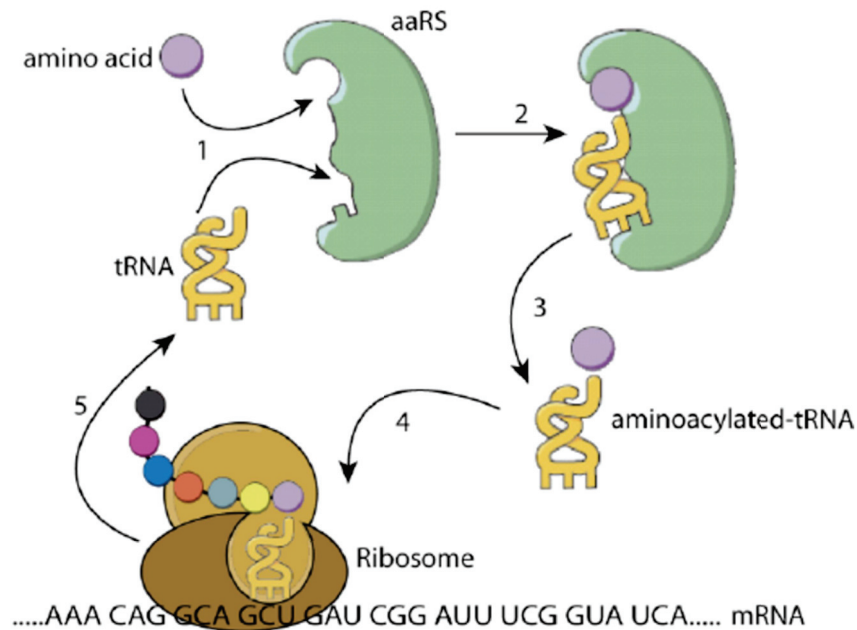


Figure 8 : Rôle de l' aminoacyl tRNA synthase (aaRS) dans la traduction de l'ARN messenger en protéine.

Etape 1 : l'acide aminé est activé par l'ATP et est lié à l'aaRS.

Etape 2 : L'acide aminé est transféré à l'extrémité 3' du tRNA.

Etape 3 : relargage du complexe acide aminé –tRNA.

Etape 4 : Migration du complexe dans le ribosome pour incorporer l'acide aminé à la chaîne au site d'élongation.

A côté de leurs rôles cruciaux dans la synthèse protéique (Rajendran et al., 2018), il a été démontré que les aminoacyl-tRNA synthases eucaryotes possèdent des fonctions satellites qui se sont développées au cours de l'évolution (Yao and Fox, 2013). Dans une étude menée chez *C. elegans*, Anderson et al. ont montré que l'inactivation génique de certaines aminoacyl-tRNA synthases augmentaient la survie des vers maintenus en hypoxie (Anderson et al., 2009). De manière plus générale, l'inhibition de la synthèse protéique (traitement à la cycloheximide) induit une protection à des situations de stress hypoxie/ischémique. Il existe donc une relation étroite entre la synthèse protéique et la survie cellulaire en condition hypoxique (Burda et al., 2003) (DeGracia et al., 2002).

Pour valider la sérine-tRNA synthase (serRS) comme cible potentielle chez le mammifère nous avons utilisé un dérivé non métabolisable de la sérine, la sérine hydroxamate (Ahel et al., 2005), substrat compétitif de la serRS. Nous avons soumis des cellules rénales en culture à une anoxie de 24 h en présence de sérine hydroxamate (SHX).

Les tests de viabilité cellulaire menés avec le kit "live/dead assay®" (Figure 9A) ont montré une augmentation (+70%) de la survie (identique à celle obtenue en présence de GC7) en présence de SHX (15 mM) (Figure 9B). Cette forte concentration de SHX est nécessaire car c'est un compétiteur de la sérine dont la concentration intracellulaire est de l'ordre du millimolaire. Ainsi la dose de 3 mM de SHX n'a pas d'effet car il est en concentration insuffisante pour entrer en compétition avec la sérine. Pour éliminer un potentiel effet aspécifique du SHX nous avons réalisé sur nos cellules une inactivation génique de la serRS par une stratégie siRNA et avons confirmé les résultats obtenus avec le SHX (Figure 9B).

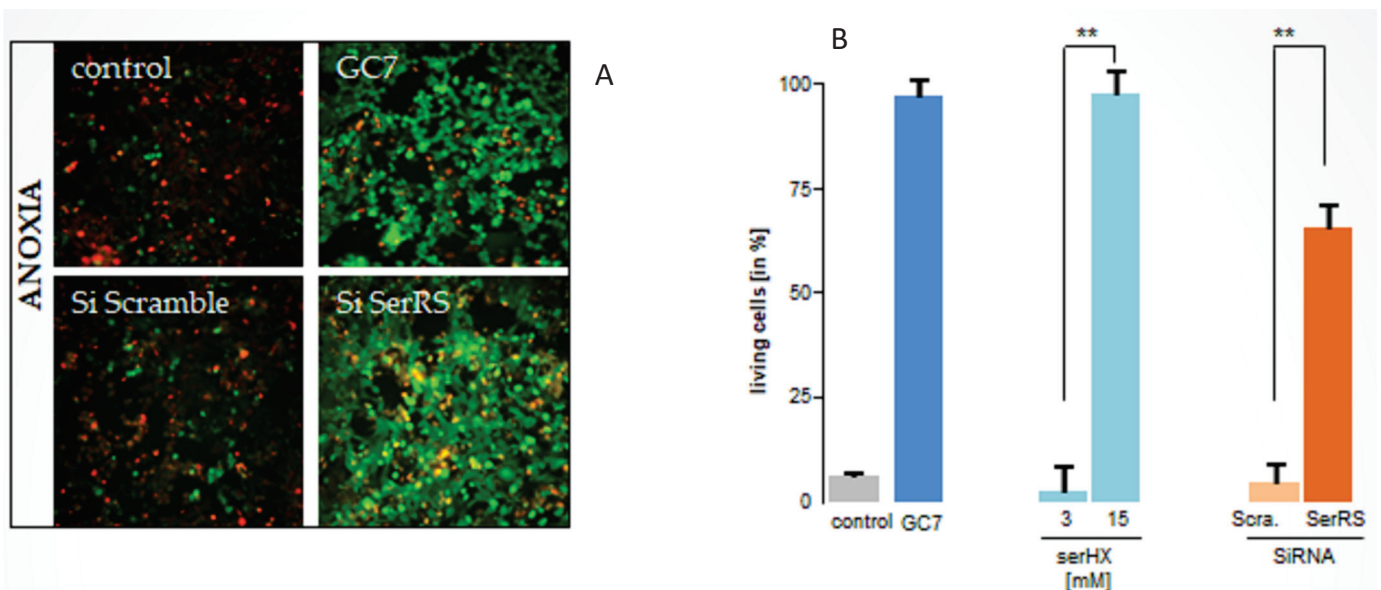


Figure 9 : L'inhibition pharmacologique avec la serine hydroxamat (serHX) inhibiteur de faible affinité ou par inactivation de l'expression génique (siRNA) de la serRS protège les cellules de la mort cellulaire induite par l'anoxie cellulaire. A) micrographies de cellules rénales maintenues en anoxie pendant 24 h en présence de GC7 30µM, d'un siRNA ciblant la serRS, d'un siRNA aspécifique. Les cellules vivantes apparaissent en vert et les cellules mortes en rouge. B) quantification des cellules vivantes obtenues à partir des cellules marquées au live/dead assay.

La serRS est donc une cible primaire, sous le contrôle de eIF5A et dont l'inhibition induit la tolérance à l'ischémie. Cette cible est l'objet d'un brevet actuellement en cours d'instruction. La découverte de cette toute nouvelle cible pharmacologique de l'ischémie ouvre des perspectives intéressantes dans toutes les pathologies dans lesquelles le stress ischémique est un facteur délétère aux conséquences irréversibles.

Synthèse d'un inhibiteur de forte affinité.

Pour une utilisation en clinique il est nécessaire de développer un inhibiteur de haute affinité de cette enzyme. La serRS a été cristallisée dans les années 90 (Belrhali et al., 1994) grâce à l'utilisation d'un inhibiteur synthétique le sulfamoyl-séryl-adenylate (SFA)(Ueda et al., 1991) qui n'a jamais été utilisé à des fins biologiques en clinique et qui n'est pas commercialisé. C'est un inhibiteur efficace qui présente une haute sélectivité pour l'enzyme (en cours de brevet). Le Dr Michel Tauc a fait re-synthétiser cet inhibiteur (SFA, Figure 10) à très haute affinité par le laboratoire AtlanchimPharma (Nantes, France).

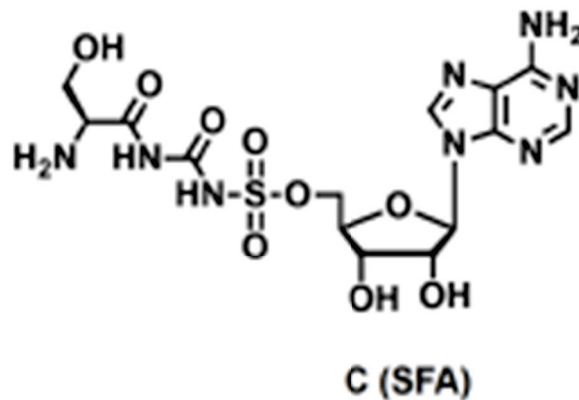


Figure 10: Structure générale de l'inhibiteur synthétique sulfamoyl-séryl-adenylate (SFA).

Objectifs.

Notre hypothèse actuelle de travail, justifiée par nos résultats préliminaires, est que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la séryl-tRNA synthase permettrait de diminuer les altérations fonctionnelles consécutives à une période d'ischémie. Le but de ce mémoire est de montrer et de valider l'efficacité du SFA comme composé actif dans les cas d'ischémie. Le but final étant d'apporter aux cliniciens une nouvelle arme de la lutte contre l'ischémie.

Notre projet s'est déroulé de la façon suivante :

- **Détermination des constantes cinétiques de la protéine cible en présence de l'inhibiteur néo-synthétisé.**

Comme la protéine cible identifiée est un acteur important dans la machinerie de synthèse protéique nous avons décidé, pour mesurer les capacités biologiques du SFA, d'utiliser une méthode "rapportrice" basée sur la synthèse d'une protéine ayant des propriétés de luminescence : la luciférase.

Cette protéine doit être absolument intacte pour exprimer ses propriétés de luminescence, toute modification ou altération d'un des constituants de la synthèse protéique, dont la protéine cible, résultera dans la baisse du signal de luminescence de la luciférase et donnera une indication claire de l'efficacité des inhibiteurs.

- **Tests in vitro sur cellules afin d'évaluer la capacité de cet inhibiteur à augmenter la tolérance anoxique.**

L'inhibiteur (montrant une forte affinité pour la protéine cible) sera appliqué sur des cellules rénales immortalisées en culture, développées et utilisées en routine par l'équipe et sur des cultures primaires de neurones corticaux de souris (expérimentation réalisée à l'IPMC, Sophia).

II/MATERIELS ET METHODES

Détermination des constantes cinétiques de la protéine cible en présence de l'inhibiteur SFA.

La synthèse de la luciférase se fait *in vitro* à l'aide d'un lysat de réticulocytes de lapin commercialisé (Rabbit Reticulocyte Lysate System, Proméga) en utilisant comme matrice l'ARN messager codant la luciférase (Luciferase Control RNA, Proméga). Ce lysat contient tous les éléments nécessaires à la synthèse protéique y compris la protéine cible que nous cherchons à inhiber. La luminescence est détectée grâce à un kit également commercialisé (Nano-Glo® Luciferase Assay, Proméga) associé à un lecteur de plaques. Cette technique très sensible permet de mesurer les paramètres cinétiques de la protéine cible en présence de l'inhibiteur synthétisé et de déterminer l'affinité pour des concentrations variant de 0.03 à 20 μM .

Tests *in vitro* sur cellules afin d'évaluer la capacité de cet inhibiteur à augmenter la tolérance anoxique.

Matériels

L'inhibiteur GC7 (N-guanyl-1,7-diaminohepatne) et le SFA ont été synthétisés par AtlanChimPharma (Nantes, France).

Lignées cellulaires

Le modèle rénal est une lignée cellulaire (PCT) immortalisée par transformation au SV40 d'une culture primaire de cellules du tubule contourné proximal de souris isolées par microdissection.

Le modèle neuronal est constitué de cultures primaires de neurones corticaux qui sont prélevés à partir d'embryons de souris C57BL6 à E14, les cortex sont découpés en petits morceaux puis dissociés au GentleMacs (Milteni Biotec, kit 130-092-628).

Milieux de culture et d'expérimentation

La lignée rénale est cultivée en milieu semi-défini (DMEM-F12) complétement avec 20mM d'HEPES, 15mM de bicarbonate, 5µg/ml d'insuline, 1.10^{-8} M de tri-iodothyronine (T3), 2mM de L-Glutamine, 3.10^{-8} M de sélénium, 5µg/ml de transférine, 5.10^{-8} M de dexaméthasone, 10.10^{-6} g/l d'epidermal growth factor (EGF), 1% de sérum de veau foetal (SVF), 250µg/ml de G418, un antibiotique pour ne sélectionner que les cellules transformées au SV40 et ainsi devenues résistantes au G418. Le milieu ainsi préparé est dit milieu M1. Les cellules sont cultivées à 37°C et 5% CO₂, sur des boîtes de pétri enduites de collagène, permettant aux cellules d'adhérer à la boîte et de développer une polarité (lame basale dirigée vers le collagène et face apicale vers le milieu de culture). Pour l'expérimentation 2 autres milieux sont utilisés : le milieu semi-défini (DMEM-F12) sans facteur de croissance complétement par seulement 20mM d'HEPES dit milieu MO et le milieu HBSS (pauvre en glucose) complétement avec 20 mM d'HEPES.

Les neurones corticaux sont ensemencés dans des plaques 24 puits (Falcon) à raison de 300000 cellules par puits dans 1mL de milieu Neurobasal (Gibco) supplémenté de 1% Glutamax (Gibco), 1% antibiotique Pénicilline – Streptomycine (Gibco) et 2% B27 (Gibco). Afin de bloquer la prolifération des autres types cellulaires notamment la microglie, un traitement à la FluorodéoxyUridine (2 µM final, Sigma) + Uridine (2µM final, Sigma) est nécessaire 24H après ensemencement. Les neurones sont ensuite maintenus en culture pendant 14 jours.

Modèles d'anoxie

Modèle rénal : les cellules sont soumises à une atmosphère dépourvue en oxygène (O₂<0,1%) dans un caisson hermétique pendant une durée de 24 heures en présence du SFA ajouté ½ heure avant l'anoxie à plusieurs concentrations (10 µM, 3 µM, 1 µM et 0,3 µM). Leur viabilité est déterminée à l'aide d'un kit live/dead. Ce kit (Invitrogen®) repose sur l'utilisation de deux sondes : la calcéine AM et un homodimère de bromure d'éthidium. La calcéine AM permet de révéler les cellules vivantes, qui sont capables d'estérifier et de retenir la sonde et qui émettent une fluorescence verte (excitation à 485nm, émission à 530nm). Les cellules mortes, qui ont perdu leur intégrité cellulaire deviennent perméables au bromure d'éthidium se liant à l'ADN, sont révélées en rouge (excitation à 530nm, émission à 645nm).

Les cellules cultivées avec ou sans inhibiteur sont rincées au HBSS puis incubées avec 200µL de solution de marquage contenant la calcéine AM et le bromure d'éthidium, et incubées 30 minutes à température ambiante, à l'obscurité ; les cellules sont ensuite rincées (X2 HBSS). Ces préparations sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence et les images prises au cours de ces observations subissent un traitement informatique (seuillage du niveau de gris), au cours duquel un ratio est fait avec la totalité des pixels présents sur l'image : ratio quantitatif "vivant (vert)/mort (rouge)". le GC7 sert de contrôle positif de résistance avec pré-traitement 12 heures avant la mise en anoxie.

Modèle neuronal : Le modèle d'OGD (Oxygen Glucose Deprivation) permet de reproduire in vitro le déficit en oxygène et glucose découlant d'un arrêt d'irrigation dans le cadre d'un AVC (Goldberg and Choi, 1993). Les cellules sont traitées pendant 3H avec le GC7 (30µM) et le SFA (5µM). le milieu de culture est remplacé par un milieu sans glucose et les cellules sont placées dans un incubateur à hypoxie à 1,2% d'O₂ pendant 1H. Le milieu utilisé ici est le HBSS sans glucose contenant du NaCl (8g/L), KCl (0.26g/L), MgSO₄ (0.2g/L), CaCl₂ (0.264g/L), NaHCO₃ (2.24g/L) et NaH₂PO₄ (0.15g/L). Après 1H d'OGD, les cellules sont replacées dans un incubateur à normoxie (37°C, 5% de CO₂) dans leur milieu de culture. Les conditions sans OGD sont traitées de la même manière et sont placées dans un incubateur à normoxie dans du milieu HBSS avec glucose (Gibco, supplémenté en glucose pour une concentration finale à 6 g/L) pendant la durée de l'OGD.

Mesures de viabilité par comptage au microscope à fluorescence.

Les cellules neuronales sont fixées dans les plaques de culture avec du Paraformaldéhyde 4% puis marquées avec du Hoechst (10µg/mL). Le Hoechst est un marqueur nucléaire fluorescent qui se lie directement aux bases Adénine et Thymine. Ce marquage va permettre un comptage des noyaux cellulaires avec un microscope à fluorescence par champ (Cytation 5-BioTek).

Mesure de la prolifération cellulaire et de la concentration de lactate.

La mesure de la prolifération cellulaire est effectuée par dosage quantitatif protéique sur chaque échantillon par utilisation d'un kit de test colorimétrique associé à un lecteur de plaques (DC Protein Assay , Bio Rad France) en présence de l'inhibiteur SFA à différentes concentrations (10 μ M, 3 μ M, 1 μ M et 0,3 μ M) sans anoxie à J1, J2, J3. La concentration de lactate est réalisée sur le surnageant de chaque échantillon par chromatographie ionique (Dionex ICS-5000+).

Mesure de la consommation d'oxygène cellulaire.

L'évaluation de la consommation moyenne d'oxygène des cellules PCT est effectuée à l'aide d'un XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, Proteigene). Les consommations d'oxygène basale et maximale sont déterminées respectivement avant et après injection de FCCP (1 μ M, découplant chimique de la respiration), qui perméabilise la membrane et permet de calculer la respiration mitochondriale maximale. La respiration mitochondriale est enfin bloquée par ajout de la roténone (1 μ M) et d'antimycine A (1 μ M) qui inhibent, respectivement, le complexe I et III de la chaîne respiratoire et permet de calculer la respiration mitochondriale basale.

Etude statistique.

Les résultats du modèle rénal sont présentés en valeurs moyennes \pm les erreurs standards à la moyenne pour le nombre (n) d'expérimentations réalisées. Un test de Student a été utilisé pour comparer les valeurs moyennes de chaque condition expérimentale. Les résultats du modèle neuronal sont exprimés en moyennes \pm SEM. Les analyses statistiques de différence entre deux groupes ont été réalisées en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney avec une significativité pour $p < 0,05$.

III/RESULTATS

Effet dose/réponse de l'inhibiteur SFA sur l'activité enzymatique de la luciférase.

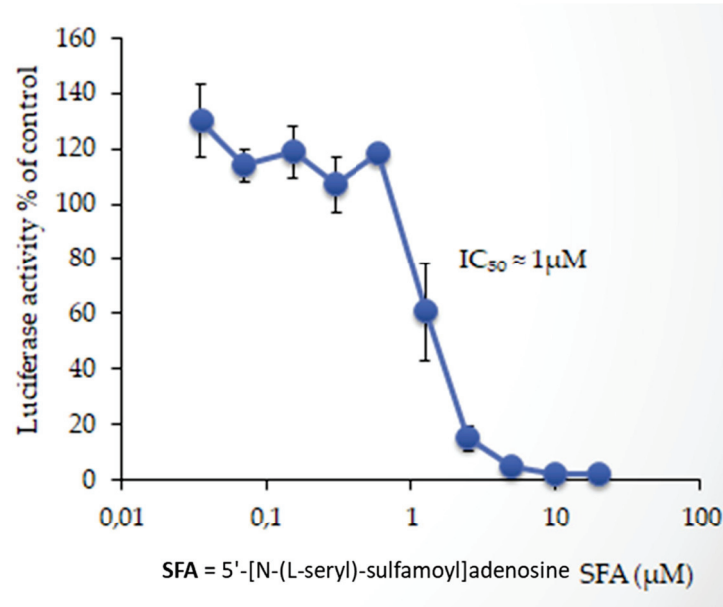


Figure 11: Effet inhibiteur du SFA sur la synthèse de la luciférase. En abscisses : luminescence mesurée en pourcentage par rapport au groupe contrôle. En ordonnées : concentration de SFA de 0.03 à 20 µM.

En utilisant un système de traduction in vitro (réticulocytes de lapin) nous avons mis en évidence une relation entre la concentration de l'inhibiteur SFA et la baisse d'activité de la luciférase utilisée comme protéine "rapporteur" de la traduction protéique. La luminescence émise est très peu diminuée pour des concentrations très faibles de SFA (0.03µM à 0.7 µM). La baisse de la moitié de la luminescence (IC₅₀) est obtenue pour une concentration voisine de 1µM. L'inhibition totale de l'enzyme est obtenue à partir d'une concentration supérieure à 3µM (Figure 11). Cette expérimentation nous permet de montrer de manière indirecte l'efficacité de l'inhibiteur synthétique sur la machinerie traductionnelle.

Absence de toxicité de l'inhibiteur SFA sur cellules PCT en condition de normoxie.

Nous avons testé la toxicité de l'inhibiteur à différentes concentrations (10, 3, 1, 0.3 µM) sur des cellules PCT en condition normoxique pendant 24H par rapport au groupe contrôle sans SFA. La viabilité est mesurée par le Kit Live/Dead (Molecular Probes).

Les cellules vivantes émettent une fluorescence verte et les cellules mortes une fluorescence rouge. On ne met en évidence aucune différence significative de fluorescence verte et donc de la survie cellulaire entre le groupe contrôle et les différentes concentrations de SFA. Ceci montre que dans ces conditions expérimentales le SFA ne présente pas de toxicité (Figure 12).

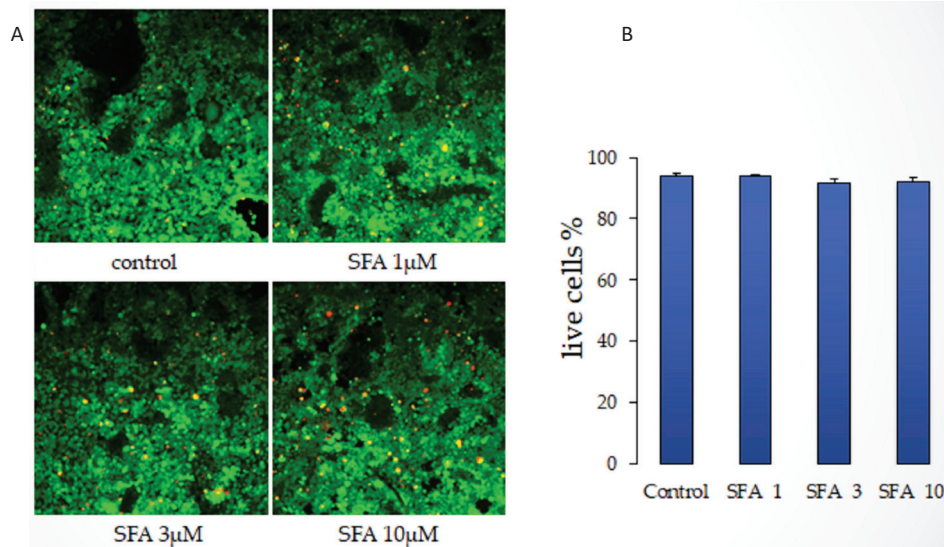


Figure 12: absence de toxicité du SFA sur la survie cellulaire en condition de normoxie. (A) Images de microscopie à fluorescence représentant l'effet du SFA (1,3,10 µM) après 24H de normoxie. Coloration avec double marquage par calceine AM (vert) et homodimère de bromure d'éthidium (rouge). Les cellules vivantes apparaissent en vert et les cellules mortes en rouge. (B) Représentation quantitative de la survie cellulaire après une période de normoxie de 24H en milieu M1.

Absence de toxicité du SFA sur les cellules neuronales corticales en condition de normoxie.

Nous avons montré l'absence de cytotoxicité du traitement par le SFA sur les cultures primaires de neurones corticaux pour un temps d'application de 3H ou 24H (Figure 13).

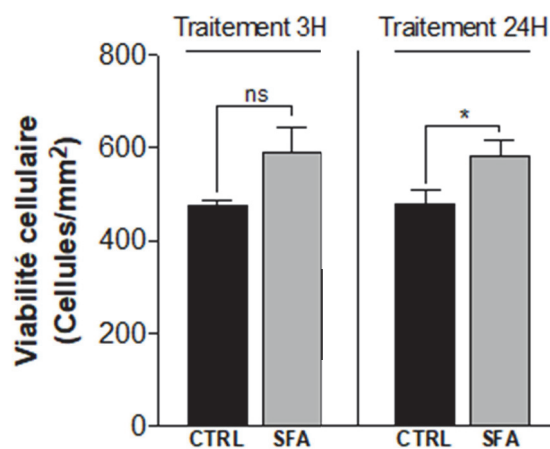


Figure 13: Effet du SFA (5 µM) sur la viabilité cellulaire après 3H ou 24H de traitement. Les données sont des comptages exprimés en moyennes ±SEM.

Effet du SFA sur la mort cellulaire induite par l'anoxie dans des cellules PCT en culture dans différents milieux (M1, M0, HBSS).

Les cellules rénales ont été soumises à une anoxie de 24 h en présence de GC7 (30 μ M) et de SFA en concentrations croissantes. Ces expériences ont mis en évidence une différence significative du rapport de fluorescence vert/rouge indiquant une meilleure survie dans le groupe GC7, SFA 10, 3 et 1 μ M par rapport au groupe contrôle en milieu de culture M1 (Figure 14 A, B). On retrouve des résultats similaires en milieu de culture M0 (DMEM-F12) (Figure 14 C) et HBSS (figure 14 D).

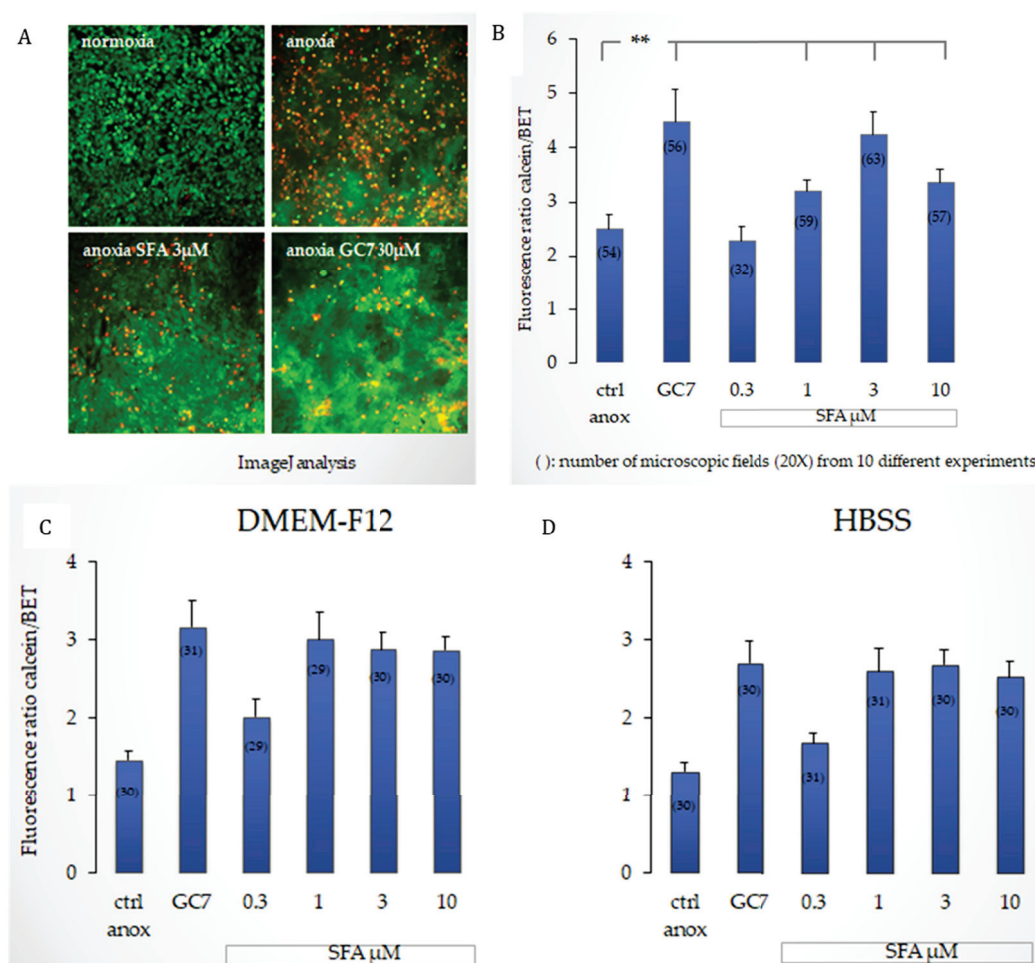


Figure 14: effet du SFA sur la survie cellulaire après 24H anoxie. (A) Images de microscopie à fluorescence représentant l'effet du GC7 (30 μ M) et du SFA (3 μ M) par rapport aux cellules contrôles après 24H d'anoxie. Coloration avec double marquage par calceine AM (vert) et homodimère de bromure d'éthidium (rouge). Les cellules vivantes apparaissent en vert et les cellules mortes en rouge. (B) Représentation quantitative de la survie cellulaire par le rapport Live/Dead après une anoxie de 24H en milieu M1. Cellules PCT confluentes, pré-traitées soit par le GC7 (30 μ M) soit par le SFA (0.3, 1,3 ,10 μ M) (** p <0.01). (C) Représentation quantitative de la survie cellulaire par le rapport Live/Dead après une anoxie de 24H en milieu M0. Cellules PCT confluentes pré-traitées soit par le GC7 (30 μ M) soit par le SFA (0.3, 1,3 ,10 μ M). (D) Représentation quantitative de la survie cellulaire par le rapport Live/Dead après une anoxie de 24H en milieu HBSS. Cellules PCT confluentes pré-traitées soit par le GC7 (30 μ M) soit par le SFA (0.3, 1,3 ,10 μ M).

Effet du SFA sur la mort cellulaire induite par OGD dans des cellules de neurones corticaux.

Dans le modèle d'OGD, nos résultats montrent qu'au temps T3 H (après OGD), le SFA réduit la perte cellulaire à 20% au lieu de 35% (condition non traitée) et au temps T24 H (après OGD) à 15% au lieu de 40% (condition non traitée) (Figure 15A). L'inhibiteur SFA a donc un effet neuroprotecteur sur les cultures primaires de neurones corticaux soumis à un stress ischémique comme le modèle d'OGD *in vitro*. Les photos des marquages des noyaux au Hoechst illustrent cette neuroprotection (Figure 15B).

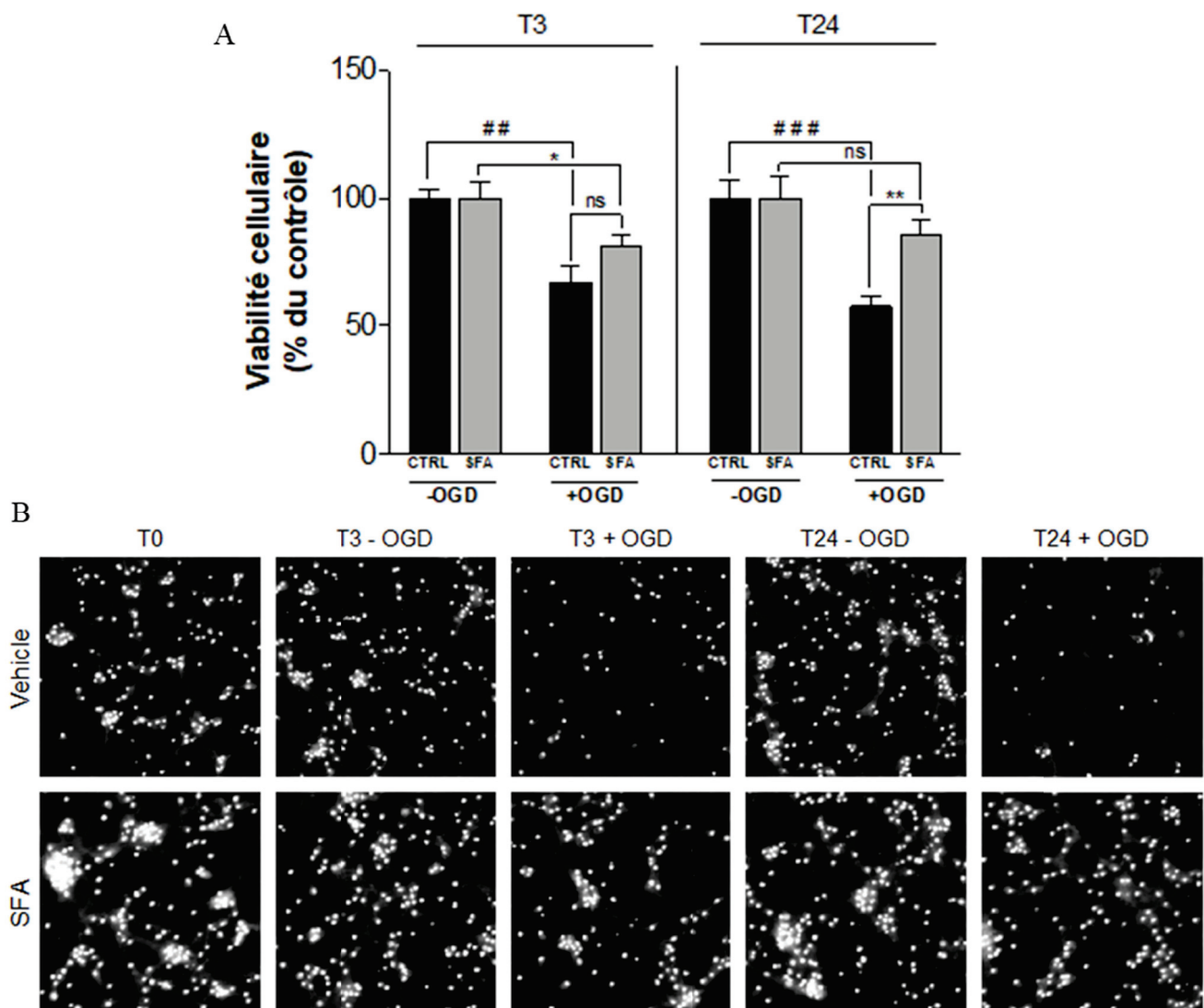


Figure 15: Effet du SFA sur des cultures primaires de neurones corticaux exposés ou non à 1H d'OGD. (A) Effet du SFA sur des cultures primaires de neurones corticaux exposés ou non à 1H d'OGD. Les données sont des comptages exprimés en \pm SEM et en % de la condition sans OGD * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, significatif par rapport à la condition non traitée. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, significatif par rapport à la condition sans OGD. (B) Photos illustrant la densité des cultures primaires de neurones corticaux traités ou non au SFA et exposés ou non à 1H d'OGD, marquage nucléaire au Hoechst.

Effet du SFA et du GC7 sur la prolifération cellulaire en conditions de normoxie sur 3 jours.

La mesure par la quantité de protéines neo-synthétisées utilisées comme rapporteur de la division cellulaire sur 3 jours dans le groupe contrôle et SFA 3 μM ne montre pas de différence significative de prolifération cellulaire, contrairement au groupe GC7 où il y a une baisse significative de la prolifération cellulaire (Figure 16) ce qui confirme les données de la littérature (Melis et al., 2016). Cela montre également que bien qu'ayant tous les deux un effet protecteur contre l'anoxie le GC7 touche probablement d'autres cibles impliquées dans la prolifération.

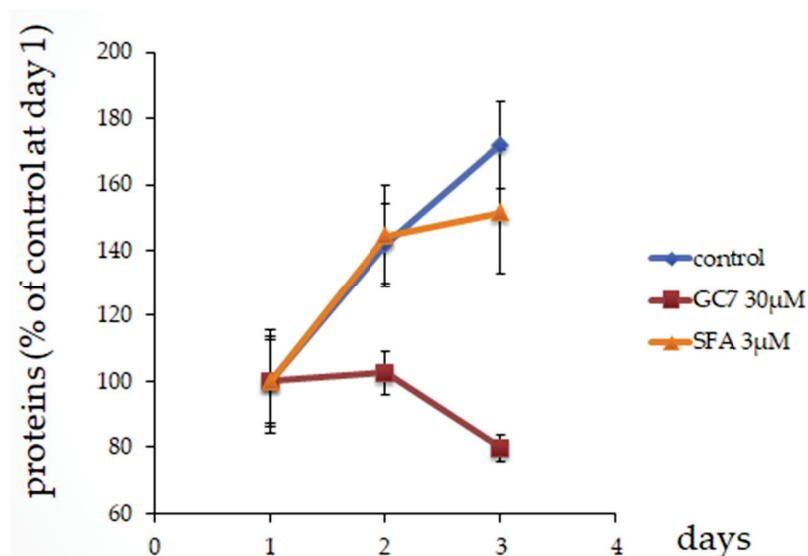


Figure 16 : Prolifération cellulaire des cellules rénales PCT mesurée sur 3 jours par l'augmentation des protéines au cours du temps dans des conditions de normoxie en présence de GC7 ou de SFA. Représentation quantitative de la production protéique sur 3 jours par des cellules PCT traitées dans un groupe par du GC7 (30 μM) et dans un autre groupe par du SFA (3 μM) par rapport au groupe contrôle.

Effets du SFA et GC7 sur la production de lactate par les cellules proximales rénales dans des conditions de normoxie.

Comme nous l'avons vu plus haut l'effet protecteur du GC7 sur l'ischémie s'accompagne d'un basculement métabolique vers la glycolyse anaérobie caractérisé par une augmentation de la sécrétion de lactate. Nous avons voulu voir l'effet du SFA sur cet aspect métabolique. Nous avons montré une absence de différence significative de production de lactate entre le groupe contrôle et le groupe SFA à 3 μM à J1 et J2. Par contre, il y a une différence significative entre le groupe contrôle et le groupe GC7 à J1 et J2 (Figure 17) déjà mis en évidence par l'équipe et publié dans la littérature (Melis et al., 2017).

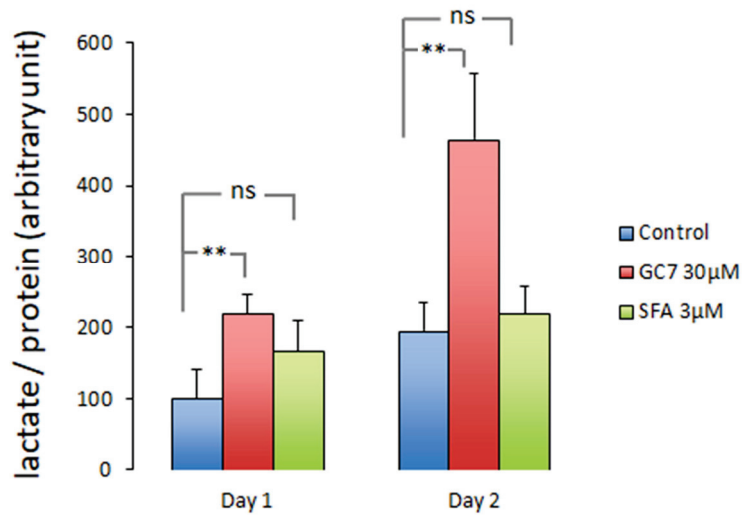


Figure 17 : Production cellulaire de lactate sur 2 jours dans des conditions de normoxie. Représentation quantitative de production de lactate rapportée aux protéines sur 2 jours par des cellules PCT traitées dans un groupe par du GC7 (30 µM) et dans un autre groupe par du SFA (3 µM) par rapport au groupe contrôle (** $p < 0.01$).

Effet du SFA et GC7 sur la consommation d'oxygène des cellules rénales en normoxie.

Nos résultats montrent que le GC7 inhibe la phosphorylation oxydative mitochondriale avec une différence significative de la consommation d'oxygène mitochondriale par rapport au groupe contrôle (Figure 18). Par contre le SFA n'a aucun effet que ce soit en état de consommation basale ou maximale sur la consommation d'oxygène mitochondriale par rapport au groupe contrôle.

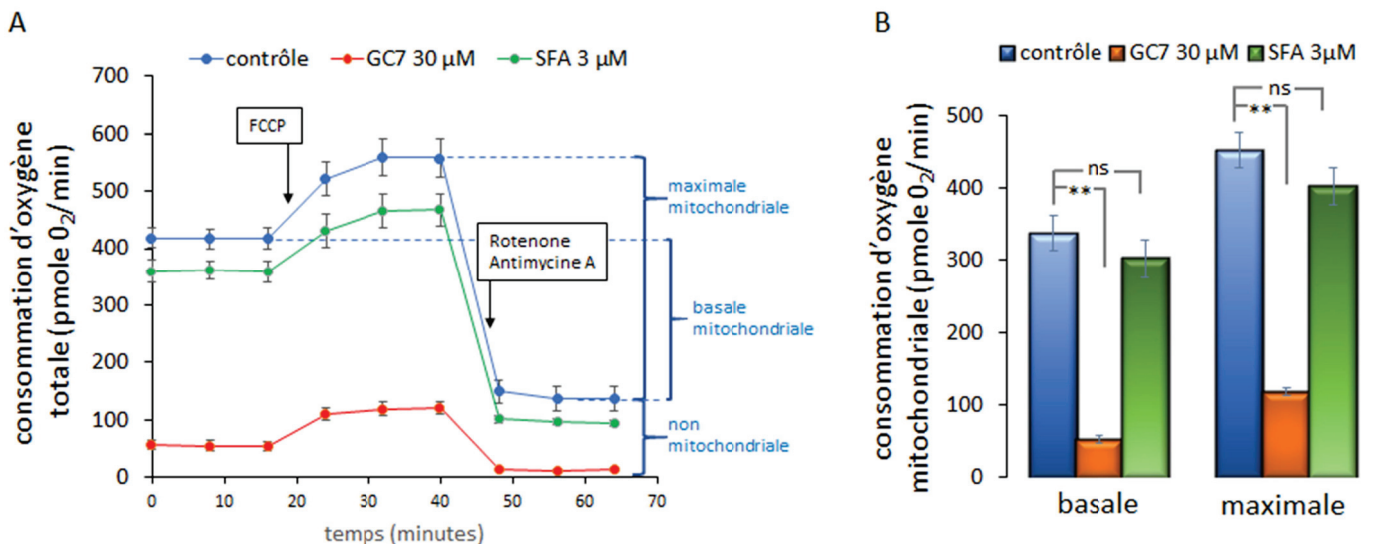


Figure 18: Analyse de la consommation d'oxygène des cellules PCT après un traitement de 24h de GC7 30 µM ou 4h de SFA 3µM. A) La consommation d'oxygène totale des cellules est mesurée au cours du temps sur un bioanalyseur Seahorse. Du FCCP (1 µM) et un mélange Rotenone/Antimycyne A (2 + 2 µM) sont injectés aux temps indiqués pour déterminer la respiration maximale et basale mitochondriale comme indiquées pour la courbe contrôle (). La consommation résiduelle à la fin de l'expérience correspond à la consommation d'oxygène non mitochondriale. B) consommation d'oxygène mitochondriale basale et maximale des cellules.

IV/DISCUSSION

L'objectif principal de ce travail était de valider l'action pharmacologique d'un nouvel inhibiteur de la seryl-tRNA synthase, protéine identifiée par l'équipe comme une cible pharmacologique de la résistance à l'hypoxie/ischémie.

Les travaux des Dr Vigne et Frelin ont été les premiers à démontrer l'implication de la voie de l'hypusination d'eIF5A dans la résistance à des conditions hypoxiques chez la drosophile (Vigne and Frelin, 2008). Nos travaux ont permis de montrer que l'on pouvait transposer ces résultats chez le mammifère et que l'inhibition de l'hypusination d'eIF5A induisait une protection cellulaire et tissulaire lors d'ischémies rénales ou cérébrales. Cette protection est indépendante de la voie HIF-1 (Ke and Costa, 2006) et offre une nouvelle cible pharmacologique dans la tolérance à l'ischémie. L'utilisation pré-clinique de ce concept a d'ailleurs été validée dans la transplantation rénale.

L'inhibition de eIF5A conduit nécessairement à l'altération traductionnelle d'un panel de protéines impliquées dans diverses fonctions physiologiques. Aussi afin d'être plus spécifique d'un point de vue pharmacologique et ainsi éviter de potentiels effets secondaires dus à l'inhibition de ce facteur de traduction, nous avons décidé d'identifier une cible primaire qui sous le contrôle de eIF5A était responsable de la tolérance ischémique.

L'approche globale par protéomique utilisée par l'équipe à partir des données obtenues avec le GC7 nous a ainsi permis d'identifier la seryl-tRNA syntase comme cible thérapeutique potentielle contre les effets délétères d'un épisode ischémique. Dans le but de créer un composé pharmaceutique nous avons fait synthétiser un inhibiteur compétitif spécifique de cette protéine en se basant sur d'anciennes données de la littérature sur la cristallographie de la seryl-tRNA synthase.

Nous avons démontré dans un premier temps que l'inhibiteur synthétisé (SFA) avait une action biologique en étant capable de bloquer le processus traductionnel avec une forte affinité de l'ordre du micromolaire. La seryl-tRNA synthase identifiée par protéomique est une enzyme importante dans la machinerie de synthèse protéique et nous avons décidé d'utiliser une méthode "rapporteur" de cette machinerie basée sur la synthèse de la luciférase ayant des propriétés de luminescence.

Cette méthode est une méthode indirecte de l'action du SFA et ne démontre qu'une action globale sur la synthèse protéique mais ne donne pas d'indication sur la spécificité du SFA sur la protéine cible. Nous sommes en cours de mise au point d'une expérimentation par radio marquage de la serine permettant de manière directe de confirmer l'action du SFA sur la seryl-tRNA synthase en établissant les paramètres cinétiques de l'enzyme cible en présence de SFA par la mesure directe de son activité enzymatique. En effet l'aminocetylation est en 2 étapes distinctes. Dans la première étape l'acide aminé sérine est activé par l'ATP, formant un complexe intermédiaire seryl-acyl-adénylate lié à l'enzyme (serRS-AA-AMP). Cette étape ne semble pas inhibée par le SFA. Au cours de la seconde étape, l'aminocyl activé est transféré à la partie terminale 3' de l'ARN de transfert (Figure 8). Cette deuxième étape est inhibée par le SFA qui empêche la liaison avec l'ARNt.

Dans la seconde partie nous avons pu démontrer *in vitro* sur des cellules rénales PCT et des neurones corticaux de souris que le SFA (à une concentration jusqu'à 10 μ M pour les PCT et 5 μ M pour les neurones corticaux), ne présentait aucune toxicité après 24h de traitement en condition normoxique. Il serait intéressant de tester des concentrations plus importantes pour présager de la fenêtre thérapeutique possible sans toxicité.

Nous avons pu aussi démontrer de manière significative que le SFA avait la même action que le GC7 sur la tolérance cellulaire à l'ischémie. En effet la survie est augmentée significativement en condition anoxique dans les groupes de concentration de SFA 1, 3, 10 μ M avec un maximum d'effet à 3 μ M par rapport au groupe contrôle. On observe les mêmes effets dans un milieu de culture HBBS pauvre en glucose ce qui est particulièrement intéressant puisqu'en cas d'ischémie vasculaire il y a une privation cellulaire en glucose associée au manque d'oxygène. Devant ce résultat encourageant *in vitro* obtenu sur les PCT, nous avons testé le SFA à une concentration de 5 μ M sur des cultures primaires de cellules neuronales de souris. Dans ce modèle également la survie est augmentée significativement par rapport au groupe contrôle en OGD avec une réduction de la perte cellulaire de 15% à T+3 et de 25% à T+24. Il est nécessaire d'appliquer un protocole tMCAO *in vivo* pour confirmer nos résultats comme nous l'avons fait précédemment pour le GC7. Il sera ensuite possible d'élargir les expérimentations *in vivo* sur des modèles d'ischémies cardiaques ou de transplantations rénales.

Nous avons pu aussi démontrer qu'en condition normoxique le SFA n'entraîne pas de baisse de la prolifération cellulaire a contrario du GC7 qui est connue dans la littérature pour avoir un rôle antiprolifératif (le GC7 a même été testé comme principe actif en tumorigénèse (Bandino et al., 2014). En effet aussi bien eIF5A que son hypusination sont nécessaires à la cellule eucaryote afin de pouvoir passer l'étape G1-S du cycle cellulaire (Hanauske-Abel et al., 1994; Park et al., 1994; Zanelli and Valentini, 2005). eIF5A est en amont de la synthèse de nombreuses protéines ou cibles dont celles impliquées dans la résistance à l'ischémie mais également dans d'autres cibles ayant un rôle dans la prolifération. L'utilisation du SFA cible beaucoup plus précisément l'effet protecteur car il touche une voie bien en aval de eIF5A et élimine certains effets secondaires du GC7. Toutefois il est nécessaire de réaliser sur un nombre de jours plus important l'étude de la prolifération cellulaire afin de confirmer l'action non antiproliférative du SFA.

En étudiant le mécanisme de tolérance ischémique induit par l'inhibition d'eIF5A par le GC7 (Melis et al., 2017) nous avons pu identifier un profond remodelage du métabolisme cellulaire vers la glycolyse anaérobie. La production énergétique de la cellule essentiellement due à la phosphorylation oxydative en condition normale, devient glycolytique. Cela se traduit par l'augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate. On retrouve dans nos résultats ce phénomène d'augmentation de production dans le groupe GC7 mais pas dans le groupe SFA 3 μ M. Comme dans l'effet sur la prolifération nous montrons que le SFA ne provoque pas les mêmes effets que le C7 et n'induit pas de « shift » métabolique. Comme la phosphorylation oxydative est un processus mitochondrial nous avons regardé la respiration mitochondriale. Nous retrouvons bien que le GC7 réduit significativement la consommation d'oxygène mitochondriale. Cependant il n'y a pas de différence significative de consommation d'oxygène mitochondriale dans le groupe SFA (3 μ M) par rapport au groupe contrôle que ce soit en condition maximale (par ajout de FCCP) ou basale. Cela confirme là encore la spécificité du SFA par rapport au GC7 qui n'aurait pas d'action mitochondriale sur le processus de protection à l'ischémie.

Comme nous l'avons vu, les effets protecteurs sont observés après pré-traitement. Si cet aspect ne pose pas de problème dans le cas de la transplantation d'organe ou de la chirurgie impliquant un clampage aortique qui sont des actes chirurgicaux programmés, il en va tout autrement en cas d'AVC ou d'infarctus.

En effet le prétraitement est exclu en raison de la soudaineté de ces syndromes, il est donc nécessaire de déterminer si les effets protecteurs du SFA sont maintenus en état post traumatique.

Nos premiers résultats semblent montrer que c'est effectivement le cas et qu'un traitement jusqu'à 2 heures post AVC avec la SHX améliore la récupération motrice et cognitive dans le modèle tMCAO chez la souris.

Dans l'avenir il nous faudra étudier la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en présence de SFA. En effet nous avons montré que l'anoxie génère un stress oxydatif d'origine mitochondrial qui était aboli en présence de GC7 (Melis et al., 2017). Ce stress oxydatif est une cause majeure de la mort cellulaire par libération d'EROS. L'effet de l'inhibiteur sera donc testé quant à sa capacité de réduire le stress oxydatif par dosage des espèces réactives de l'oxygène (EROS). Ce dosage est basé sur l'apparition de fluorescence grâce à la réaction entre une sonde fluorescente le H₂-DCFDA et les EROS intracellulaires.

Ce travail va se poursuivre par la réalisation de nouveaux inhibiteurs dérivés du SFA en incluant à la fois des modifications du résidu sérine et de la nucléobase adénine afin d'augmenter l'affinité, la sélectivité et la stabilité du composé final. Le design de ces nouveaux inhibiteurs sera basé sur les données d'ancrage moléculaire obtenues à partir de la structure cristalline de la serRS.

Parallèlement les voies de signalisation et les grands carrefours métaboliques (AMPK, mTORC2, GSK 3, AKT/PKB) seront analysés en présence de ces inhibiteurs afin de disséquer les modifications induites et d'en déduire la cascade d'événements menant à l'effet physiologique observé.

En conclusion ce travail de thèse a permis de valider l'affinité et l'efficacité de l'inhibiteur SFA sur une protéine cible qui est responsable de la tolérance à l'ischémie. Cette tolérance et ce mécanisme de protection cellulaire à l'anoxie pourraient à l'avenir améliorer la prise en charge de nombreux patients atteints de pathologies ischémiques (AVC, infarctus, transplantations, chirurgie aortique etc...).

V /BIBLIOGRAPHIE

- Ahel, D., Slade, D., Mocibob, M., Söll, D., and Weygand-Durasevic, I. (2005). Selective inhibition of divergent seryl-tRNA synthetases by serine analogues. *FEBS Lett.* 579, 4344–4348.
- Anderson, L.L., Mao, X., Scott, B.A., and Crowder, C.M. (2009). Survival from Hypoxia by Inactivation of Aminoacyl-tRNA-Synthetases. *Science* 323, 630–633.
- Bandino, A., Geerts, D., Koster, J., and Bachmann, A.S. (2014). Deoxyhypusine synthase (DHPS) inhibitor GC7 induces p21/Rb-mediated inhibition of tumor cell growth and DHPS expression correlates with poor prognosis in neuroblastoma patients. *Cell Oncol.* 37, 387–398.
- Belrhali, H., Yaremchuk, A., Tukalo, M., Larsen, K., Berthet-Colominas, C., Leberman, R., Beijer, B., Sproat, B., Als-Nielsen, J., Grubel, G., et al. (1994). Crystal structures at 2.5 angstrom resolution of seryl-tRNA synthetase complexed with two analogs of seryl adenylate. *Science* 263, 1432–1436.
- Burda, J., Hrehorovská, M., Bonilla, L.G., Danielisová, V., Cízková, D., Burda, R., Némethová, M., Fando, J.L., and Salinas, M. (2003). Role of protein synthesis in the ischemic tolerance acquisition induced by transient forebrain ischemia in the rat. *Neurochem. Res.* 28, 1213–1219.
- Caraglia, M., Marra, M., Giuberti, G., D'Alessandro, A.M., Budillon, A., del Prete, S., Lentini, A., Beninati, S., and Abbruzzese, A. (2001). The role of eukaryotic initiation factor 5A in the control of cell proliferation and apoptosis. *Amino Acids* 20, 91–104.
- DeGracia, D.J., Kumar, R., Owen, C.R., Krause, G.S., and White, B.C. (2002). Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 127–141.
- Doerfel, L.K., Wohlgemuth, I., Kothe, C., Peske, F., Urlaub, H., and Rodnina, M.V. (2013). EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* 339, 85–88.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., et al. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biology* 11, 1305–1314.
- Eltzschig, H.K., and Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med* 17.
- Gutierrez, E., Shin, B.-S., Woolstenhulme, C.J., Kim, J.-R., Saini, P., Buskirk, A.R., and Dever, T.E. (2013). eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Mol. Cell* 51, 35–45.
- Hanauske-Abel, H.M., Park, M.H., Hanauske, A.R., Popowicz, A.M., Lalande, M., and Folk, J.E. (1994). Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1221, 115–124.
- Hansell, P., Welch, W.J., Blantz, R.C., and Palm, F. (2013). Determinants of kidney oxygen consumption and their relationship to tissue oxygen tension in diabetes and hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 40, 123–137.
- Hasanuzzaman, M., Alhathloul, H.A.S., Parvin, K., Bhuyan, M.H.M.B., Tanveer, M., Mohsin, S.M., Nahar, K., Soliman, M.H., Mahmud, J.A., and Fujita, M. (2019). Polyamine Action under Metal/Metalloid Stress: Regulation of Biosynthesis, Metabolism, and Molecular Interactions. *Int J Mol Sci* 20.

- Jakus, J., Wolff, E.C., Park, M.H., and Folk, J.E. (1993). Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines. *J. Biol. Chem.* *268*, 13151–13159.
- Kaiser, A. (2012). Translational control of eIF5A in various diseases. *Amino Acids* *42*, 679–684.
- Ke, Q., and Costa, M. (2006). Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* *70*, 1469–1480.
- Kemper, W.M., Merrick, W.C., Redfield, B., Liu, C.K., and Weissbach, H. (1976). Purification and properties of rabbit reticulocyte elongation factor 1. *Arch. Biochem. Biophys.* *174*, 603–612.
- Lee, J.-W., Bae, S.-H., Jeong, J.-W., Kim, S.-H., and Kim, K.-W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Experimental & Molecular Medicine* *36*, 1.
- Melis, N., Rubera, I., Cougnon, M., Giraud, S., Mograbi, B., Belaid, A., Pisani, D.F., Huber, S.M., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., et al. (2016). Targeting eIF5A Hypusination Prevents Anoxic Cell Death through Mitochondrial Silencing and Improves Kidney Transplant Outcome. *J. Am. Soc. Nephrol.*
- Melis, N., Rubera, I., Cougnon, M., Giraud, S., Mograbi, B., Belaid, A., Pisani, D.F., Huber, S.M., Lacas-Gervais, S., Fragaki, K., et al. (2017). Targeting eIF5A Hypusination Prevents Anoxic Cell Death through Mitochondrial Silencing and Improves Kidney Transplant Outcome. *J. Am. Soc. Nephrol.* *28*, 811–822.
- Nakanishi, S., and Cleveland, J.L. (2016). Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. *Amino Acids* *48*, 2353–2362.
- Park, M.H. (2006). The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A). *J Biochem* *139*, 161–169.
- Park, M.H., Cooper, H.L., and Folk, J.E. (1981). Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *78*, 2869–2873.
- Park, M.H., Wolff, E.C., Lee, Y.B., and Folk, J.E. (1994). Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines. *J. Biol. Chem.* *269*, 27827–27832.
- Park, M.H., Joe, Y.A., and Kang, K.R. (1998). Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *273*, 1677–1683.
- Pegg, A.E. (2016). Functions of Polyamines in Mammals. *J. Biol. Chem.* *291*, 14904–14912.
- Rajendran, V., Kalita, P., Shukla, H., Kumar, A., and Tripathi, T. (2018). Aminoacyl-tRNA synthetases: Structure, function, and drug discovery. *Int. J. Biol. Macromol.* *111*, 400–414.
- Richardson, C.J., and First, E.A. (2015). Expanding a tyrosyl-tRNA synthetase assay to other aminoacyl-tRNA synthetases. *Data Brief* *4*, 253–256.
- Rossi, D., Kuroshu, R., Zanelli, C.F., and Valentini, S.R. (2014). eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* *5*, 209–222.

- Ude, S., Lassak, J., Starosta, A.L., Kraxenberger, T., Wilson, D.N., and Jung, K. (2013). Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* 339, 82–85.
- Ueda, H., Shoku, Y., Hayashi, N., Mitsunaga, J., In, Y., Doi, M., Inoue, M., and Ishida, T. (1991). X-ray crystallographic conformational study of 5'-O-[N-(1-alanyl)-sulfamoyl]adenosine, a substrate analogue for alanyl-tRNA synthetase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1080, 126–134.
- Vigne, P., and Frelin, C. (2008). The role of polyamines in protein-dependent hypoxic tolerance of *Drosophila*. *BMC Physiol.* 8, 22.
- Vigne, P., Tauc, M., and Frelin, C. (2009). Strong Dietary Restrictions Protect *Drosophila* against Anoxia/Reoxygenation Injuries. *PLoS One* 4.
- Wolff, E.C., Kang, K.R., Kim, Y.S., and Park, M.H. (2007). Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. *Amino Acids* 33, 341–350.
- Xu, A., Jao, D.L.-E., and Chen, K.Y. (2004). Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochem J* 384, 585–590.
- Yao, P., and Fox, P.L. (2013). Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease. *EMBO Mol Med* 5, 332–343.
- Young, A.R., Ali, C., Duretête, A., and Vivien, D. (2007). Neuroprotection and stroke: time for a compromise. *Journal of Neurochemistry* 103, 1302–1309.
- Zanelli, C.F., and Valentini, S.R. (2005). Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics* 171, 1571–1581.
- Zanelli, C.F., and Valentini, S.R. (2007). Is there a role for eIF5A in translation? *Amino Acids* 33, 351–358.

VI/SERMENT HIPPOCRATE



“Au moment d’être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d’être fidèle aux lois de l’honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J’interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l’humanité.

J’informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n’exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l’indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l’intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l’intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l’indépendance nécessaire à l’accomplissement de ma mission. Je n’entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J’apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu’à leurs familles dans l’adversité.

Que les hommes et mes confrères m’accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j’y manque.”

RESUME

La prévention des conséquences d'une privation des tissus en oxygène, due à un stress ischémique, est une des préoccupations majeures en santé humaine non seulement d'un point de vue clinique mais également d'un point de vue économique pour la collectivité. L'équipe a récemment publié (Melis N. et al. JASN 2016) que l'inhibition pharmacologique (GC7) in vitro et in vivo du facteur d'initiation de la traduction eIF5A conduit à l'augmentation de la tolérance ischémique à un stade pré-clinique. Plus récemment, à l'aide de techniques de protéomique et de siRNA, nous avons identifié la seryl-tRNA synthase (serRS) sous le contrôle traductionnel de eIF5A et dont l'inhibition est responsable de la tolérance ischémique. Nous avons fait synthétiser un inhibiteur de cette enzyme: le sulfamoyl-seryl-adenylate (SFA) (en cours de brevet). Les objectifs de mon travail ont consisté dans un premier temps à tester la haute affinité du SFA en déterminant les constantes cinétiques de la protéine cible en présence du SFA par le biais d'une méthode "rapportrice" basée sur la synthèse d'une protéine ayant des propriétés de luminescence : la luciférase. Puis dans un second temps, de valider l'efficacité en évaluant la capacité de cet inhibiteur à augmenter la tolérance anoxique. Pour ce faire nous avons appliqué le SFA à différentes concentrations à des cellules rénales (PCT) ainsi que des neurones corticaux en culture de souris puis nous les avons exposées à des conditions anoxiques pendant 24H pour les PCT et 3H pour les neurones corticaux. Nos résultats montrent que le SFA présente une forte affinité pour la seryl-tRNA synthase (serRS) en étant capable de bloquer le processus traductionnel. Nous avons pu aussi démontrer de manière significative que le SFA avait la même action que le GC7 sur la tolérance cellulaire à l'ischémie puisque la survie est augmentée significativement en condition anoxique avec un maximum d'effet à 3 μ M pour les PCT et 5 μ M pour les neurones corticaux. Le SFA ne semble pas modifier la prolifération cellulaire ni induire de shift métabolique en condition de normoxie. De plus le SFA n'entraîne pas de modification de la consommation d'oxygène par la mitochondrie. En conclusion les résultats présentés ici pourront permettre dans l'avenir de mettre à disposition des cliniciens un tout nouveau protocole pharmacologique capable d'augmenter la résistance des tissus et organes à l'ischémie et donc de préserver leur intégrité fonctionnelle. Les pathologies ou protocoles cliniques visés sont les maladies de l'appareil circulatoire ischémique (AVC et infarctus principalement), la greffe d'organes et la chirurgie cardio-vasculaire.