



**HAL**  
open science

# Exploitation du métabolisme mitochondrial oxydatif dans l'éradication du mélanome métastatique

Paola Corazao-Rozas

► **To cite this version:**

Paola Corazao-Rozas. Exploitation du métabolisme mitochondrial oxydatif dans l'éradication du mélanome métastatique. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S036 . tel-01141751

**HAL Id: tel-01141751**

**<https://theses.hal.science/tel-01141751>**

Submitted on 13 Apr 2015

**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 LILLE 2 DROIT ET SANTÉ  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ**

**Thèse**

**Pour l'obtention du diplôme de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LILLE 2  
SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE CELLULAIRE ET ONCOGÉNÈSE**

**Soutenue**

**Le 9 Octobre 2014**

**par PAOLA CORAZAO-ROZAS**

**EXPLOITATION DU METABOLISME MITOCHONDRIAL OXYDATIF  
DANS L'ERADICATION DU MÉLANOME MÉTASTATIQUE**

**Thèse dirigée par :**

**M. le Docteur Jérôme KLUZA**

**M. le Professeur Pierre FORMSTECHE**

**JURY**

**Rapporteurs : M. le Docteur Nicolas DUMAZ**

**M. le Docteur Rodrigue ROSSIGNOL**

**Examineurs : M. le Docteur Stéphane ROCCHI**

**M. le Docteur Ariel SAVINA**

**M. le Professeur Philippe MARCHETTI**

**M. le Professeur Laurent MORTIER**

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse, Messieurs Rodrigue ROSSIGNOL et Nicolas DUMAZ qui ont accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Messieurs Ariel SAVINA, Stéphane ROCCHI, Laurent MORTIER et Philippe MARCHETTI d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie le Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille et La Région Nord Pas de Calais pour l'allocation recherche qui m'a été accordée et sans laquelle je n'aurais pas pu réaliser ces travaux.

Je remercie également l'Association pour l'étude des anomalies congénitales Neurodev et en particulier le Pr. B. Poupard pour le financement des études *in vivo* réalisées dans ces travaux.

Je remercie le Pr. Pierre Formstecher pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour avoir suivi attentivement la progression de mon projet de thèse au cours de ces trois années.

Je remercie le Pr. Philippe Marchetti pour m'avoir reçue dans son groupe et pour avoir partagé avec moi toutes ses connaissances. Je le remercie également de m'avoir soutenue tout au long de ces trois années au laboratoire, d'avoir été attentif et disponible et de la confiance qu'il a su m'accorder.

Je tiens également à remercier tout particulièrement le Dr. Jérôme Kluza, pour les compétences et la formation qu'il a su m'apporter durant ces trois années. Un grand merci également pour sa disponibilité 24h/24, sa patience au quotidien et pour avoir partagé avec moi ses connaissances et son expérience. Je lui suis tout particulièrement reconnaissante pour toutes les corrections minutieuses de ce manuscrit et pour ses encouragements en toutes circonstances. Merci pour sa motivation qui aujourd'hui me pousse à aller plus loin.

Je remercie, le Pr. Laurent Mortier pour son implication dans le déroulement de ma thèse. Je le remercie également pour ses conseils d'un point de vue clinique.

Je remercie tous les membres de mon équipe, ceux qui sont encore présents mais aussi ceux qui sont partis. Je remercie spécialement Fanny pour tous les moments conviviaux passés au laboratoire, pour son aide, son soutien et sa bonne humeur. Je la remercie également d'avoir partagé avec moi les bons et les moins bons moments. Enfin, merci pour cette belle amitié.

Un très grand merci à Delphine, pour sa bonne humeur exceptionnelle, pour les fous rires et pour ses encouragements incessants au sujet de la qualité de mon français. Ses compétences techniques m'ont été d'une grande utilité pour mener à bien mon projet de thèse.

Merci à Aurélie qui, lors de mon arrivée au sein de l'équipe, s'est chargée de mon intégration et a partagé avec moi ses connaissances. Merci pour sa bonne humeur, pour ses délicieux gâteaux et pour ses initiations à la pâtisserie.

Merci à Salim, pour sa bonne humeur, pour sa vision très « zen » de la vie, pour les bons fous rires et les blagues au quotidien.

Merci à Camille pour sa bonne humeur exceptionnelle, ses conseils et sa manière très particulière de nous faire relativiser. Merci d'avoir été toujours là pour me soutenir et pour les excellents moments que nous avons partagés. Ma deuxième année de thèse n'aurait pas été la même sans sa présence.

Merci à Pierre-Eliot, pour son enthousiasme et pour son sourire matinal.

Merci à Manel qui aura toujours été disponible et qui a su partager avec moi son expérience. Enfin, merci pour ses bons conseils, tant sur le plan professionnel que personnel.

Merci à l'ensemble de l'équipe 5, Brigitte, Matthieu, Audrey, François, pour leur bonne humeur, leurs bonnes blagues et pour nous avoir toujours dépannés avec un sourire.

Merci à l'ensemble de l'équipe du 4<sup>ème</sup> étage, pour les bons moments partagés et pour votre disponibilité.

J'ai été très heureuse de faire partie de cette équipe qui m'a permis de grandir professionnellement et personnellement. Un grand merci.

Merci à mes parents qui ont toujours cru en moi et qui ne cessent de me soutenir dans la réalisation de mes rêves. Tout simplement, merci pour votre amour.

Je remercie également ma belle-famille, Marie-Christine, Guy, Sandrine et Laure qui ont partagé avec moi tous ces moments. Merci pour leurs encouragements qui m'ont toujours poussée à aller plus loin. Mon expérience en France n'aurait jamais été aussi belle sans eux.

Merci à mon époux, Maxime, pour son aide et son soutien dans toutes les circonstances, pour sa patience et ses encouragements. Merci aussi pour le temps qu'il m'a accordé et pour sa disponibilité lors de mes répétitions de présentation. Enfin merci d'avoir été là les bons et les mauvais jours.

# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>12</b>
<b>PARTIE 1 : LE MÉTABOLISME DES CELLULES TUMORALES .....</b>	<b>13</b>
1 Un métabolisme adapté à la biosynthèse de macromolécules et à la production d'énergie. ....	15
1.1 La glycolyse et voies alternatives du métabolisme du glucose .....	15
1.2 Les réactions anaplerotiques mitochondriales .....	16
1.3 Le rôle de l'autophagie dans le métabolisme tumoral .....	19
2 Le rôle des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs dans la régulation du métabolisme tumoral .....	20
2.1 La Voie PI3K/AKT .....	20
2.2 MYC.....	22
2.3 Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1).....	24
2.4 p53.....	28
3 Les enzymes métaboliques fréquemment modifiées dans le cancer. ....	29
3.1 Pyruvate Kinase M2 .....	29
3.2 Hexokinase 2 .....	31
3.3 Phospho-Fructo-Kinase 1 .....	32
3.4 Phosphoglycerate déshydrogénase.....	33
3.5 La Pyruvate Deshydrogenase Kinase.....	33
3.6 Les enzymes impliquées dans la formation des oncométabolites .....	34
3.6.1 Les enzymes IDH et le 2-hydroxyglutarate : .....	34
3.6.2 La succinate déshydrogénase.....	36
3.6.3 La fumarate hydratase.....	37
4 La diversité du métabolisme dans le cancer .....	38
4.1 En fonction des altérations génétiques.....	38
4.2 En fonction de l'environnement .....	39

5	Le rôle du métabolisme dans la régulation du stress oxydant.....	41
5.1	Les sources de stress oxydant et les mécanismes de détoxification: .....	41
	◆ Dans les cellules saines .....	41
	◆ Dans les cellules tumorales.....	42
5.2	Conséquence biologique de la production de ROS .....	44
	◆ Effet des ROS sur la signalisation cellulaire.....	45
	◆ Effet des ROS sur la carcinogénèse.....	45
	◆ Effet des ROS sur la mort cellulaire.....	46
5.3	Les modifications métaboliques participent à la régulation du stress oxydant .....	46
	◆ L'importance du NADPH .....	46
	◆ La répression de la phosphorylation oxydative comme mécanisme de régulation du stress oxydant .....	50
6	Le métabolisme comme cible thérapeutique.....	50
6.1	Les molécules ciblant le métabolisme du glucose.....	50
6.2	Les molécules ciblant le métabolisme mitochondrial .....	52
6.3	L'effet métabolique des traitements anticancéreux.....	55
<b>PARTIE 2 : LE MÉTABOLISME SPÉCIFIQUE DU MELANOME.....</b>		<b>56</b>
1	La glycolyse et les voies alternatives dans le mélanome.....	56
2	Le métabolisme mitochondrial dans le mélanome .....	58
3	Les facteurs qui régulent le métabolisme dans le mélanome.....	60
3.1	La protéine JARID1B .....	60
3.2	Le facteur HIF-1 alpha dans le mélanome .....	61
3.3	Le facteur MITF dans le mélanome .....	62
3.4	L'oncogène BRAF dans le mélanome .....	64
	3.4.1 Effet métabolique de BRAF au cours de la tumorigénese .....	65
	3.4.2 BRAF et son rôle dans la glycolyse.....	67
	3.4.3 BRAF et son rôle dans le métabolisme mitochondrial.....	67
	3.4.4 Les effets métaboliques des inhibiteurs de BRAFV600E.....	68
4	La régulation métabolique de l'état redox dans le mélanome .....	69
4.1	Les sources de ROS dans le mélanome .....	69



4.1.1	L'importance des mélanosomes dans le stress oxydant.....	69
4.1.2	Autres sources de ROS dans le mélanome .....	71
4.2	La régulation de la production de ROS dans le mélanome.....	72
◆	Les facteurs FOXM1 et NRF2 .....	72
◆	Le métabolisme dans la régulation de ROS dans le mélanome .....	73
5	Le stress oxydant comme cible thérapeutique dans le mélanome.....	75
5.1	L'approche thérapeutique pro-oxydant:.....	75
5.2	Exemples des molécules pro-oxydants.....	76
	<b>PROBLEMATIQUE .....</b>	<b>77</b>
	<b>RÉSULTATS ARTICLE 1.....</b>	<b>79</b>
	<b>RESUMÉ ARTICLE 1 .....</b>	<b>80</b>
	<b>RÉSULTATS ARTICLE 2.....</b>	<b>82</b>
	<b>RESUMÉ ARTICLE 2 .....</b>	<b>83</b>
	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>84</b>
	<b>DISCUSSION PARTIE 1 .....</b>	<b>85</b>
	<b>DISCUSSION PARTIE 2 .....</b>	<b>95</b>
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>102</b>
	<b>CONCLUSIONS GÉNÉRALES .....</b>	<b>103</b>
	<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>104</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>106</b>
	<b>ANNEXE 1 Les mécanismes de résistance au vemurafenib.....</b>	<b>107</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>110</b>
	<b>Figure récapitulative .....</b>	<b>125</b>

# ABRÉVIATIONS

---

**2FDG:** 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose

**2HG:** 2-hydroxyglutarate

**2PG :** 2-phospho glycérate

**3PG :** 3-phospho glycérate

**5-FU:** 5-Fluoro-Uracile

**ACL:** ATP-Citrate Liase

**ACO2:** Aconitase 2

**ADN:** Acide Désoxyribonucléique

**AEBP1:** Adipocyte Enhancer Binding protein 1

**ALD:** Aldolase

**ANT:** Adenine Nucleotide Translocator

**AOA:** Amino-Oxyacetic Acid

**APE1:** Apurinic/aprimidinic Endonuclease 1

**ARE:** Antioxydant Response Element

**ARRDC4:** Arrestin Domain-containing 4

**AT:** Animotransferase

**BP6 :** Biphospho glycérate

**CAF:** Cancer Associated Fibroblast

**CBP:** CREB-binding protein

**CDK:** Cyclin-dependent Kinase

**COX :** Cycloxygenases (COX),

**COX-4 :** Cytochrome c -Oxydase isoforme 4

**CREB :** C-AMP Response Element-Binding Protein

**CRM :** Chaîne Respiratoire Mitochondriale

**CTH:** Cystathionase

**DCA:** Dichloroacetate

**EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor

**EM :** Enzyme malique

**ENO:** Enolase

**ERBB4:** V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4

**ERK:** Extracellular Signal-regulated Kinases

**F-1,6-BP :** Fructose 1,6 biphosphate

**F-6-P :** Fructose-6-phosphate

**FAD:** Flavine Adénine Dinucléotide

**FAS:** Fatty Acid Synthase

**FH:** Fumarate Hydratase

**FOXM1:** Forkhead box-Protein M1

**G-3-P :** Glyceraldehyde 3-phosphate

**G-6-P :** Glucose-6-phosphate

**G6PD:** Glucose-6-phosphate Déshydrogénase

**GAPDH :** Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase

**GCL :** Glutamate-Cystéine Ligase

**GDH :** Glutamate Déshydrogénase

**GLS :** Glutaminase

**GLUT :** Glucose Transporter

**GPNA :** L- $\gamma$ -glutamyl- $p$ -nitroanilide

**GPx :** Glutathion-peroxydase

**GR :** Glutathion Réductase

**GSH :** Glutathion Réduit

**GSS :** Glutathion synthase

**GSSG:** Glutathion Oxydé

**GST-P1:** Glutathione S-transferase P1

**HIF-1:** Hypoxia Inducible Factor 1

**HK:** Hexokinase

**HRE :** hypoxia Response Element

**IDH :** Isocitrate Déshydrogénase

**IF1:** Mitochondrial Inhibitor Protein

**IGFR:** Insulin Growth Factor-1 Receptor

**ISCU:** Iron-sulfur Cluster Assembly enzyme

**KEAP1:** Kelch-like ECH-associated protein 1

**LAM :** Leucémies Myéloïdes Aigues

**LDH :** Lactate Déshydrogénase

**LOX:** lipoxygenases

**MAGE11:** Melanoma Antigen Protein 11

**MAPK:** Mitogen-activated protein kinase

**MC1R:** MelanoCortin 1 Receptor

**ME1:** Enzyme malique

**MITF:** Microphthalmia-associated transcription factor

**MnSOD :** Manganese Superoxide dismutase

**MSH- $\alpha$ :** Melanocyte-Stimulating hormone

**MTC:** Lactate Transporter

**mTORC1:** mammalian target of rapamycin complex 1

**NADH:** Nicotinamide Adénine Dinucléotide

**NDUFA4:** NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4

**NF- $\kappa$ B:** Nuclear Factor-kappa B

**NNT:** NAD(P) Transhydrogenase, Mitochondriale

**NOX :** NADPH oxydase

**NRF2:** Nuclear Factor (erythroid derived 2)-like 2

**OIS:** Oncogene Induced Senescence

**P5CS:** Pyrroline-5-carboxylate synthase

**PDC :** Pyruvate Déshydrogénase complexe

**PDH :** Pyruvate Déshydrogénase

**PDK :** Pyruvate Déshydrogénase Kinase

**PDP :** Pyruvate déshydrogénase phosphatase

**PDTX:** Patient Derived Tumor Xenograph

**PEP:** Phosphoenolpyruvate

**PEP:** Phosphoénolpyruvate

**PFK:** Phosphofructokinase

**PFKFB:** 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase

**PGAM1:** Phospho-glyceromutase

**PGC1  $\alpha$ :** Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha

**PGFR $\beta$ :** Platelet Growth Factor Receptor

**PGK1:** Phosphoglycerate Kinase 1

**PHD:** Prolylhydroxylases

**PHGDH:** Phosphoglycerate déshydrogénase

**PI3K:** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

**PK:** pyruvate kinase

**PKM2:** Pyruvate Kinase isoforme M2

**PPAR $\gamma$ :** Peroxisome proliferator-Activated Receptor

**PPP:** Voies des Pentoses Phosphates

**PRC:** PGC-1-related coactivator

**PTEN:** Phosphatase and TENSin homolog

**PTP :** Pore de transition

**PYCR1 :** Pyrroline-5-Carboxylate Reductase 1

**PYR :** Pyruvate

**ROS :** Espèces Réactives de l'Oxygène

**SA- $\beta$ -gal :** Senescence-associated beta-galactosidase

**SDH:** Succinate Déshydrogénase

**SLC5A1:** Solute Carrier 5A1

**SOX10:** SRY (sex determining region Y)-box 10

**STAT3:** Signal Transducer and Activator of transcription 3

**TALDO1 :** Transaldolase 1

**TEP:** Tomographie par émission de positons

**TIGAR:** TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator)

**TPP :** Triphenylphosphonium

**TXNIP:** Thioredoxin-Interacting Protein

**TYR :** Tyrosinase

**UPR :** Unfolden-Protein Response

**VDAC :** Voltage Dependent Anion Chanel

**VEGF :** Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

**VHL :** Von Hippel-Lindau tumor suppressor

**XCT :** Cystéine/glutamate transporter

**Zn/Cu SOD :** Zinc/Cuivre Superoxyde Dismutase

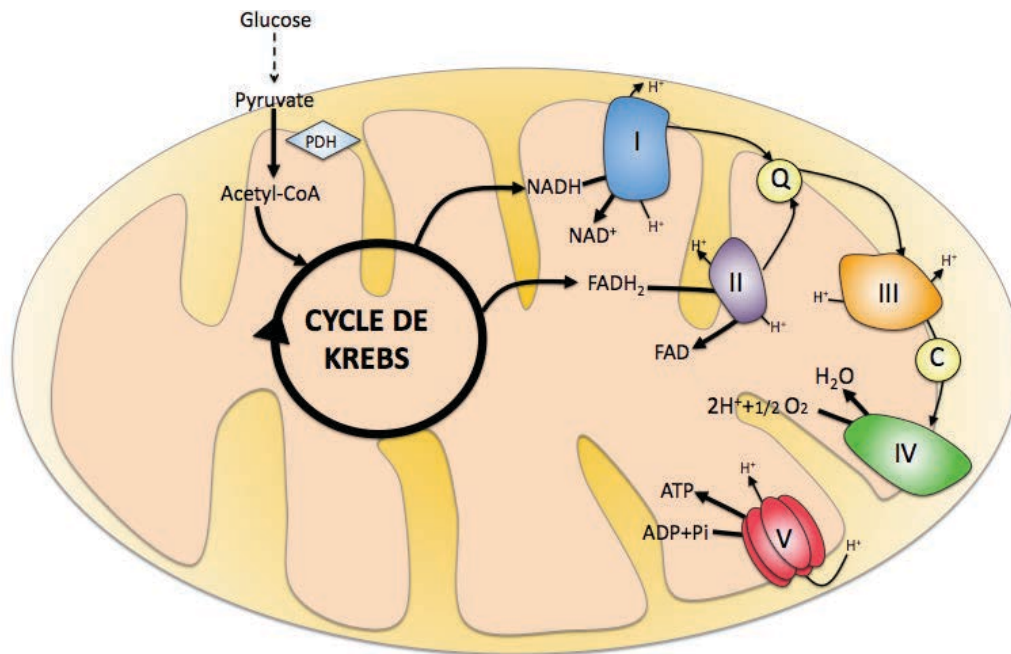
# INTRODUCTION

---

# **PARTIE 1 : LE METABOLISME DES CELLULES TUMORALES**

Pendant les dix dernières années, le développement des techniques de séquençage à haut débit a permis de mettre en évidence la forte hétérogénéité génétique existant entre des tumeurs histologiquement semblables ou encore au sein d'une même tumeur (Endesfelder D. et al., 2012). Cependant, les cellules cancéreuses partagent beaucoup de caractéristiques en commun qui leur confèrent le phénotype tumoral. Hanahan et Weinberg ont proposé onze caractéristiques communes aux cellules cancéreuses, qui regroupent tous les processus que ces cellules mettent en place lors de l'initiation et de la progression tumorale. Ainsi, les cellules cancéreuses présentent une résistance à la mort, une prolifération anarchique, une évasion aux suppresseurs de tumeurs, une capacité à métastaser, une capacité à induire l'angiogénèse, une capacité à échapper à la réponse immunitaire, une instabilité génétique et des modifications métaboliques (Hanahan D. et al., 2011). Au cours de ces dernières années, des nombreux travaux ont soulevé l'importance des modifications métaboliques dans les cellules cancéreuses.

La plupart des cellules différenciées transforment le glucose en pyruvate via la glycolyse, ensuite celui-ci, rentre dans la mitochondrie où il est transformé en Acetyl-CoA par l'enzyme Pyruvate Deshydrogénase (PDH) (Figure 1). Ce dernier, permet d'alimenter le cycle de Krebs et d'obtenir les substrats le NADH et le FADH<sub>2</sub>. Ces deux cofacteurs sont des donneurs d'électrons qui permettent de mettre en place une série des réactions d'oxydation au niveau des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). Ceci est accompagné d'un mouvement des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire favorisant la formation d'un gradient électrochimique qui sera utilisé par la Fo-F1 ATP synthase dans le but de produire de l'ATP, raison pour laquelle ce processus reçoit le nom de phosphorylation oxydative.



**Figure 1 : La phosphorylation oxydative.** En conditions physiologiques les cellules transforment le glucose via la glycolyse en pyruvate. Celui-ci est transformé par la Pyruvate déshydrogénase (PDH) en Acetyl-CoA capable d’entrer dans le cycle de Krebs et permet l’obtention des cofacteurs fortement énergétiques le NADH et le FADH<sub>2</sub> utilisés par le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) et complexe II (Succinate-ubiquinone oxydoréductase) de la chaîne respiratoire mitochondriale, respectivement. La réoxydation de ces deux cofacteurs à travers d’un flux d’électrons au niveau du complexe III (ubiquinol-cytochrome C oxydoréductase) et du complexe IV (cytochrome C oxydase), est accompagnée de la création d’un gradient de protons. Ce gradient servira ensuite pour la production d’ATP grâce à la FoF1-ATP synthase (Complexe V).

Cependant, les cellules tumorales présentent un profil métabolique différent. En effet, les modifications métaboliques au sein de cellules cancéreuses ont été décrites pour la première fois dans les années trente par Otto Warburg (Warburg O.,1927). Les travaux de Warburg montrent que, contrairement aux cellules « normales », les cellules tumorales issues d’ascites transforment le glucose en lactate à travers la glycolyse et cela même en présence d’oxygène (glycolyse aérobie). Des années plus tard, le changement métabolique décrit par Warburg, en terme de “shift” de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse a été confirmé dans un grand nombre de cancers et a reçu le nom d’effet Warburg. Néanmoins, la glycolyse est 18 fois moins efficace que la phosphorylation oxydative en terme de production d’ATP, les cellules cancéreuses doivent donc augmenter leur captation de glucose. Ainsi, la captation de glucose exacerbée dans les cellules tumorales a permis de développer un outil de diagnostic et de suivi clinique: la TEP (Tomographie par Émission de Positons). Cet



outil se base sur la forte captation du glucose au niveau des tumeurs qui peut être mise en évidence en utilisant le 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose (2-FDG), un analogue radio-marqué du glucose (Groves A.M. et al 2007).

Pour expliquer ce changement métabolique dans les cellules cancéreuses, Warburg a émis l'hypothèse que ces cellules présentaient un dysfonctionnement mitochondrial les obligeant ainsi à se tourner vers la glycolyse dans le but de survivre (Warburg O, 1956). Cependant, cette hypothèse semblerait s'avérer erronée, pour la grande majorité des cancers (Cantor J.R. et al., 2012). En effet, les mutations ou défauts qui touchent les protéines clés du métabolisme mitochondrial, sont des événements très rares et restreints à quelques cancers, comme les leucémies et les glioblastomes. De plus, les évaluations réalisées utilisant des lignées de cancer du cerveau et du cancer du sein dépourvues en ADN mitochondrial (cellules  $\rho 0$ ), montrent que dans ces modèles la mitochondrie joue un rôle important dans le développement tumoral. En effet, dans cette étude la déplétion en mitochondries provoque une diminution de la capacité tumorale de ces cellules (Cavalli L.R., 1997). Ainsi, selon l'auteur Wallace, la plupart des cellules cancéreuses présenteraient des mitochondries fonctionnelles et elles ont un rôle important dans la tumorigénèse (Wallace D., 2012). Dans ce contexte, la raison pour laquelle les cellules cancéreuses changent leur métabolisme est encore mal comprise. Cairns a proposé en 2010 que les modifications métaboliques de cellules cancéreuses auraient comme but principal de subvenir aux besoins prolifératifs via trois aspects primordiaux : une obtention rapide d'ATP, la biosynthèse des macromolécules et la maintenance d'un statut redox compatible avec la survie cellulaire.

## **1 Un métabolisme adapté à la biosynthèse de macromolécules et à la production d'énergie**

### **1.1 La glycolyse et voies alternatives du métabolisme du glucose**

En ce qui concerne la biosynthèse de macromolécules nécessaires à la prolifération, il a été proposé récemment que la glycolyse pourrait conférer un avantage très important. En effet, les cellules cancéreuses auraient un comportement métabolique similaire à celui des cellules prolifératives (Ward P.S. et al., 2012). Nous savons

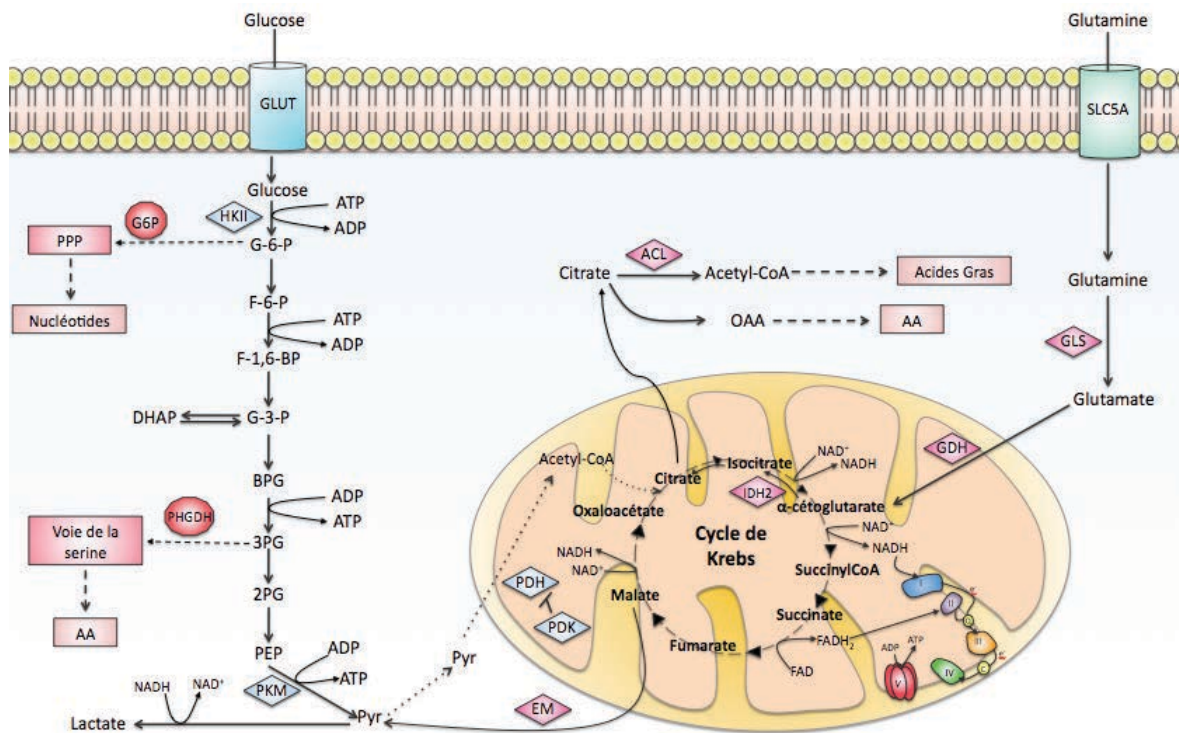
aujourd'hui que les cellules quiescentes ou non prolifératives métabolisent le glucose principalement par la phosphorylation oxydative pour maximiser l'obtention d'ATP afin de conserver leur homéostasie (Vander-Heiden M. et al., 2009). Dans les cellules prolifératives, la présence des facteurs de croissance induit une augmentation de la captation des nutriments et modifie leur métabolisme pour pouvoir subvenir aux besoins de la division cellulaire (Ward P.S. et al., 2012). Ainsi, dans ces cellules, le but n'est plus d'optimiser la production d'ATP mais d'obtenir les éléments nécessaires à la prolifération.

C'est ainsi que dans les cellules prolifératives, comme dans les cellules cancéreuses, on trouve souvent un découplage entre la glycolyse et la phosphorylation oxydative. Ces cellules vont donc métaboliser le glucose via la glycolyse non pas seulement dans le but d'obtenir de l'ATP mais parce que la glycolyse peut, à travers ces différentes étapes, orienter les produits dérivés du glucose vers d'autres voies alternatives. Par exemple, le glucose-6-phosphate ou le glyceraldehyde-3-phosphate peuvent partir vers la voie de Pentose phosphates (PPP) pour finalement donner du ribose-5-phosphate essentiel à la synthèse de nucléotides. Une autre voie vers laquelle peuvent partir les intermédiaires de la glycolyse est la voie de biosynthèse de la serine qui permettra, par exemple, d'obtenir à partir du 3-phosphoglycerate des acides aminés non essentiels (Figure 2). Par ailleurs, la transformation du pyruvate en lactate semble être une étape primordiale pour les cellules cancéreuses. En effet, cette réaction enzymatique favorise la génération du  $\text{NAD}^+$ , un cofacteur nécessaire pour les premières réactions enzymatiques de la glycolyse.

## 1.2 Les réactions anapérotyques mitochondriales

Néanmoins, même si la mitochondrie semble peu participer au métabolisme énergétique, cela ne veut pas dire qu'elle est inactive. En effet, il a été démontré dans une lignée de glioblastome fortement glycolytique, que le cycle de Krebs dans ces cellules est intact et que la mitochondrie joue un rôle clé au niveau des réactions anapérotyques via l'utilisation de la glutamine (DeBerardinis R.J. et al., 2007). Ce substrat doit avoir un rôle très important dans le métabolisme des cellules cancéreuses étant donné que la plupart d'entre elles présentent une augmentation de la captation de celui-ci. Une fois à l'intérieur de la cellule, la glutamine peut subir deux types de réaction selon l'utilisation de ce substrat comme source de nitrogène ou

comme source de carbone. Ainsi, la glutamine peut être désaminée, via l'enzyme GSL, pour donner du glutamate. Celui-ci est ensuite transformé en  $\alpha$ -cétoglutarate, capable de rentrer dans le cycle de Krebs. Cet  $\alpha$ -cétoglutarate peut être utilisé pour la production de citrate, celui-ci, par la suite, va être transporté dans le cytosol où il sera utilisé pour la synthèse des acides gras par l'action de ATP-citrate liase (ACL). De même, l' $\alpha$ -cétoglutarate peut, via sa transformation dans le cycle de Krebs, sortir de celui-ci sous forme de malate, qui sera transformé en pyruvate, puis en lactate, au niveau du cytosol (glutaminolysis). Ce processus favorise ainsi la production d'acides aminés importants pour la prolifération tels que l'aspartate et l'alanine (Figure 2). Il a également été observé que, dans certaines conditions, la glutamine peut servir au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). En effet l' $\alpha$ -cétoglutarate sortirait du cycle de Krebs sous la forme de malate pour donner du pyruvate, qui rentrerait dans la mitochondrie pour être transformé en acetyl-CoA, permettant le fonctionnement de la CRM (DeBerardinis R.J. et al., 2007). Comme pour la glycolyse, la transformation de ces différents intermédiaires du cycle de Krebs, à l'intérieur ou l'extérieur de la mitochondrie, a toujours comme but de subvenir aux besoins prolifératifs.



**Figure 2 : La reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses.** La plupart des cellules cancéreuses présentent une augmentation de la glycolyse avec une captation exacerbée de glucose (via les transporteurs du glucose, GLUTs) rapidement transformé en Glucose 6-phosphate (G6P) par l'Hexokinase II (HKII). L'accumulation des produits intermédiaires de la glycolyse favorise l'orientation de ces intermédiaires vers d'autres voies comme la voie de pentose phosphates (PPP) ou via la voie de la serine, permettant ainsi l'obtention des nucléotides et acides aminés importants pour la prolifération. Le pyruvate provenant de la glycolyse est préférentiellement transformé en lactate. Le métabolisme de la glutamine est également accentué dans les cellules tumorales, ainsi les transporteurs (SLC5A) et les protéines qui participent à la transformation de ce substrat sont surexprimées dans ces cellules. La glutamine est utilisée principalement pour l'obtention du  $\alpha$ -cétoglutarate, qui entre dans le cycle de Krebs et peut être transformé en citrate via l'enzyme IDH2 (isocitrate déshydrogénase 2). Le  $\alpha$ -cétoglutarate peut également être transformé en malate et partir dans le cytosol où il est transformé en pyruvate (pyr) via l'enzyme malique (EM). Toutes ces modifications métaboliques favorisent l'obtention des lipides, protéines et nucléotides nécessaires pour la prolifération des cellules tumorales.

Il est, cependant, important de préciser que l'ensemble des études réalisées sur le métabolisme, en utilisant différents modèles tumoraux, montre que bien que la plupart des cellules tumorales présentent une glycolyse exacerbée, cela ne veut pas dire qu'elles aient le même phénotype métabolique. Les cellules cancéreuses présentent ainsi une flexibilité métabolique très importante, leur permettant de s'adapter aux nutriments disponibles dans le milieu extracellulaire. Ainsi, au cours des différentes étapes de la progression tumorale, le profil métabolique des cellules cancéreuses peut changer. L'utilisation de la glutamine, dans les cellules cancéreuses, peut également varier probablement en fonction des besoins spécifiques. Ainsi, dans le modèle de glioblastome étudié par l'équipe de DeBerardinis, 60% de la glutamine,

captée par la cellule, part vers la production de lactate alors que le glucose est utilisé principalement pour la synthèse de lipides. Cependant, dans d'autres modèles comme dans le mélanome, la glutamine participe principalement à la synthèse des lipides, via sa transformation en citrate, et peu de glutamine est transformée en lactate. Ces résultats, montrent l'hétérogénéité et la versatilité métabolique des cellules tumorales. Ainsi, des études plus approfondies sont donc nécessaires pour mieux comprendre dans quel contexte les cellules tumorales favorisent une voie métabolique plutôt qu'une autre et quels sont les facteurs qui régulent ces choix.

### **1.3 Le rôle de l'autophagie dans le métabolisme tumoral**

Par ailleurs, un autre exemple de l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses est l'obtention des substrats bioénergétiques via l'autophagie. Ce processus permet de dégrader des organites (comme par exemple les mitochondries) à l'intérieur de la cellule dans le but de récupérer des substrats importants pour le fonctionnement de la cellule. Ainsi, ce processus joue en conditions physiologiques, un rôle de recyclage dans la cellule, permettant de se débarrasser des organites endommagés ou des protéines aberrantes. Cependant, dans les cellules tumorales, l'autophagie permettrait l'adaptation de ces cellules aux conditions de stress métabolique leur facilitant l'obtention des substrats nécessaires à la synthèse de macromolécules. En effet, il a été montré que dans le cancer du poumon l'autophagie représente la première source de glutamine. L'inhibition de ce processus se traduit par une forte dépendance à l'apport externe de glutamine conditionnant ainsi la prolifération (Strohecker A. et al., 2013). De plus, la voie PI3K/AKT via la régulation négative de la protéine mTOR découplerait la disponibilité des nutriments du rétrocontrôle métabolique, en activant l'autophagie. Ainsi, dans les cellules HELA, l'activation de la voie AKT favorise la survie de la cellule face aux différents types de stress métabolique, comme par exemple en condition de privation en nutriments. Ceci permettrait d'expliquer la raison pour laquelle la plupart des cellules cancéreuses activent souvent cette voie de signalisation. (Degenhardt K. et al., 2006).

## 2 Le rôle des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs dans la régulation du métabolisme tumoral

Contrairement aux cellules saines, les cellules cancéreuses ne modifient pas leur métabolisme en réponse aux facteurs de croissance. Elles accumulent des modifications génétiques liées à l'activation des proto-oncogènes ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, devenant ainsi indépendantes de ces facteurs. Ces modifications ont été pendant longtemps décrites comme étant capables de modifier la prolifération et la survie cellulaire. Néanmoins, il a été démontré que la plupart de ces modifications jouent également un rôle métabolique qui permet, par la suite, de favoriser la prolifération.

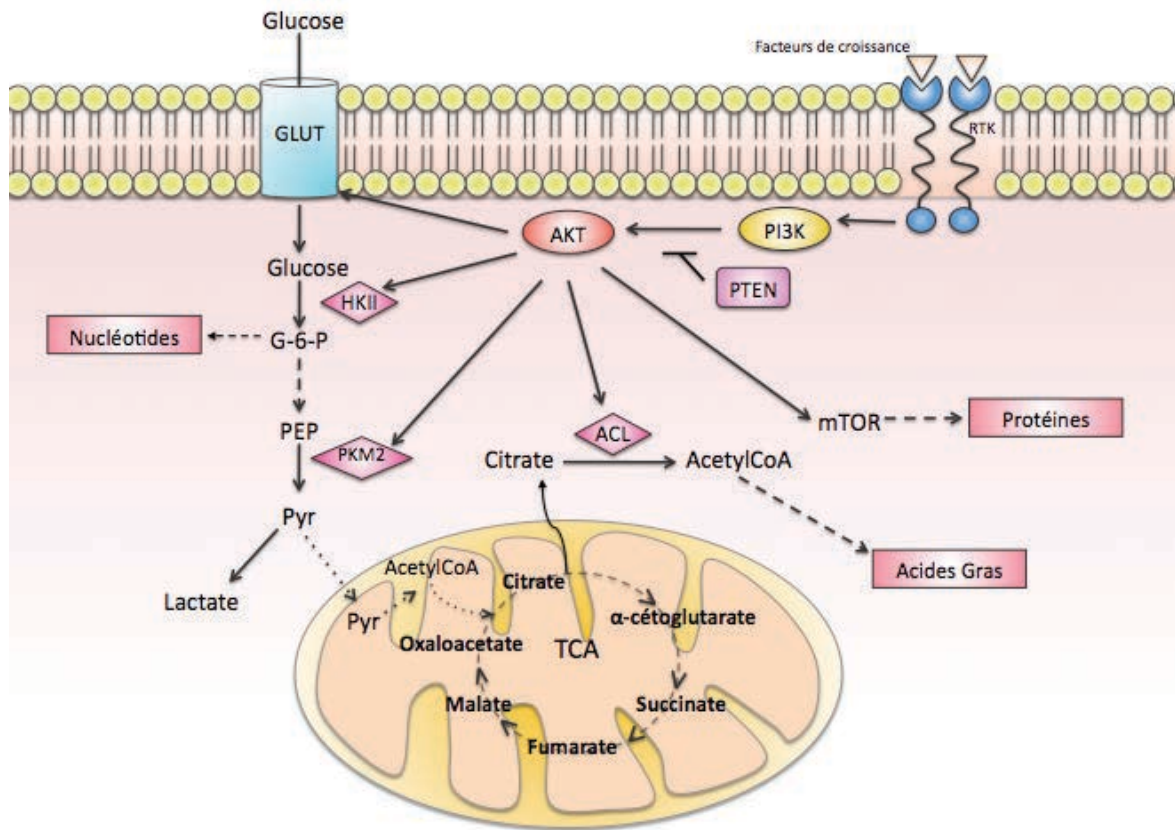
### 2.1 La Voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT est l'une des premières voies dont le rôle dans le métabolisme a été décrit. Les mutations de cette voie sont très fréquentes dans la majorité des cancers. Ces mutations ne touchent pas seulement les membres de la voie, la rendant constitutivement active, mais aussi les protéines régulatrices (Yuan T.L. et al., 2008) tels que PTEN (Phosphate and Tensin Homolog). L'activation de cette voie provoque des modifications majeures du métabolisme à plusieurs niveaux (Figure 3). En ce qui concerne la glycolyse, l'activation de AKT1 induit, d'une part, une augmentation de cette voie métabolique en modifiant le nombre et la localisation des transporteurs de glucose (comme par exemple GLUT1 et GLUT4) (Kohn A.D. et al., 1996) et d'autre part une phosphorylation des protéines clés de cette voie glycolytique, augmentant ainsi leur activité (HKII). Cependant, le rôle de la voie PI3K /AKT ne se limite pas à l'augmentation de la glycolyse. Elle peut également favoriser les voies de biosynthèse dépendantes de l'activité mitochondriale. Il a été récemment montré, dans un modèle des adipocytes primaires, que AKT1 permet de phosphoryler l'enzyme ATP-Citrate Liase (ACL) au niveau de son résidu serine 454, provoquant son activation et favorisant la transformation du citrate en Acetyl-CoA au niveau du cytosol (Berwick D.C. et al., 2002). De cette manière, AKT1 permet de dévier le citrate du cycle de Krebs et de promouvoir la synthèse de *novo* des acides gras.

De plus, plusieurs auteurs considèrent que le rôle le plus important de la voie AKT/PI3K dans le métabolisme tumoral, repose sur l'activation de mTORC1 (mechanistic target of rapamycine complexe 1). La protéine AKT1 active va alors inhiber TSC 1/2 (Tuberos sclerosis) le régulateur négatif de mTORC1. L'activation de ce dernier permet d'augmenter la synthèse de protéines dans le but de favoriser la transamination des différents intermédiaires du cycle de Krebs ainsi que la synthèse des acides aminés (Ward P.S. et al., 2012). Il a été montré également, dans des modèles de souris Knockout pour mTORC1, que ce complexe joue un rôle dans la biogenèse mitochondriale via la régulation de l'expression de la protéine PGC1-alpha. Ces résultats suggèrent que mTORC1 pourrait participer à la régulation du métabolisme oxydative mitochondriale (Bentzinger C.F. et al., 2008). De plus, la voie Akt/mTORC1 a aussi été impliquée dans la stabilisation non hypoxique de HIF-1 $\alpha$  et l'activation de l'oncogène Myc dans différents modèles de cancer.

Il a également été démontré très récemment que l'inhibiteur négatif de cette voie, PTEN, peut jouer un rôle dans la régulation de l'activité mitochondriale. En effet, une forme N-terminal plus courte que la forme initiale, a été décrite comme étant capable de se localiser dans la mitochondrie et d'augmenter l'activité de la cytochrome C oxydase ainsi que la production d'ATP. L'inhibition de cette forme courte de PTEN provoque un dysfonctionnement de l'activité mitochondriale (Liang H. et al., 2014). Ces résultats révèlent l'importance de PTEN dans la régulation du métabolisme mais aussi l'impact de son inhibition sur le fonctionnement mitochondrial.





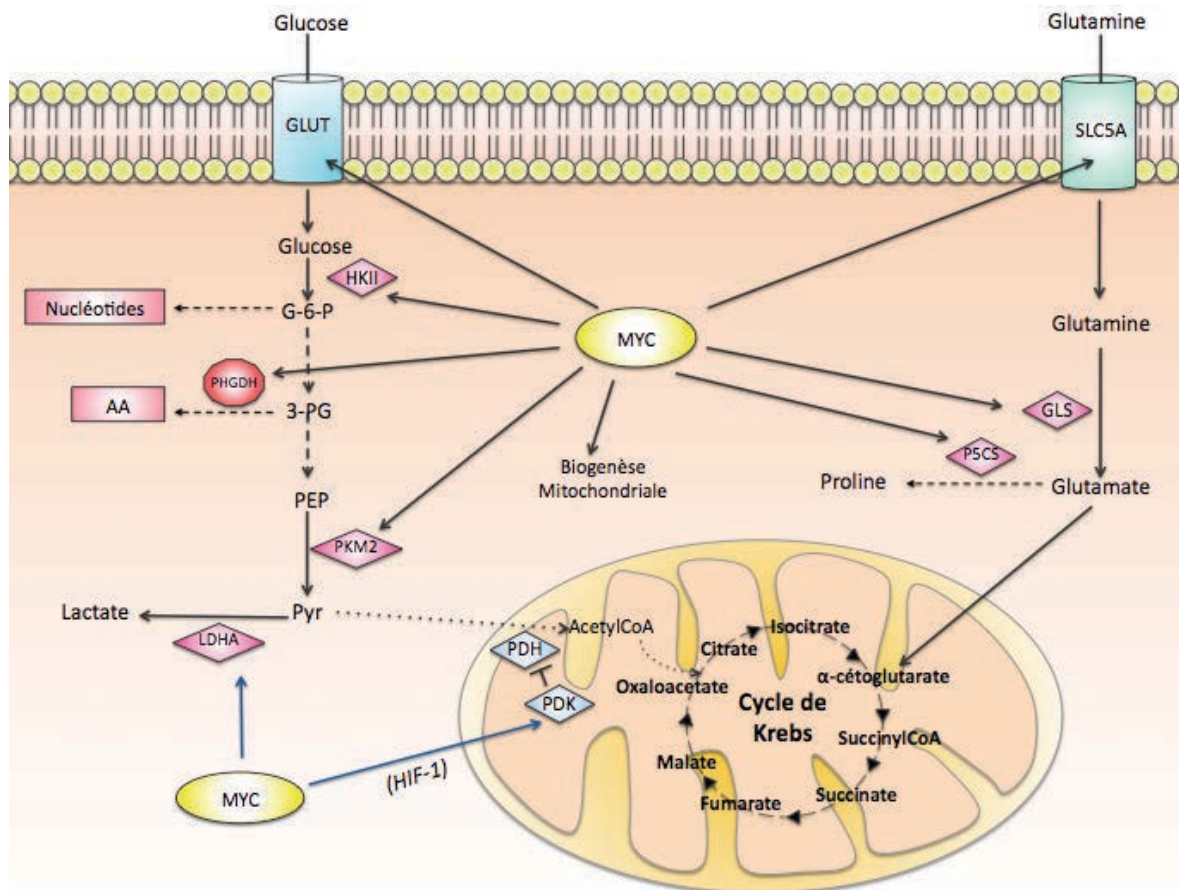
**Figure 3. La voie AKT dans la régulation du métabolisme :** La voie de signalisation PI3K/AKT peut réguler plusieurs aspects du métabolisme dans les cellules cancéreuses. AKT favorise la glycolyse via l'expression des protéines telles que les GLUT1 (transporteur du glucose), l'hexokinase II (HKII), la Pyruvate kinase (PKM2). De même, AKT peut favoriser la transformation du citrate, provenant du cycle de Krebs, en acetylCoA qui servira par la suite à l'obtention des acides gras. Cette protéine va aussi réguler l'activité de mTOR qui joue un rôle important dans la synthèse des protéines.

## 2.2 MYC

Myc est un facteur de transcription qui, dans les cellules saines, est activé en réponse aux différents facteurs de croissance. Ce facteur de transcription est exprimé en permanence mais il se trouve dans la cellule sous la forme de proto-oncogène. La surexpression, l'apparition d'une mutation ou une translocation chromosomale provoquent l'activation constitutive de cette oncogène. Myc joue un rôle très important dans le métabolisme tumoral (Figure 4). Ce facteur peut augmenter l'expression de transporteurs du glucose et d'autres enzymes participant à la glycolyse, comme la Hexokinase II (HKII), la PKM2 et la LDH-A (Shim H. et al., 1997). En outre, il a été montré dans les lymphocytes B surexprimant Myc, que ce facteur peut favoriser la biogénèse mitochondriale via l'activation transcriptionnelle des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales, mais aussi des gènes



impliqués dans la réplication de l'ADN mitochondrial. Ceci peut sembler contradictoire car en favorisant l'expression de la LDH-A et de la PKM2, Myc empêche l'utilisation du pyruvate, provenant de glycolyse, au niveau de la mitochondrie. Cependant, le principal rôle de Myc dans le métabolisme est d'induire des modifications dans l'utilisation de la glutamine qui pourrait donc être liée à l'augmentation de la masse mitochondriale (Li F. et al., 2005). Les études réalisées par l'équipe de Le, ont montré le rôle clé de Myc dans le métabolisme de la glutamine dans les modèles de lymphome et du cancer du pancréas. En effet, Myc va induire, tout d'abord, une augmentation de la captation de la glutamine, que ce soit par des transporteurs spécifiques tels que SLC5A1 et SLC7A1 ou par des protéines importatrices comme ASCT2 et SN2 (Wise D. et al., 2008). Par la suite, Myc peut aussi augmenter l'expression de la glutaminase 1 (GLS1), favorisant ainsi la glutaminolyse (Gao P. et al., 2009). De cette manière, Myc rend les cellules cancéreuses dépendantes à la glutamine. Ainsi, l'inhibition des cibles de cet oncogène, comme par exemple la GLS, peut induire de manière importante l'apoptose dans ces cellules cancéreuses MYC dépendantes.

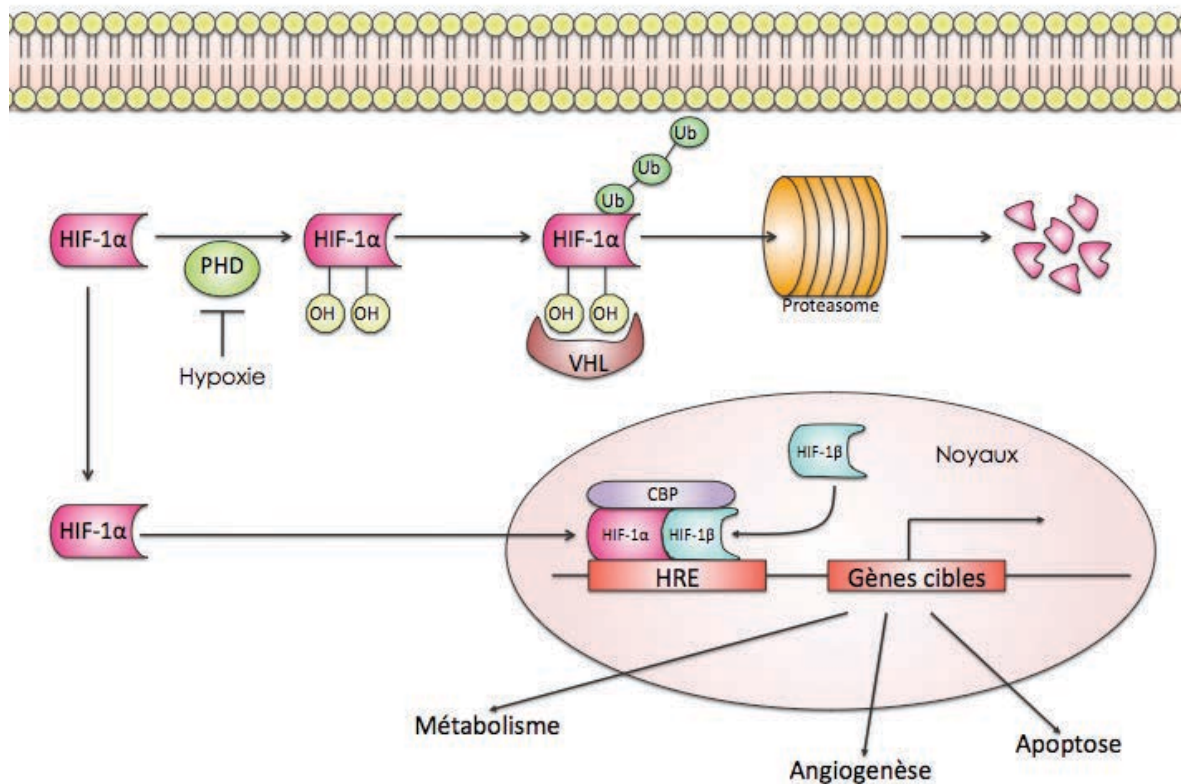


**Figure 4. L'oncogène MYC dans la régulation du métabolisme:** L'oncogène MYC est probablement l'un des oncogènes les plus versatiles. MYC régule la glycolyse en favorisant directement l'expression des enzymes Hexokinase II (HKII) et pyruvate kinase M2 (PKM2). L'oncogène MYC peut également favoriser la stabilisation de HIF-1 avec lequel il coopère pour réguler d'autres protéines de la glycolyse comme la PDK (pyruvate déshydrogénase kinase) ou la LDHA (lactate déshydrogénase A). Myc est surtout connu dans le cancer pour son rôle dans le métabolisme de la glutamine. Il peut réguler des protéines qui favorisent l'entrée de la glutamine dans le cycle de Krebs ainsi que son utilisation dans la voie de la proline via l'enzyme P5CS (Pyrroline-5-carboxylate synthase). En accord avec ces rôles, Myc favorise également la biogénèse mitochondriale.

### 2.3 Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)

Les facteurs de transcription HIF (HIF-1 et HIF-2) sont impliqués dans la réponse des cellules à l'hypoxie. Le facteur HIF-1 est composé de deux sous-unités, une sous-unité constitutivement exprimée HIF-1 $\beta$  et une sous-unité dont l'expression est dépendante de la concentration d'oxygène, HIF-1 $\alpha$ . En condition normoxique, la sous-unité alpha est soumise à dégradation lors de son hydroxylation par les prolyles hydroxylases 1 et 2 (PHD). Cette hydroxylation permet, par la suite, son ubiquitinylation par la protéine VHL (von Hippel-Lindau), la dirigeant vers le proteasome pour sa dégradation. En condition d'hypoxie, la diminution d'oxygène va

entraîner une diminution de l'activité des PHD et permet, ainsi, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  (Figure 5). Cette sous-unité se transloque donc au niveau du noyau pour former un hétérodimère avec la sous-unité  $\beta$ . HIF-1 active pourra donc déclencher la transcription d'un grand nombre de gènes qui présentent la séquence consensus HRE (Hypoxia Response Element).

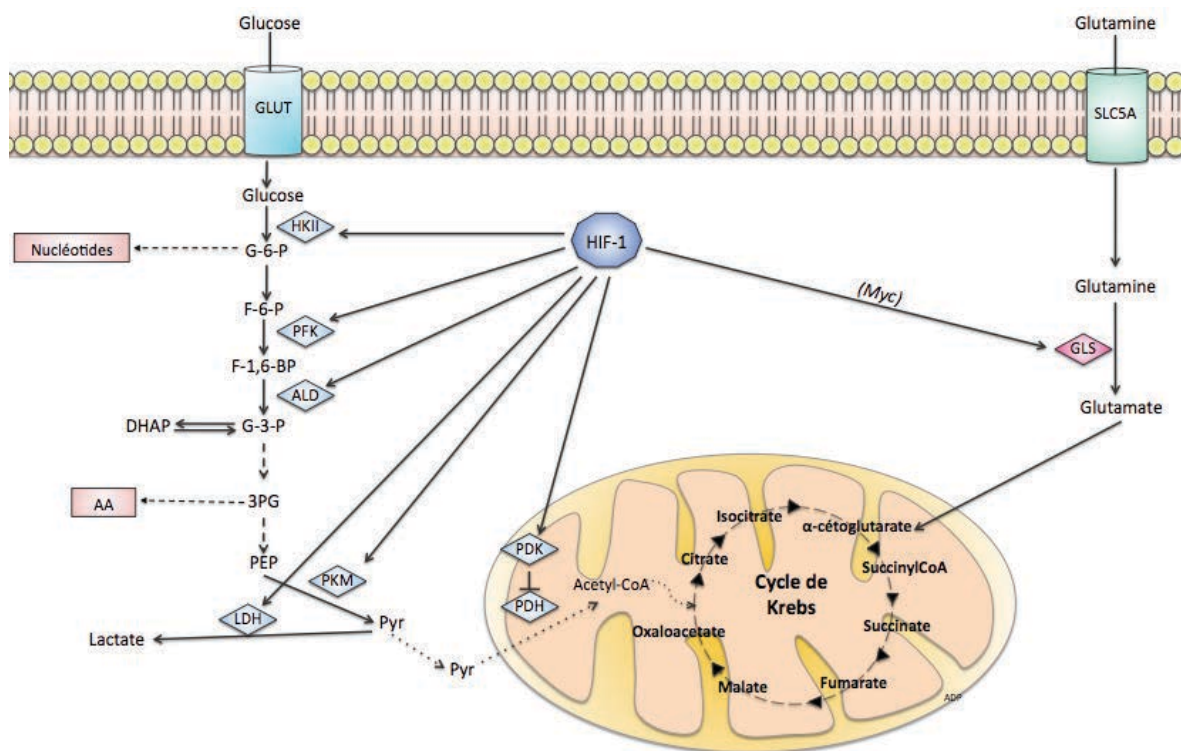


D'après (Véronica A. Carroll, 2005)

**Figure 5. HIF-1 son rôle et régulation en réponse à l'hypoxie :** Le facteur HIF-1 est composé de deux unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ . En normoxie, la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est constitutivement exprimée et soumise à dégradation. Les PHDs (prolyl hydroxylases) hydroxylent cette sous-unité et la marquent pour son ubiquitinylation par la protéine pVHL (von Hippel-Lindau), ce qui la dirige vers le protéasome. Cependant, en condition d'hypoxie, les protéines PHDs sont inhibées ce qui provoque la stabilisation et translocation de ce facteur dans le noyau. C'est ici que les deux sous-unités vont former le facteur HIF-1 actif qui va activer la transcription de ces gènes cibles présentant la séquence HRE (Hypoxia Response Element) en recrutant des coactivateurs comme la protéine CBP (CREB-binding protein). Ce facteur peut, via la régulation transcriptionnelle d'un grand nombre des gènes, réguler plusieurs processus comme le métabolisme, l'angiogénèse ou l'apoptose.

Actuellement nous savons que HIF-1 a plus de 100 gènes cibles, qui peuvent varier selon le contexte cellulaire (Semenza G., 2013). Ce facteur va ainsi contribuer à l'adaptation de la cellule à l'hypoxie en modifiant la prolifération, le métabolisme et l'angiogénèse. En ce qui concerne le métabolisme, HIF-1 va favoriser la glycolyse

(Figure 6) en augmentant l'expression des transporteurs du glucose (GLUT1 et GLUT3) et de dix des treize enzymes participant à ce processus (HKI, HKII, PFK-L, ALD-A, ALD-C, PGK1, ENO- $\alpha$ , PKM2, LDH-A et PFKFB-3). En parallèle, HIF-1 va mettre un frein à l'activité mitochondriale, en empêchant l'utilisation du pyruvate dans la mitochondrie (Figure 9). Pour cela HIF-1 va augmenter l'expression de l'enzyme LDH-A (Lactate Déshydrogénase A) qui transformera le pyruvate en lactate (Semenza G. et al., 1996). De plus, ce facteur va augmenter l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) (Lu C.W. et al., 2008) responsable de l'inhibition de la transformation du pyruvate en Acetyl-CoA nécessaire pour le cycle de Krebs et, par conséquence, au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. C'est ainsi, que HIF-1 réprime l'activité mitochondriale en empêchant l'utilisation du pyruvate provenant du métabolisme du glucose.



**Figure 6 : HIF-1 et son rôle dans la régulation métabolique:** Le facteur HIF-1 est un régulateur majeur du métabolisme. Ce facteur régule 10 enzymes parmi les 13 qui participent dans la glycolyse. Il peut également empêcher l'utilisation mitochondriale du pyruvate via la protéine PDK (pyruvate déshydrogénase kinase) qui inhibe la PDH responsable de la transformation du pyruvate (pyr) en Acetyl-CoA. Comme il a été montré précédemment, HIF-1 coopère avec MYC afin de réguler d'autres paramètres du métabolisme, surtout en ce qui concerne l'utilisation de la glutamine.

Dans le cadre des cellules cancéreuses, le facteur HIF-1 peut être actif au niveau des zones hypoxiques au sein de la tumeur. Il est également possible que HIF-1 soit exprimé de manière aberrante, suite à l'activation de certains oncogènes tels que BRAF, Myc ou, encore, suite à l'activation de la voie PI3K /AKT qui, à travers mTORC1, peut favoriser la stabilisation de ce facteur (Hudson C.C. et al., 2002). Dans certains cancers, nous pouvons aussi trouver une stabilisation de HIF-1, en condition normoxique, indépendante de l'activation des oncogènes. C'est le cas du cancer du rein où HIF-1 $\alpha$  est stabilisé suite à des mutations inactivant la protéine suppresseur des tumeurs VHL, et donc la dégradation de la sous-unité alpha (Maxwell P.H. et al., 1999). De plus, la surexpression de la protéine BCL-2 serait aussi liée à une accumulation de ce facteur dans différents cancers. Il a été également décrit que la production élevée de ROS favorise la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  via l'inactivation des PHDs, par un mécanisme qui n'est pas encore bien établi. De plus, il a été montré que les mutations au niveau des enzymes mitochondriales provoquant l'accumulation des métabolites, comme le succinate ou le fumarate, peuvent également induire une stabilisation de ce facteur dans les carcinomes rénaux (Pollard P.J. et al., 2005).

Par ailleurs, le facteur HIF-2 est également stabilisé dans certains cancers comme les mélanomes, les glioblastomes et les neuroblastomes. L'expression de ce facteur en normoxie est fortement associée à l'agressivité et à un mauvais pronostic. Le facteur HIF-1 et HIF-2 reconnaissent la même séquence de liaison à l'ADN mais ne semblent pas avoir un effet redondant. En effet, HIF-1 semble être le facteur de réponse à l'hypoxie par excellence alors que HIF-2 régulerait un nombre moins important des protéines. Ceci a été observé lors des études réalisées sur les cancers rénaux présentant des mutations de la protéine VHL, car dans ces cancers les deux facteurs sont constitutivement exprimés, mais le facteur HIF-1 a un effet dominant sur HIF-2. Fait intéressant, le facteur HIF-2, pourrait également réguler le métabolisme mais de manière différente à HIF-1 voir opposée. En effet, il a été montré dans des modèles de carcinomes rénaux que contrairement à HIF-1, l'expression constitutive la protéine HIF-2, diminue la glycolyse et favorise plutôt le métabolisme mitochondrial, tout en régulant l'accumulation de ROS. Il serait, donc intéressant d'évaluer le rôle métabolique de HIF-2 dans d'autres modèles tumoraux où HIF-1 est constitutivement actif (Biswas S., 2010).

## 2.4 p53

La protéine p53 est un facteur de transcription très important dans la régulation de l'homéostasie cellulaire. Ce facteur permet à la cellule de répondre aux divers types de stress qui peuvent induire des dommages au niveau des éléments clés tels que l'ADN. En effet, p53 est capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire, par exemple lors de la détection de dommages à l'ADN, via l'activation de la protéine p21. En parallèle, ce facteur active une batterie de protéines dans le but de réparer ces dommages. D'autres protéines peuvent être activées, quand les dommages causés à l'ADN sont liés au stress oxydant. Dans ce cas, p53 peut aussi induire l'expression des protéines impliquées dans la détoxification de ROS (espèces réactives de l'oxygène) (Chen W. et al., 2009). Lorsque les dommages sont trop importants et irréparables, p53 induit la mort de la cellule par apoptose. Dans 50% des cancers on trouve, soit des mutations au niveau du gène qui code pour p53 (*TP53*), soit une délétion complète de ce gène (Muller P. et al., 2013). Par conséquent, son rôle de suppresseur des tumeurs a toujours été lié à son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'induction de l'apoptose.

Cependant, il a été démontré par différentes équipes que p53 pouvait aussi jouer un rôle dans le métabolisme. Tout d'abord, en 2004 l'équipe de Schwartzenberg-Bar montrait que p53 diminue l'expression des transporteurs GLUT1 et GLUT4 de manière tissu dépendante (Schwartzenberg-bar-yoseph F. et al., 2004). De plus, les mutations de p53 au niveau du domaine de liaison à l'ADN, dans les cellules cancéreuses, provoquent l'augmentation de ces deux transporteurs. La protéine p53 peut aussi inhiber la glycolyse via la protéine TIGAR (TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator) (Bensaad K. et al., 2006). TIGAR est capable de déphosphoryler le fructose-2,6-biphosphate et donc de diminuer la quantité de ce métabolite. Le fructose-2,6-biphosphate étant l'activateur principal de l'enzyme PFK1, sa diminution provoque, par conséquence, la diminution de l'activité de cette enzyme. De cette manière TIGAR inhibe partiellement la glycolyse et fait basculer les produits dérivés du glucose vers la voie des pentoses phosphates (PPP).

En outre, p53 peut aussi jouer un rôle dans le métabolisme mitochondrial via la protéine GLS2 (glutaminase 2). En effet, l'équipe de Suzuki a démontré que GLS2 était un gène cible de p53, capable de réguler le métabolisme de la glutamine ainsi que la



production de ROS (Suzuki S. et al., 2010). Le gène *GSL2* code pour une glutaminase mitochondriale capable d'hydrolyser la glutamine en glutamate, pour que celle-ci soit ensuite transformée en  $\alpha$ -cétoglutarate, un intermédiaire du cycle de Krebs. De cette manière, la *GSL2* permet d'augmenter les intermédiaires du cycle de Krebs et d'augmenter l'activité mitochondriale, dans le but de générer de l'ATP. De plus, la production de glutamate participe à la synthèse *de novo* du GSH.

Toutefois, le rôle de p53 dans le métabolisme et la tumorigenèse a connu une révolution en 2012, lorsque l'équipe de Li a pu démontrer que le rôle de p53, comme suppresseur de tumeur, dépend, de manière importante, de son rôle dans la régulation du métabolisme. En effet, cette équipe a comparé différents mutants de p53 dans le but d'évaluer leur capacité à inhiber l'initiation tumorale. Dans cette étude, le mutant p53<sup>3KR/3KR</sup> présente des modifications au niveau de ses trois résidus lysines, empêchant ainsi son acétylation. Ce mutant est donc incapable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ainsi que la sénescence *in vivo*. Cependant, il est capable de réguler le métabolisme via les protéines TIGAR et GLS2, ce qui suffit pour inhiber l'apparition spontanée de tumeurs *in vivo* (Li T. et al., 2012).

### 3 Les enzymes métaboliques fréquemment modifiées dans le cancer

Le métabolisme dans les cellules cancéreuses peut être différent en fonction des anomalies génétiques présentes. Cependant, bien que les modifications métaboliques dans les différents cancers puissent varier, certaines protéines semblent être indispensables pour le développement tumoral et sont donc retrouvées dans la plupart des cancers.

#### 3.1 Pyruvate Kinase M2

La pyruvate kinase est une enzyme qui va catalyser la dernière réaction de la glycolyse, la conversion du phosphoenolpyruvate (PEP) en pyruvate, cela accompagné de la production d'ATP (**Fig. récapitulatif pg.165**). La famille des PKs est composée des quatre membres PKL et PKR codé par le gène *PK-LR* et dont l'expression est restreinte respectivement au foie et aux globules rouges. Les deux autres membres sont PKM1 et PKM2 codés par le gène *PK-M*, et dont la structure

varie seulement de 4% à cause d'un épissage alternatif. En condition physiologique, PKM2 est seulement exprimé dans les tissus embryonnaires et dans les cellules souches adultes. Cependant, cette protéine est exprimée de manière aberrante dans différents types de cancer (Vander Heiden M.G. et al., 2010a). Par exemple dans les glioblastomes, la diminution de l'expression de PKM2 par siRNA provoque une forte diminution de la prolifération, de l'invasion et de la survie cellulaire. Les études concernant les mécanismes par lesquels cette protéine est à nouveau exprimée dans les cellules cancéreuses, ne sont pas nombreuses. Cependant, quelques pistes ont été données par l'équipe de David en 2010, qui a démontré que l'oncogène Myc peut activer préférentiellement l'expression de PKM2 (David C. et al., 2010). Ainsi, Myc va augmenter l'expression des hnRNPs (heterogenous nuclear ribonucleoproteins) qui vont se fixer sur l'exon 9 et le bloquer (dont l'inclusion donne comme produit PKM1), favorisant plutôt l'inclusion de l'exon 10 à sa place (dont le produit est PKM2). Cette préférence pour l'expression de PKM2 à la place de PKM1 semble paradoxale, car l'activité enzymatique de PKM2 est beaucoup plus faible que celle de PKM1, ce qui suggère une production d'ATP moins importante. Cependant, l'expression de PKM2 pourrait favoriser les voies anaboliques en ralentissant la glycolyse, ce qui permettrait l'accumulation des métabolites et leur bifurcation vers d'autres voies, en amont, telles que la voie PPP et la voie de la serine (Macintyre A.N. et al., 2011).

Il a été montré récemment que le rôle de PKM2 ne se limite pas au métabolisme cellulaire. En effet, PKM2 pourrait aussi jouer un rôle au niveau nucléaire où cette protéine favoriserait l'activation de HIF-1 $\alpha$  (Luo W. et al., 2011). En outre, un rôle de kinase a aussi été décrit pour PKM2, qui serait capable de phosphoryler le facteur de transcription STAT3 et augmenter ainsi l'expression de ces gènes cibles importants dans le contexte de la tumorigénèse (Gao X. et al., 2012). De plus, dans certains glioblastomes, PKM2 pourrait aussi induire des modifications épigénétiques en phosphorylant des histones. Ceci permettrait l'activation de la transcription de l'oncogène Myc ainsi que de la cycline D1, favorisant ainsi la prolifération. Cette protéine est la première enzyme métabolique décrite comme étant capable d'induire des modifications épigénétiques. PKM2 joue donc un rôle décisif dans la reprogrammation métabolique de cellules cancéreuses ainsi que dans la prolifération.



## 3.2 Hexokinase 2

L'enzyme Hexokinase catalyse la première réaction irréversible de la glycolyse, transformant le glucose en glucose-6-phosphate, capturant ainsi le glucose à l'intérieur de la cellule, une étape qui requiert de l'ATP (**Fig. récapitulative pg. 165**). Il existe quatre isoformes de cette enzyme qui varient selon leur activité enzymatique et localisation à l'intérieur de la cellule. L'isoforme HKI est exprimée dans tous les tissus et elle est peu régulée par le changement métabolique. L'hexokinase II (HKII) est faiblement exprimée dans la majorité des tissus et son activité enzymatique est fortement régulée par son substrat (glucose). Les deux autres isoformes (HKIII et HKIV) présentent une activité enzymatique très faible et ne sont actives qu'en présence de fortes concentrations de glucose. Curieusement, dans les cellules cancéreuses nous retrouvons souvent une surexpression de HKII (Mathupala S.P. et al., 2009). Cette isoforme confère certains avantages à la cellule cancéreuse, tout d'abord parce qu'elle présente la plus forte affinité pour le glucose et donc une activité enzymatique plus importante. De plus, elle est capable de se fixer au niveau de la membrane externe mitochondriale (Bustamante E. et al., 1981), par intermédiaire de la protéine VDAC (Voltage dépendent anion channel). L'interaction entre la HKII et VDAC augmente l'activité enzymatique de HKII et lui facilite l'accès à l'ATP produit au niveau mitochondrial (Mathupala S.P. et al., 2009). Par ailleurs, l'interaction de HKII avec VDAC, peut empêcher l'apoptose car elle bloque l'ouverture du pore de transition (PTP) et prévient la libération des facteurs pro-apoptotiques (Azoulay-Zohar H. et al., 2004).

La surexpression de HKII dans les cellules cancéreuses peut avoir plusieurs origines. Il a été montré que HKII est un gène cible de HIF-1 $\alpha$  (Mathupala S.P. et al., 2001), et que la stabilisation aberrante de ce facteur peut donc conduire à une augmentation de son expression. En outre, dans d'autres modèles cellulaires tels que les hépatocarcinomes, nous pouvons trouver une surexpression de HKII due à une amplification du gène codant pour cette protéine (Rempel A. et al., 1996). De plus, dans ce même modèle, il a été suggéré que des événements épigénétiques pourraient être impliqués dans la surexpression de HKII, via la déméthylation de l'ADN (Goel A. et al., 2003).

### 3.3 Phospho-Fructo-Kinase 1

La phospho-fructokinase 1 (PFK1) est l'enzyme qui catalyse la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate (**Fig. récapitulative pag. 165**). Cette enzyme catalyse une réaction irréversible qui joue un rôle très important dans la régulation de la glycolyse car elle sert de point de contrôle de cette voie. La PFK peut être régulée par différents substrats comme par exemple l'ATP et le citrate qui peuvent fortement inhiber cette enzyme. Au contraire, le fructose 2,6-biphosphate peut augmenter l'activité de la PFK1 favorisant donc la formation du fructose-1,6-biphosphate et ainsi la voie glycolytique. La quantité de fructose-2,6-biphosphate présente dans la cellule dépend de l'activité d'une enzyme bifonctionnelle particulière capable de le synthétiser et de le dégrader, la PFKFB (PFK-2/F-2,6-BPase). Il existe quatre isoformes de cette enzyme mais c'est l'isoforme 3 (PFKFB3) qui est souvent surexprimée dans les cancers (Atsumi T. et al., 2002). La PFKFB3 est l'isoforme qui présente le ratio kinase/phosphatase le plus élevé et permet ainsi d'augmenter le flux glycolytique. L'expression de la PFKFB3 a été associée à la stabilisation du facteur HIF-1 car elle est fortement exprimée en hypoxie (Atsumi T. et al., 2002). De même, les cellules cancéreuses présentant des mutations au niveau de VHL ont une forte augmentation de l'expression de PFKFB3, confirmant le rôle de HIF-1 dans la régulation de cette protéine.

Néanmoins, l'activité de PFK1 peut aussi être modulée d'autres manières. Par exemple, il a été montré que les gliomes pouvaient exprimer une isoforme particulière de PFK1 beaucoup moins sensible à l'inhibition par le citrate et plus sensible à l'activation par le fructose-2,6-biphosphate. Cette nouvelle isoforme a aussi été trouvée dans le mélanome, les carcinomes et les lymphomes. Elle serait le résultat d'un clivage de la protéine PFK1 (85KDa) en deux fragments dont un de 45KDa. Ce nouveau fragment serait insensible à l'inhibition par le citrate et l'ATP et donc constitutivement actif (Šmerc A. et al., 2011). De cette manière, cette isoforme augmenterait de manière importante le flux glycolytique nécessaire à la prolifération.

### 3.4 Phosphoglycerate déshydrogénase

La PHGDH est une des dernières enzymes dont le rôle dans le métabolisme tumoral a été décrit. Cette enzyme catalyse la première réaction dans la voie de synthèse de la sérine. La PHGDH transforme le phosphoglycerate, provenant de la glycolyse, en hydroxypyruvate qui sera transformé par d'autres enzymes en sérine (**Fig. récapitulative pg.165**). Certains cancers comme le mélanome (39%) ou le cancer du sein présentent une amplification du gène qui code pour la PHGDH, liée à une surexpression de celle-ci (Mullarky E. et al., 2011). Ces cancers présentent donc une forte dépendance à cette protéine et son inhibition peut induire une diminution importante de la croissance tumorale (Locasale J.W., 2013). La surexpression de cette protéine est liée à une forte augmentation du flux de la voie de synthèse de la sérine. Cette voie permet aux cellules cancéreuses d'obtenir de la biomasse, car elle favorise la production de la sérine, importante pour la formation des protéines, des phospholipides ainsi que des métabolites nécessaires à l'obtention des purines et pyrimidines. Cette voie permettra également d'obtenir deux fois plus de pouvoir oxydant par la production de NADPH (Mullarky E. et al., 2011). L'ensemble de ces modifications confère des avantages prolifératifs aux cellules cancéreuses.

### 3.5 La Pyruvate Déshydrogénase Kinase

La Pyruvate Déshydrogénase kinase (PDK) est une protéine qui participe à la régulation du complexe pyruvate déshydrogénase (PDC), responsable de la transformation du pyruvate en Acetyl-CoA qui alimente, par la suite, le cycle de Krebs et favorise le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Fig. récapitulative pg. 165**). La régulation de la PDC est très précise et coordonnée par des cycles de phosphorylation /déphosphorylation sur trois résidus sérine, au niveau de la sous-unité E1alpha (Roche T. et al., 2007). La phosphorylation catalysée par les PDKs inactive le complexe alors que la déphosphorylation, menée par PDPs (Pyruvate déshydrogénase phosphatase), l'active. Cette régulation de la PDC est donc très importante car elle détermine la quantité de pyruvate qui sera utilisé par la mitochondrie. La PDK existe sous quatre isoformes PDK1-PDK4 dont la distribution varie selon les tissus, la PDK2 étant la plus répandue. Ces kinases se trouvent

dérégulées dans plusieurs maladies, telles que le diabète (Wu P. et al., 1999) ou les pathologies cardiaques, mais c'est surtout leur rôle dans les cancers qui a attiré l'attention ces dernières années. En effet, on trouve une surexpression de la PDK dans plusieurs cancers. Les isoformes impliquées sont surtout la PDK1 dont la surexpression a été montrée dans les cancers rénaux (Papandreou I. et al., 2006) et la PDK3, dans le cancer du côlon (Lu C.W. et al., 2011). La surexpression de ces kinases dans les différents cancers a surtout été associée à la stabilisation du facteur HIF-1 (Kim J. et al., 2006), car leur expression augmente en conditions hypoxiques. De plus, ces deux isoformes présentent des sites HRE (Hypoxia Response Element) dans leurs promoteurs pouvant être reconnues par le facteur HIF-1 (Lu C.W. et al., 2008). La surexpression de ces deux kinases participe ainsi au changement métabolique, caractéristique de la plupart des cellules cancéreuses, en empêchant la transformation du pyruvate en Acetyl Co-A et réprimant ainsi la phosphorylation oxydative. La régulation du flux de pyruvate, menée par les PDKs, serait très importante, car dans les cancers comme les glioblastomes la simple inhibition de la PDK2 se traduit par une diminution significative de la prolifération et une reprogrammation métabolique associée à la diminution de la stabilisation du facteur HIF-1 (Bonnet S, 2007)

### **3.6 Les enzymes impliquées dans la formation des oncométabolites**

Dans les cellules tumorales certaines mutations peuvent toucher des enzymes participant dans différentes voies métaboliques. Dans ce contexte, l'activité de ces enzymes est compromise, ce qui conduit à la production aberrante des métabolites ayant un rôle clé dans la tumorigénèse (oncométabolites). L'accumulation de ces métabolites peut par la suite induire des modifications du comportement de la cellule, favorisant la prolifération.

#### **3.6.1 Les enzymes IDH et le 2-hydroxyglutarate**

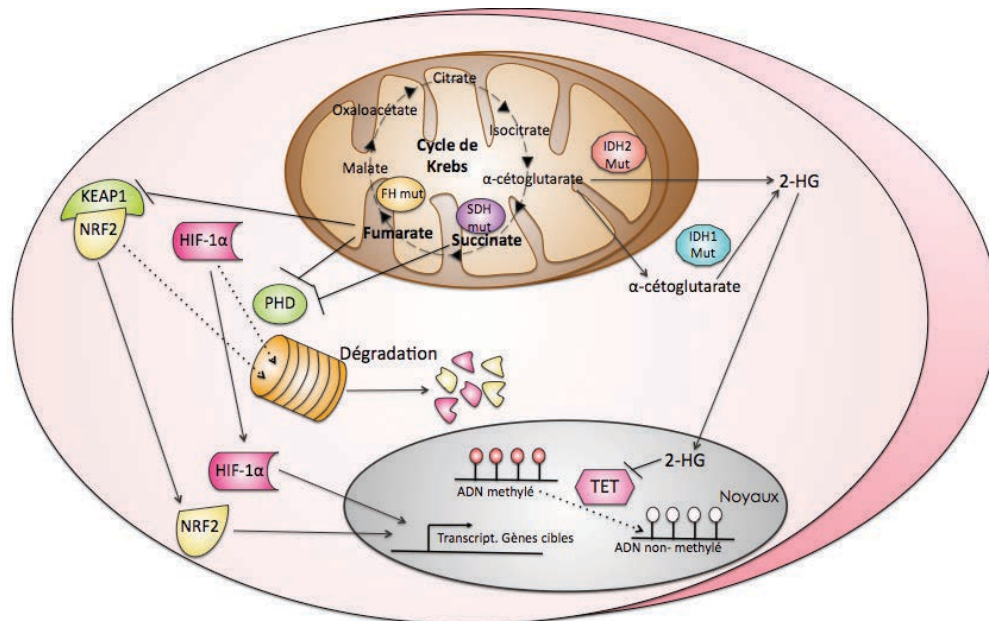
L'isocitrate déshydrogénase (IDH) est une enzyme qui catalyse la conversion de l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate et NADPH. Il existe trois isoformes de cette enzyme: une cytosolique IDH1 et deux mitochondriales IDH2 et IDH3. L'activité et la structure des isoformes 1 et 2 sont très proches mais différentes de celle de IDH3. En 2008,

l'équipe de Parsons a mis en évidence, par analyse génomique, que plus de 12% des glioblastomes présentent une mutation au niveau de l'enzyme IDH1 (Parsons D.W. et al., 2008). Cette mutation touche le résidu arginine 132 au niveau du site actif de la protéine. Ces études ont été complétées par une autre équipe qui a montré que l'isoforme IDH2 était fréquemment mutée dans les leucémies myéloïdes aiguës (LAM) (Abbas S. et al., 2010). Les études préliminaires suggéraient que la mutation, au niveau du site actif, provoquait une perte de l'activité enzymatique. Néanmoins, il a été montré que les mutations au niveau du site actif leur confèrent une activité enzymatique tout autre, leur permettant de transformer le  $\alpha$ -cétoglutarate en 2-hydroxyglutarate (2HG) (Ward P.S. et al., 2010). En condition physiologique, il y a seulement des traces de 2HG dans les cellules. Cependant, les cellules cancéreuses qui présentent une mutation des IDH produisent des quantités importantes de ce métabolite (Dang L. et al., 2010).

L'effet de 2HG dans les cellules cancéreuses a été décrit plus tard, en 2010, quand l'équipe de Figueroa a démontré que l'accumulation de 2HG peut induire des modifications épigénétiques au niveau de l'ADN (Figure 7). En effet, 2HG peut inhiber certaines enzymes, comme la TET2 ADN-hydroxylase ou les histones déméthylases, qui sont des dioxygénases dépendantes du  $\alpha$ -cétoglutarate (Figueroa M.E. et al., 2010). Ces résultats ont été confirmés par la suite dans les glioblastomes, où la simple introduction d'un mutant IDH provoque une modification du méthylome (Turcan S. et al., 2012). Il a été suggéré que les modifications épigénétiques induites par l'accumulation du 2HG pourraient avoir un rôle dans la différenciation (Lu C. et al., 2012). D'autres études ont montré que le 2HG empêche la dégradation de HIF-1 $\alpha$ , par inhibition de la PHD2 ou d'une autre prolyl hydroxylase: la EGLN (Xu W. et al., 2011). Toutefois, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  a été observée seulement dans certains types de cancers et des données contradictoires sont apparues dans d'autres modèles, suggérant ainsi que ce n'est pas le mécanisme d'action principale du 2HG. Le rôle du 2HG dans les cellules cancéreuses reste donc encore à déterminer.

### 3.6.2 La succinate déshydrogénase

Bien que les mutations des enzymes mitochondriales restent rares dans le cancer, nous trouvons quelques cancers qui présentent un dysfonctionnement mitochondrial dû à l'inactivation de certaines enzymes clés. C'est le cas de la succinate déshydrogénase (SDH), l'enzyme qui participe au cycle de Krebs ainsi qu'au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les mutations de cette enzyme sont présentes surtout dans le paragangliome (Baysal B.E., 2000), mais aussi dans d'autres cancers, comme les cancers gastro-intestinaux ou ceux de la thyroïde. Ces mutations provoquent surtout une perte d'activité de l'enzyme et donc l'accumulation de son substrat, le succinate. L'accumulation de ce métabolite a, tout d'abord, été liée à la tumorigenèse par une hypothèse suggérant que la perte de fonction de la SDH induisait un dysfonctionnement mitochondrial et donc une production aberrante de ROS. Cependant, la mutation de la SDH joue un rôle dans le cancer, principalement par l'accumulation du succinate qui, une fois dans le cytosol, inhibe la PHD2 (Figure 7) et favorise la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  (Selak M. et al., 2005). Cela provoquerait alors un état de pseudo hypoxie et induirait donc des modifications métaboliques dans la cellule. En outre, un autre rôle a été récemment attribué au succinate dans les paragangliomes, suggérant que de manière similaire au 2HG, son accumulation pourrait induire des modifications épigénétiques, via l'inhibition des histones-2-OG-dépendentes et des ADN déméthylases. De plus, cette modification du méthylome, induite par le succinate, serait associée à une diminution de la différenciation et une augmentation de la migration (Letouzé E. et al., 2013). Cela reste, cependant, à confirmer dans d'autres modèles afin d'établir s'il s'agit d'un mécanisme général ou contexte dépendant.



**Figure 7: Les oncométabolites et leur participation dans la régulation du métabolisme :** Les mutations au niveau des enzymes fumarate (FH) et succinate déshydrogénase (SDH) provoquent l'accumulation du fumarate et succinate respectivement. L'accumulation de ces deux substrats, conduit à l'inhibition des protéines comme les PHDs ou la protéine Keap1 respectivement les inhibiteurs négatifs de HIF-1 et NRF2. Ces facteurs pourront ensuite se transloquer dans le noyau où ils favoriseront la transcription des nombreux gènes impliqués dans la régulation du métabolisme. Les mutations qui touchent les protéines IDH (isocitrate déshydrogénase) ne provoquent pas une perte de l'activité mais elles leur confèrent une nouvelle activité enzymatique qui conduit à la production de 2-HG (2-hydroxyglutarate). Celui-ci peut, par la suite inactiver des déméthylases et empêcher la différenciation cellulaire. L'ensemble de ces métabolites provoque ainsi une modification du métabolisme dans les cellules cancéreuses.

### 3.6.3 La fumarate hydratase

La fumarate hydratase (FH) est une enzyme qui fait aussi partie du cycle de Krebs. Cette enzyme permet l'hydratation du fumarate en malate. Les mutations de cette protéine ont été mises en évidence dans les carcinomes rénaux (Tomlinson I.P. et al., 2002). Toutes les mutations décrites jusqu'à présent provoquent une perte de fonction de la protéine et donc l'accumulation du fumarate. De manière semblable aux mutations de SDH, les mutations de la FH peuvent provoquer dans la cellule un état de pseudo hypoxie, via la stabilisation de HIF-1 (Pollard P.J. et al., 2007) . En effet, l'accumulation du fumarate peut inhiber la PHD2 (Figure 7), comme cela avait été décrit pour le succinate. Récemment, il a été démontré que le fumarate peut également modifier des résidus cystéine de la protéine KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) par succination (Kinch L. et al., 2011). La modification de KEAP1 entraîne une altération de son activité comme inhibiteur du facteur Nrf2 (Nuclear

factor (erythroid derived 2)-like 2) (Figure 10). Ainsi, Nrf2 est actif dans ces cellules, favorise l'expression de protéines antioxydantes et confère un avantage à la cellule tumorale pour diminuer le stress oxydant.

Par ailleurs, d'autres protéines semblent aussi être affectées par l'accumulation du fumarate. Cela a été décrit dans les fibroblastes embryonnaires portant une mutation de la FH où plus de 90 protéines ont subi de la succinylation. Parmi ces protéines, se trouvent des protéines impliquées dans le métabolisme, comme l'Aconitase 2 (ACO2) qui participe au cycle de Krebs (Ternette N. et al., 2013). Cependant, l'impact de la succinylation sur l'activité de toutes ces protéines restent à déterminer.

De plus, il a été montré récemment, que les cellules portant cette mutation sont capables de réaliser ce qu'on appelle une carboxylation réductive, caractérisée par l'inversion des réactions enzymatiques au niveau du  $\alpha$ -cétoglutarate, via l'enzyme IDH2, permettant ainsi la formation du citrate. Cependant, ces cellules réalisent également l'oxydation du  $\alpha$ -cétoglutarate dans le but d'obtenir du NADPH, un cofacteur indispensable au fonctionnement de l'enzyme IDH2. Ainsi, dans ces cellules, les métabolismes oxydatif et réductif du  $\alpha$ -cétoglutarate coexistent, permettant à travers l'enzyme NNT (NAD(P) transhydrogenase, mitochondriale) d'obtenir du NADPH à partir du NADH issu de la transformation du  $\alpha$ -cétoglutarate en succinylCoA (Mullen A.R., 2014). Ainsi, la présence de cette mutation induit des modifications métaboliques dans les cellules cancéreuses de manière directe comme indirecte.

## 4 La diversité du métabolisme dans le cancer

### 4.1 En fonction des altérations génétiques

Les modifications métaboliques dans les cellules cancéreuses, peuvent ainsi se voir influencées par l'activation des oncogènes et l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs. Cependant il a été montré que l'activation d'un même oncogène peut induire des modifications très hétérogènes d'un type de cancer à l'autre. En effet, l'équipe de Yuneva a montré en 2012 que le profil métabolique d'une cellule cancéreuse ne dépend pas uniquement des altérations génétiques présentes mais aussi du type cellulaire. Ainsi, par exemple, la surexpression de MYC dans les cellules du foie et du poumon n'induit pas les mêmes modifications métaboliques dans ces deux types



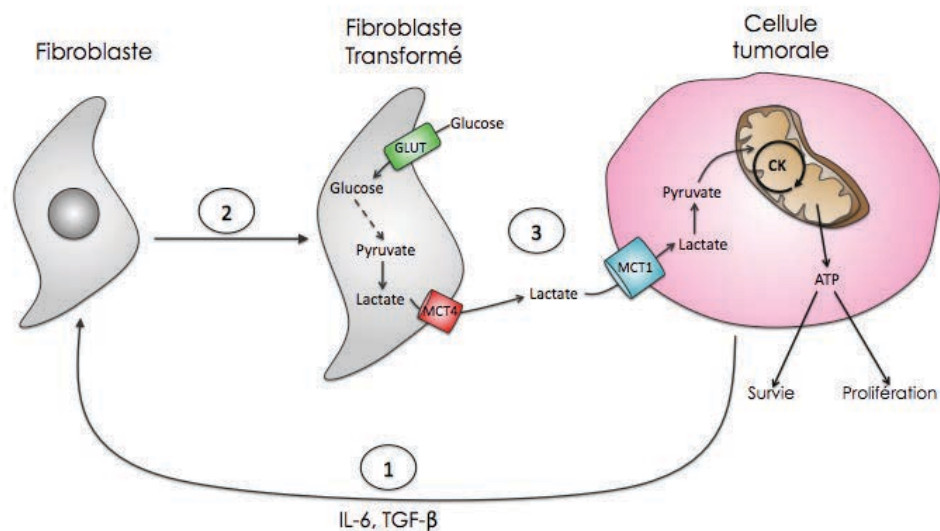
cellulaires. En effet, en utilisant des modèles de souris exprimant Myc de manière inductible et tissus dépendante, Yuneva et al, ont mis en évidence que Myc augmente le métabolisme du glucose dans ces deux types cellulaires en augmentant l'expression des transporteurs du glucose, de la LDH-A et de la HKII. Cependant, en ce qui concerne le métabolisme de la glutamine, Myc induit dans les cellules du poumon une forte addiction pour ce substrat, contrairement aux cellules du foie où le métabolisme de la glutamine reste faible (Yuneva M.O. et al., 2012). Cet aspect est très important et soulève l'importance de déterminer le rôle sur le métabolisme d'un oncogène ou gène suppresseur de tumeur, dans chaque contexte génétique, car ce qui s'avère vrai pour un cancer ne l'est pas forcément pour d'autres. Le développement des approches permettant d'évaluer les flux métaboliques dans les tumeurs des patients semble donc indispensable.

#### **4.2 En fonction de l'environnement**

Les modifications métaboliques dans les cellules cancéreuses sont, en partie, le résultat des altérations génétiques au niveau des protéines clés. Cependant, l'environnement cellulaire peut aussi jouer un rôle très important dans le métabolisme tumoral. Le meilleur exemple est l'impact de l'hypoxie sur le métabolisme tumorale. En effet, la concentration d'oxygène n'est pas la même dans les différentes régions de la tumeur. Les cellules au sein d'une même tumeur ne présentent donc pas un seul et même phénotype métabolique (Nakajima E.C. et al., 2013). Les régions où la concentration d'oxygène est très faible favoriseront la stabilisation du facteur HIF-1 et l'induction d'un métabolisme plutôt glycolytique, alors que les cellules, dans les régions mieux oxygénées, seront capables d'utiliser la phosphorylation oxydative. Cependant, il a été montré récemment que l'hypoxie n'induit pas seulement un comportement métabolique différent entre les cellules de deux régions distinctes de la tumeur, mais qu'il peut aussi favoriser la symbiose de ces cellules.

En effet, il a été montré dans un modèle de cancer cervical, que les cellules présentes dans les régions mieux oxygénées de la tumeur captent et utilisent le lactate produit par les cellules glycolytiques environnantes. Ainsi, le lactate capté par ces cellules sera transformé en pyruvate et utilisé pour l'obtention d'énergie (ATP) via la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie (Sonveaux P. et al., 2014).

De même, l'équipe de Lisanti a observé que, dans certains contextes, les fibroblastes présents dans le stroma peuvent devenir glycolytiques (CAF : cancer associated fibroblast) et apporter aux cellules cancéreuses des métabolites comme le pyruvate ou lactate (Figure 8). De plus, cette même équipe a montré, dans un modèle du cancer du sein, qu'il y a une expression différentielle des transporteurs de lactate entre ces deux types de cellules : les fibroblastes présents dans le stroma expriment plutôt le transporteur MCT4, caractéristique des cellules glycolytiques, alors que, au contraire, les cellules cancéreuses du sein expriment le transporteur MCT1, connu pour son rôle dans l'importation du lactate (Migneco G. et al., 2010). Ainsi, le lactate, produit par les CAF, est utilisé par les cellules tumorales proches des vaisseaux sanguins dont le métabolisme est plutôt dépendant de la phosphorylation oxydative. Le lactate semble donc être l'un des principaux métabolites jouant un rôle dans le métabolisme des cellules cancéreuses comme substrat énergétique. Cette modification métabolique a reçu le nom de « Reverse Warburg Effect », qui décrit donc la coopération métabolique entre les cellules cancéreuses et les cellules environnantes.



**Figure 8: L'interaction métabolique des cellules environnantes et cellules tumorales :** Les cellules tumorales peuvent influencer le comportement métabolique des fibroblastes présents dans l'environnement tumoral via la libération des facteurs comme l'IL-6 (Interleukine 6) ou le TGF-β (Tumor Growth Factor Beta). Ainsi les fibroblastes sont transformés en CAF (cancer associated fibroblast) et présentent un métabolisme glycolytique. Ces CAFs vont aussi exprimer le MCT4 (transporteur de lactate 4), une protéine qui sert à l'exportation du lactate. Ce lactate est repris, via le transporteur MCT1 (transporteur de lactate 1), par les cellules tumorales situées dans les zones mieux oxygénées de la tumeur. Le lactate importé va être transformé en pyruvate pour ensuite être utilisé au niveau de la mitochondrie pour l'obtention d'ATP favorisant ainsi la survie et la prolifération.

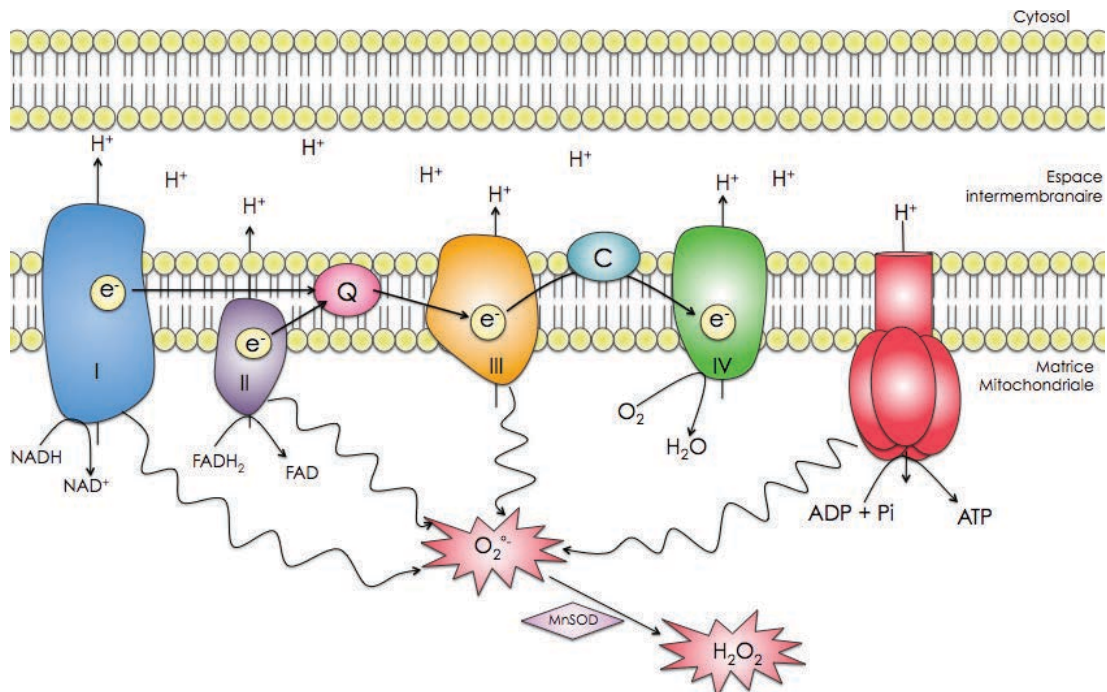
## 5 Le rôle du métabolisme dans la régulation du stress oxydant

### 5.1 Les sources de stress oxydant et les mécanismes de détoxification

#### ◆ Dans les cellules saines

Le stress oxydant est le produit d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et leur détoxification, ce qui provoque une accumulation de ces dernières. En condition physiologique, les ROS peuvent provenir de différentes sources, enzymatiques et non-enzymatiques. On trouve ainsi, parmi les sources enzymatiques, les NOXs (NADPH oxydase), la xanthine oxydase, les cyclooxygénases (COX), les lipoxygénases (LOX) et les thymidines phosphorylases. Parmi les sources non-enzymatiques, on trouve la mitochondrie qui représente la source principale de ROS dans les cellules (Murphy M.P. et al., 2009). Dans la mitochondrie, les ROS sont produits du fait de l'activité de la chaîne respiratoire lors de la fuite d'électrons au niveau du site IQ du complexe I du site II<sub>F</sub> du complexe II et du site IIIQ<sub>o</sub> du complexe III (Brand M., 2010 ; Quinlan C. et al., 2012) . De plus, l'ATP-synthase, considérée par certains auteurs comme le complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale, a récemment été associée à la production de ROS via son inhibition par la protéine IF1 (Martínez-Reyes I. et al., 2014). Les électrons, qui se sont échappés, vont réagir avec l'oxygène présent dans la mitochondrie et former l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Environ 0,2-2% de l'oxygène consommé par la cellule part vers la production de ROS (Murphy M.P., 2009) (Figure 9).

Les cellules possèdent, en conséquence, des mécanismes efficaces de détoxification. Ainsi, l'anion superoxyde va être rapidement transformé par la Superoxyde dismutase 2 (SOD2 ou MnSOD) en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Figure 9). Ce dernier, se diffuse très facilement dans le cytosol où il sera pris en charge par différentes enzymes responsables de sa détoxification comme la SOD 1 (Zn/Cu SOD), la catalase, les thioxyredoxines, le peroxyredoxynes et les glutathion-peroxydases (GPx) qui utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur.



**Figure 9. La production mitochondriale de ROS.** Dans la cellule, la transformation du glucose en pyruvate et son oxydation au niveau mitochondrial permettent le fonctionnement du cycle de Krebs en apportant un substrat principal, l'Acetyl-CoA. Le fonctionnement du cycle de Krebs produit des intermédiaires énergétiques qui vont favoriser le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) via le NADH et le  $FADH_2$ . Ces deux substrats sont utilisés par le complexe I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale, respectivement. La réoxydation de ces deux cofacteurs à travers un flux d'électrons au niveau des complexes est accompagné de la création d'un gradient de protons qui servira ensuite pour la production d'ATP grâce à la ATP synthase. Le dernier accepteur d'électrons est l'oxygène donnant ainsi du  $H_2O$  au niveau du complexe IV. Il est possible que des électrons puissent échapper au niveau du complexe I, II et III de CRM et qu'ils interagissent avec l'oxygène présent dans la matrice mitochondriale pour former l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ). De plus le complexe III peut également produire du  $O_2^{\cdot -}$  dans l'espace intermembranaire. Plus récemment, il a été montré que le complexe IV ou ATP synthase pouvait également participer à la formation de ROS. Le  $O_2^{\cdot -}$  produit sera rapidement transformé en  $H_2O_2$  (peroxyde d'hydrogène) par la SOD mitochondriale (MnSOD), celui qui peut rapidement diffusé dans le cytosol où il sera pris en charge par d'autres enzymes antioxydants comme la catalase ou la glutathion peroxydase.

#### ◆ Dans les cellules tumorales

Dans les cellules tumorales, les ROS peuvent être produits par les mêmes sources qu'en conditions physiologiques mais dont le fonctionnement est altéré dû à des modifications aberrantes d'expression ou d'activité. Par exemple, les adénocarcinomes du colon présentent une surexpression des NOX 1, associée à l'activation constitutive de la voie  $NF\kappa B$  (Fukuyama M. et al., 2005). De même, la protéine NOX4 est souvent surexprimée dans les mélanomes et provoque également l'activation de la voie  $NF\kappa B$ , favorisant la survie. (Brar S. et al., 2002). La surexpression de NOX4 a également été décrite dans les carcinomes rénaux, dans ce modèle l'expression de cette protéine est associée à la production de IL-6 et IL-8

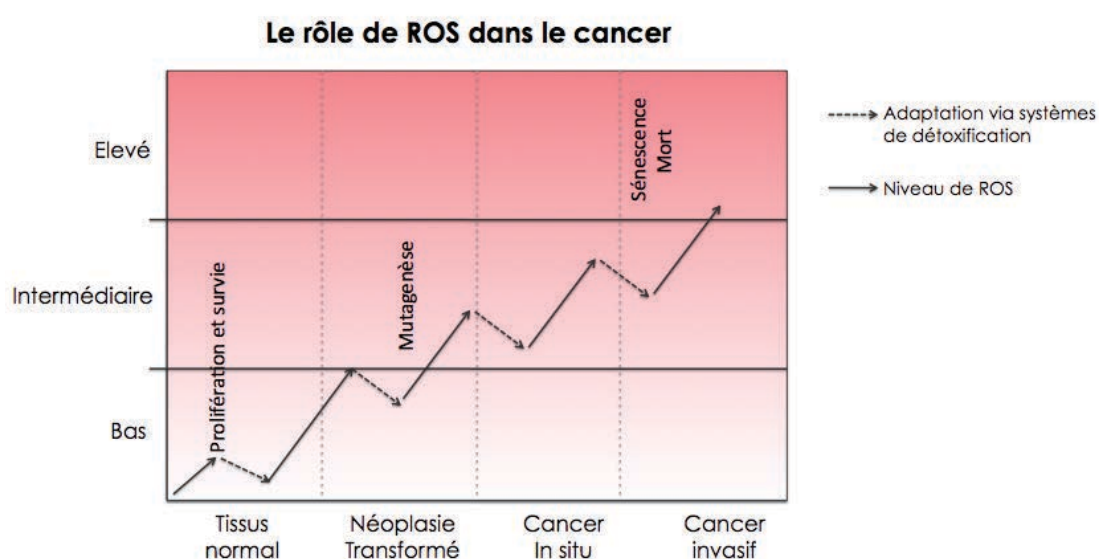
favorisant l'inflammation et la métastase (Fitzgerald J. et al., 2012) La surexpression d'autres enzymes, telles que les cycloxygénases, identifiée dans les cancers gastriques (Song J. et al., 2014), ou des lipoxygénases, dans le cancer du colon, est associée à un mauvais pronostic et un phénotype invasif. (Wasilewicz M. et al., 2010).

L'augmentation de ROS peut également être une conséquence de l'activité métabolique aberrante due à l'activation des oncogènes (Cairns R. et al., 2011). Ainsi, il a été montré que la prolifération exacerbée des cellules cancéreuses peut provoquer une augmentation de l'activité du peroxisome ou du réticulum endoplasmique. En effet, dans le but de soutenir la prolifération, les cellules tumorales doivent augmenter de manière importante la synthèse des protéines. La maturation de la plupart de celles-ci a lieu au niveau du réticulum, via des réactions d'oxydation qui favorisent la formation des ponts disulfure, ceci peut donc favoriser la production et accumulation de ROS (Gorrini C., 2013).

En ce qui concerne le rôle de la mitochondrie dans la production de ROS, dans les cellules tumorales, celui-ci n'a pas encore été bien établi. En effet, le dysfonctionnement de la mitochondrie, souvent associé au cancer, permettrait d'expliquer la production aberrante de ROS. Néanmoins, on sait aujourd'hui que peu de cellules cancéreuses présentent vraiment un dysfonctionnement mitochondrial dû aux mutations de l'ADN mitochondrial. Ainsi, la production de ROS dans la mitochondrie est surtout associée à une diminution de l'efficacité du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette diminution de l'efficacité du transport a surtout été observée dans des conditions qui provoquent le ralentissement du transport d'électrons (Martínez-Reyes I. et al., 2014). Il a également été observé, en condition physiologique, que lors de l'hypoxie, le complexe III de CRM produit plus de ROS qu'en condition de normoxie dû à une réversion du flux d'électrons. Cette augmentation de la production de ROS a été d'ailleurs associée à la stabilisation du facteur HIF-1 (Chandel N.S. et al., 1998). De cette manière, en conditions pathologiques, le flux d'électrons au niveau de la mitochondrie semble être altéré et associé à une augmentation de la fuite d'électrons; mais cela nécessite encore une évaluation plus approfondie dans différents modèles.

## 5.2 Conséquence Biologique de la production de ROS

Bien que les ROS aient été considérés longtemps comme un produit dérivé et indésirable de l'activité de la mitochondrie dans la cellule, il a été montré récemment qu'ils jouent un rôle comme messagers dans différentes voies de signalisation, surtout le  $H_2O_2$ , en raison de sa forte stabilité (Cairns R. et al., 2011). L'effet des ROS dans les cellules cancéreuses peut varier en fonction de la concentration de ceux-ci. Ainsi, en condition physiologique les faibles quantités des ROS participent à la régulation des certaines voies de signalisation et favorisent la prolifération alors que, dans certains contextes pathologiques, des concentrations plus élevées favorisent la mutagenèse. Les ROS à fortes concentrations peuvent également induire la mort via l'induction de dommages irréparables pour la cellule (Figure 10).



(D'après Gorrini C., 2013)

**Figure 10: Le rôle des ROS dans l'initiation et la progression tumorale.** Le processus de développement de la tumeur est accompagné d'une augmentation progressive du stress oxydant. Ainsi, les cellules en condition physiologique présentent une faible quantité de ROS qui augmente de manière significative lors de l'activation des oncogènes. Les suppresseurs des tumeurs cherchent donc à augmenter cette production pour induire la sénescence. Cependant, ils sont souvent inactivés et la cellule met en place des mécanismes pour éviter la sénescence et réguler la production de ROS. Dans le cancer *in situ*, le stress oxydant est élevé et favorise l'adaptation de la cellule aux conditions adverses via la mutagenèse mais la mort est prévenue par les systèmes de détoxification. Une augmentation du taux de ROS peut également favoriser la métastase et le passage d'un cancer *in situ* vers un cancer invasif. Néanmoins, une augmentation trop importante de ROS induit la sénescence ou la mort.

### ◆ Effet des ROS sur la signalisation cellulaire

En condition physiologique, on observe souvent une faible quantité de ROS. Elle est nécessaire pour induire la prolifération, la survie et même dans certaines circonstances, l'adaptation à l'hypoxie. Ainsi, dans les cellules saines, les ROS permettent donc de réguler plusieurs voies de signalisation en fonction de l'état de la cellule.

Cependant, l'augmentation du taux de ROS, souvent observé en condition pathologique, peut induire des modifications post-traductionnelles réversibles au niveau de certaines protéines, par l'oxydation des sites contenant des cystéines. Cette oxydation va provoquer une modification de la configuration de la protéine associée à l'activation ou l'inhibition de celle-ci. Ainsi, des niveaux modérés de ROS ont été associés à l'oxydation et à l'inhibition de certaines phosphatases, comme celles qui régulent l'activité de la voie MAPK (Protein tyrosine phosphatase 1b (PTP1b)) (Barrett W. et al., 1999), de la voie AKT (PTEN) (Lee S. et al., 2002) ou encore de la voie NF- $\kappa$ B, dont l'activation constitutive a été liée à la surexpression des NOXs dans le mélanome (Brar S, 2001). L'inhibition de ces phosphatases se traduit par l'activation des voies favorisant la prolifération.

### ◆ Effet des ROS sur la carcinogénèse

Les ROS peuvent provoquer également l'oxydation des bases de l'ADN. La base la plus souvent altérée est la guanine, dont l'oxydation provoque la formation de la 8-oxoguanine. Cette base oxydée provoque ainsi l'insertion erronée des bases lors de la réplication de l'ADN, entraînant fréquemment des transversions de type GC→TA. Ces modifications, qui induisent des mutations, sont souvent trouvées lors de l'activation des oncogènes ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur comme RAS ou TP53. Par ailleurs, une étude, réalisée sur le cancer du colon, suggèrent que les mutations de la protéine p53 fréquemment trouvées dans ce cancer seraient liées au taux élevé de stress oxydant (Ziech D., 2011). Il a été montré également que, lors de la sénescence induite par l'activation des oncogènes (OIS) comme BRAF (Kaplun J. et al., 2013) ou RAS (de Groof A. et al., 2009), on observe une forte augmentation de la



phosphorylation oxydative et de la production de ROS. Ces ROS seraient nécessaires pour induire une instabilité génétique favorisant l'apparition de mutations très ponctuelles au niveau de l'ADN qui toucheraient des gènes clés et permettraient de surmonter la sénescence (Maciag A. et al., 2004) (Figure 10). Cependant, d'autres auteurs soutiennent que l'augmentation de ROS est nécessaire pour induire la sénescence et empêcher l'initiation tumorale. Ces aspects restent encore à déterminer mais l'implication des ROS dans d'autres processus pro-tumorigènes telles que la transition épithélium mésenchyme (par l'activation de voies clés qui activent la migration cellulaire), l'angiogenèse (l'accumulation de ROS étant liée à l'augmentation du VEGF) et l'adaptation à l'hypoxie (Sosa V. et al., 2013) confirment le rôle positif de ROS dans le contexte tumoral.

#### ◆ **Effet des ROS sur la mort cellulaire**

Une augmentation excessive du taux de ROS peut avoir un effet délétère, car ces ROS provoquent l'oxydation excessive des molécules clés telles que l'ADN, les lipides ou les protéines, présentant des dommages irréparables pour la cellule. Ainsi, un taux très élevé de ROS est associé à l'induction de la mort de la cellule dans la plupart des cas par apoptose (Figure 10). Cette induction peut être directe, car les ROS sont capables de provoquer l'oxydation des résidus cystéines de la protéine ANT qui fait partie des pores mitochondriaux, permettant la libération du cytochrome C et la formation de l'apoptosome (Costantini P. et al., 2000). Elle peut aussi être indirecte, lors de dommages trop importants, par exemple lors de l'accumulation de dommages de l'ADN qui vont déclencher l'apoptose dans la cellule (De Zio D. et al., 2013).

### 5.3 Les modifications métaboliques participent à la régulation du stress oxydant

#### ◆ **L'importance du NADPH**

Les modifications métaboliques dans les cellules cancéreuses vont, non seulement, favoriser la prolifération, mais aussi réguler la production de ROS dans le but de



prévenir la mort cellulaire (Cairns R. et al., 2011). Dans ce contexte, les cellules possèdent plusieurs mécanismes d'élimination des ROS qui permettent de prévenir les dommages irréversibles. La principale molécule antioxydante dans la cellule est le glutathion (GSH), qui sert de cofacteur à plusieurs enzymes antioxydantes, telle que la glutathion peroxydase (GPx). La formation du GSH dépend essentiellement de la disponibilité du NADPH dans la cellule. Ce dernier joue un rôle très important car il apporte le pouvoir réducteur nécessaire pour la régénération du glutathion réduit (GSH), après son oxydation en glutathion oxydé (GSSG). De même, le NADPH sert de cofacteur à la thioredoxyne, qui est un autre système de détoxification très importante dans la cellule (Handy D. et al., 2012).

Ainsi, les modifications métaboliques dans les cellules cancéreuses permettront d'augmenter la concentration du NADPH. La voie métabolique des pentoses phosphates est la principale voie associée à la production du NADPH. La bifurcation du glucose-6-phosphate vers cette voie permet, par sa transformation en 6-phosphogluconactone, la production de NADPH (Figure 11). Plus loin dans cette même voie, une deuxième réaction enzymatique catalysée par la 6-phosphogluconate déshydrogénase, permet également l'obtention de ce pouvoir réducteur. Cependant, des études récentes montrent qu'en dehors de la voie de pentoses phosphates, la voie de la sérine peut également contribuer de manière importante à l'obtention du NADPH dans les cellules avec un taux élevé de prolifération. En effet, un autre intermédiaire glycolytique, le 3-phosphogycérate, peut bifurquer dans cette voie et être transformé en phosphohydroxypyruvate par le PHGDH; qui est une réaction accompagnée de la production du NADPH. Curieusement, les études réalisées par Fan et al., montrent dans différentes lignées tumorales, que la voie de la sérine est responsable de 40% de la production totale de NADPH dans la cellule. Cette étude montre également pour la première fois que la production de NADPH par la voie de la sérine n'est pas strictement liée aux réactions enzymatiques de la voie proprement dite, mais à l'obtention de la glycine capable d'entrer dans le cycle des folates (**Fig. récapitulatif**), celui-ci contribue de manière importante à l'obtention de ce pouvoir réducteur (Fan J. et al., 2014).

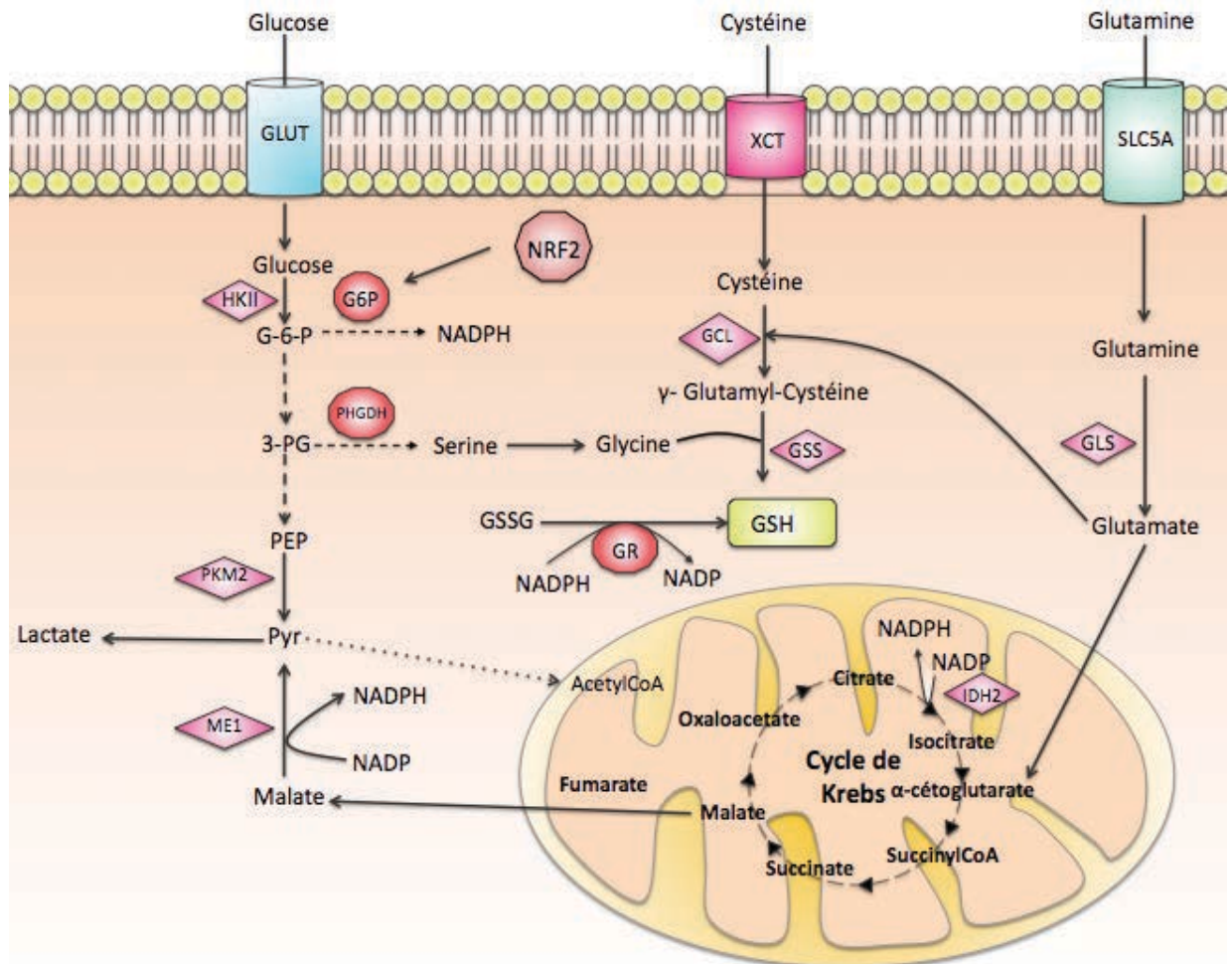
De manière similaire, le métabolisme de la glutamine est fortement associé à la production du NADPH (Figure 11). En effet, la transformation du malate, dérivant de

la glutamine, en pyruvate au niveau du cytosol est accompagnée de la production du NADPH (DeBerardinis R. et al., 2007). De plus, la transformation du isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate par l'enzyme IDH2 permet également d'augmenter le pool de NADPH (Smolková K. et al., 2012). Par ailleurs, ces voies ne participent pas uniquement à la régénération du glutathion mais aussi à la synthèse de celui-ci. Le glutathion est le résultat de la condensation du glutamate, de la glycine et de la cystéine. Ces trois substrats limitent donc la synthèse de cette molécule. La cystéine est importée directement du milieu extracellulaire via les transporteurs spécifiques comme le XCT (cystéine/glutamate transporter). La transformation de la glutamine par la GSL permettra l'obtention du glutamate (Xiang L. et al., 2013), alors que la glycine provient du métabolisme du glucose par sa transformation via la voie de la sérine.

Par ailleurs, le facteur NRF2, un facteur de transcription qui régule la réponse face au stress oxydant à également été décrit comme pouvant jouer un rôle important dans la régulation de la détoxification de ROS dans les cellules cancéreuses. Ce facteur, souvent surexprimé dans les cancers du pancréas (Lister A. et al., 2011), du sein (Nioi P. et al., 2007) et du poumon (Li Q.K. et al., 2011), permet l'expression d'un nombre très large de protéines qui participent au processus d'élimination de ROS. Ces protéines peuvent être des enzymes qui participent directement à la détoxification, comme la catalase, ou des protéines qui favorisent la régénération du glutathion (Lee J.M. et al., 2003). Une étude récente a démontré que, NRF2 peut également modifier le métabolisme dans la lignée A549 du cancer du poumon. En effet, NRF2 peut réguler l'expression des enzymes participant dans la voie PPP, comme la G6PD et la TALDO1 (Figure 5). La régulation de la voie PPP par NRF2 semble être indispensable dans ce modèle, car l'inhibition de l'induction de cette voie par ce facteur provoque une diminution importante de la prolifération.

De plus, NRF2 pourrait également réguler les enzymes participant au métabolisme de la glutamine tels que ME1 et l'IDH1. La régulation de l'ensemble de ces enzymes, semble être directe via les sites ARE (Antioxydant Response Element) reconnus par NRF2 au niveau de leurs promoteurs (Mitsuishi Y. et al., 2012). Cependant, il reste à déterminer si la régulation de ces voies, menée par NRF2, est indispensable parce qu'elle permet l'obtention du NADPH ou si elle a un impact direct sur la prolifération. Il est même probable qu'il n'existe pas vraiment une distinction entre ces deux effets

car, dans certains modèles, la régulation du taux de glutathion semble être un processus indispensable à la prolifération cellulaire (Friesen C. et al., 2004).



**Figure 11: La participation du métabolisme dans la régulation de l'état redox.** La cellule tumorale met en place plusieurs mécanismes pour se défendre face au stress oxydant occasionné par l'activation des oncogènes. Le glucose, via la glycolyse, peut donner des intermédiaires qui peuvent bifurquer vers la voie de pentose phosphates (PPP) grâce à l'expression de l'enzyme G6P ou vers la voie de la sérine grâce à l'enzyme PHGDH. Dans les deux cas, ces voies produisent du pouvoir réducteur sous la forme de NADPH un cofacteur nécessaire à la Glutathion réductase (GR) qui permet de régénérer le glutathion (GSH). La voie de la sérine via la GSS participe aussi à l'obtention de la glycine, qui servira pour la production de GSH. La glutamine, quand à elle, participe également la régulation du stress oxydant, via sa transformation en  $\alpha$ -cétoglutarate qui sort du cycle de Krebs sous la forme de malate, celui qui est transformé en pyruvate, une réaction accompagnée de la production du NADPH. La glutamine peut également donner du glutamate en substrat important pour la synthèse du GSH grâce aux enzymes GLS (Glutaminase). Les cellules tumorales incrémentent aussi l'importation de la cystéine via le transporteur XCT. Celle-ci avec la glycine et le glutamate donne lieu au GSH grâce aux enzymes GCL (Glutamate-cystéine liagase) et GSS (Glutathion synthase). Le facteur NRF2 en plus de favoriser l'expression des enzymes antioxydantes peut également modifier le métabolisme pour obtenir du NADPH, ceci en favorisant l'expression des enzymes participant dans la voie PPP.

### ◆ **La répression de la phosphorylation oxydative comme mécanisme de régulation du stress oxydant ?**

Un autre mécanisme qui semble impliqué dans la régulation de la production de ROS dans les cellules tumorales est la répression de l'activité mitochondriale, source principale de ROS dans la cellule. En effet, plusieurs auteurs pensent que l'inactivation de la phosphorylation oxydative dans les cellules cancéreuses permettrait d'empêcher la production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. La prolifération élevée de ces cellules conduirait à une activité trop importante de la chaîne respiratoire mitochondriale et donc à une production trop importante de ROS ce qui déclencherait la mort cellulaire (Sosa V. et al., 2013). Ainsi, l'activation de la plupart des oncogènes, comme le cas du facteur HIF-1, est liée à une répression de la phosphorylation oxydative. Cependant, ce mécanisme de répression de la production de ROS reste à démontrer.

## **6 Le métabolisme comme cible thérapeutique**

### **6.1 Les molécules ciblant le métabolisme du glucose**

Le travail de Warburg sur les cellules tumorales a permis le développement de nouvelles technologies de diagnostic et de suivi, comme la TEP. De plus, il permet le développement de molécules ciblant la glycolyse exacerbée dans la plupart des cellules cancéreuses. Cependant, il semble très compliqué de cibler la glycolyse de manière générale, car cela risque d'affecter les cellules normales en prolifération, fortement glycolytiques, elles aussi. Les molécules qui ont été ou sont développées actuellement cherchent donc à cibler les protéines altérées au niveau des cellules cancéreuses, que ce soit en terme d'expression ou d'activité aberrante (Tableau 1). Par exemple, il est possible de citer la phloretin ou la fasantin, des inhibiteurs du transporteur de glucose GLUT1, souvent surexprimés dans les cancers. Malheureusement, cette molécule ne semble avoir un effet qu'en la combinant avec d'autres chimiothérapies, comme la daunorubicine dans différents lignées cellulaires (Cao X. et al., 2007). D'autres inhibiteurs ciblent l'enzyme Hexokinase II, surexprimée dans les cancers et dont le rôle ne se limite pas au métabolisme, car elle peut aussi jouer un rôle en inhibant l'apoptose. Les inhibiteurs actuellement disponibles, comme

le 3-bromopyruvate, le clotrimazole ou le methyl- jasmonate, provoquent davantage un détachement de cette enzyme de la mitochondrie, ce qui diminue son activité (Chen Z. et al., 2009 ; Goldin N. et al., 2008)).

Dans la voie de la glycolyse, une autre enzyme a capté beaucoup d'attention pour son expression anormale dans les cellules cancéreuses: la PKM2 (Vander Heiden M. et al., 2010). Cependant, les données dans la littérature sur l'effet de l'inhibition de cette enzyme sont contradictoires. Dans un modèle de cancer du poumon, l'inhibition de la PKM2 favorise l'accumulation des intermédiaires glycolytiques et leur engagement dans d'autres voies métaboliques comme la voie PPP ou la voie de la sérine, permettant ainsi la survie de la cellule. Dans ce modèle, l'effet de l'inhibition de PKM2 serait associé à une plus forte résistance au stress oxydant, via la production de NADPH. Les auteurs de ces travaux suggèrent donc que des activateurs de cette protéine pourraient s'avérer plus efficaces (Anastasiou C. et al., 2014). Au contraire, dans un modèle de carcinome rénal, l'inhibition de la PKM2 a un effet plutôt pro-apoptotique qui se traduit par une régression du volume tumoral chez la souris immunodéprimée (Goldberg M. et al., 2012). Ainsi, l'effet de l'inhibition de la PKM2 semble être contexte-dépendant ; les essais cliniques en cours dans le mélanome et les carcinomes rénaux avec des molécules telle que la TLN-232 permettront de mieux comprendre dans quels cas l'inhibition de cette protéine peut être bénéfique.

Il existe aussi des molécules capables de mimer le glucose, comme par exemple le 2-desoxyglucose, un analogue non métabolisable du glucose. Cette molécule entre donc en compétition avec le glucose au niveau des transporteurs membranaires. Une fois à l'intérieur de la cellule, comme le glucose, elle est phosphorylée par l'hexokinase, mais elle ne peut plus être métabolisée par la suite. Cela provoque donc, dans la cellule, un état de privation en glucose. Malheureusement, cette molécule présente une forte toxicité (Porporato P. et al., 2011) mais, dans certaines situations, sa combinaison avec d'autres molécules, comme l'etomoxir (Hernlund E. et al., 2008) ou TRAIL (Liu H. et al., 2009) , semble efficace.

**Tableau 1 : Les molécules ciblant le métabolisme du glucose**

Molécule	Cible	Cancer	Phase de développement
<b>2-DG</b>	Glucose	Cancer de la prostate	Phase I (En combinaison)
<b>TLN-232</b>	PKM2	Carcinomes rénaux Mélanome	Phase II
<b>AT-101</b>	LDHA	Divers Cancers	Phase I/II
<b>Phloretin</b>	Glut-1	Mélanoma Cancer du Sein Leucémie	Pre-clinique (In vitro)
<b>Silybin</b>	Glut-1	Cancer de la prostate Cancer du foie	Phase I Phase II
<b>3-bromo-pyruvate</b>	HKII	Divers Cancers	Pre-clinique (In vitro)
<b>Clotrimazole</b>	HKII	Cancer du sein Lymphomes	Pre-clinique (In vitro)

## 6.2 Les molécules ciblant le métabolisme mitochondrial

Il a été montré, par plusieurs équipes, que toutes les cellules tumorales ne présentent pas une dépendance à la glycolyse. En effet, certains cancers, comme, par exemple, les cancers de l'ovaire et quelques cancers du poumon présentent plutôt une forte dépendance à l'activité mitochondriale. De même, il est de plus en plus clair que les cellules cancéreuses présentent une forte flexibilité métabolique. Dans ce contexte, l'inhibition de la glycolyse ne suffit pas car les cellules peuvent rapidement basculer vers le métabolisme mitochondrial pour subvenir à ses besoins. Comme pour la glycolyse, les molécules utilisées pour cibler le métabolisme mitochondrial dans le cancer doivent cibler des altérations particulières de celui-ci afin de réduire les effets sur les cellules normales. Etant donné que les cellules cancéreuses captent plus de glutamine que les cellules non transformées, le métabolisme de la glutamine est devenu une cible très attractive (Tableau 2).

Il existe ainsi des inhibiteurs des transporteurs de la glutamine (SLC1A5) comme le GPNA (L- $\gamma$ -glutamyl- $p$ -nitroanilide). Les études réalisées sur le cancer du poumon utilisant cet inhibiteur, ont montré que l'inhibition de la captation de la glutamine se traduit par une diminution significative de la prolifération et de l'augmentation de

ROS. Cependant, cette diminution de la prolifération n'est pas associée à une diminution de la viabilité mais à un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire (Hassanein M, 2013). D'autres études réalisées, dans un modèle cellulaire de cancer du sein, ont montré que l'inhibition de la captation de la glutamine se traduit par une inhibition de mTORC1 et une augmentation de l'autophagie (Nicklin P. et al., 2009). Ces résultats suggèrent que les cellules tumorales pourraient s'adapter à l'inhibition de la captation de la glutamine ce qui pourrait limiter l'effet thérapeutique de cette approche.

Les autres cibles thérapeutiques sont les enzymes responsables de la transformation de la glutamine qui favorisent son entrée dans le cycle de Krebs. L'inhibition de ces enzymes s'est avérée efficace dans plusieurs cancers, en particulier dans les cancers dépendant de Myc. Le BPTES (bis-2-5-phenylacetimido-1,2,4-thiadiazol-2-yl-ethyl sulfide), un inhibiteur de la GSL (Robinson M.M et al., 2007) découvert récemment, a montré des résultats très encourageants dans les cancers présentant des mutations de la protéine IDH, comme les leucémies myéloïdes aiguës et les glioblastomes (Emadi A. et al., 2013). D'autres inhibiteurs comme le AOA (amino-oxyacetic acid), qui cible l'enzyme animotransferase (AT) (Thornburg J. et al., 2008) ou encore l'Epigallocatechin gallate qui inhibe la GDH (Yang C. et al., 2009), sont en cours d'évaluation respectivement dans le cancer du sein et dans le glioblastome.

De manière similaire aux approches utilisées dans le métabolisme du glucose, des analogues de la glutamine ont aussi été développés, comme l'acivicin ou l'azaserine. Cependant, l'évaluation de ces analogues s'est arrêtée car ils se sont avérés très toxiques pour plusieurs organes (Gurpreet S. et al., 1990). L'augmentation importante des données dans la littérature, montrant l'importance du métabolisme de la glutamine dans le cancer, a permis le développement de traceurs marqués de la glutamine, comme le  $^{18}\text{F}$ -(2S,4R)4-fluoroglutamin (Lieberman B. et al., 2011). Ces traceurs seront utilisés, comme c'est le cas du glucose, dans les analyses de TEP-SCAN, permettant de suivre les patients qui présentent des cancers très dépendants à la glutamine, comme ceux qui présentent une forte activité de Myc ou de la voie AKT/PI3K.

D'autres molécules comme, par exemple, le Dichloroacetate (DCA) un inhibiteur spécifique de la PDK, est capable d'inhiber les quatre isoformes de cette protéine, avec des affinités différentes. L'effet antitumoral du DCA a surtout été décrit dans les glioblastomes, les cancers du poumon et les cancers de l'ovaire (Bonnet S. et al., 2007) ainsi que dans des modèles précliniques donnant des résultats encourageants (Wong J. et al., 2008). Le DCA a été décrit comme étant une molécule capable d'augmenter le flux du pyruvate entrant dans la mitochondrie. De plus, cette molécule induirait dans les cellules tumorales une augmentation de la production de ROS d'origine mitochondriale et déclencherait la mort par apoptose. Le DCA présente surtout l'avantage d'être une petite molécule capable de pénétrer facilement dans différents tissus, tout en étant peu toxique. Par ailleurs, le DCA a déjà été utilisé pour traiter d'autres pathologies telles que les acidoses lactiques chez l'Homme (Stacpoole P.W, 1989), ce qui pourrait accélérer son utilisation clinique dans le cadre du cancer. Cette molécule est ainsi actuellement en phase d'essai clinique dans les glioblastomes de premier grade, ainsi que dans les tumeurs cérébrales.

**Tableau 2 : les molécules ciblant le métabolisme mitochondrial**

Molécule	Cible	Cancer	Phase de développement
<b>GPNA</b>	SLC1A5	Divers cancers	Pre-clinique (in vitro)
<b>BPTES</b>	GSL	LAM et glioblastomes (portant mutation)	Pre-clinique (In vivo)
<b>AOA</b>	AT	Cancer du sein	Pre-clinique
<b>Epigallocatechine</b>	GDH	Glioblastomes	Pre-clinique (In vitro)
		SLC	Phase I
<b>Azaserine</b>	Glutamine	Cancer du pancréas	Phase I (arrêté pour toxicité)
<b>DCA</b>	PDK	Cancer du cerveau	Phase I
		NSLC	Phase II



### 6.3 L'effet métabolique des traitements anticancéreux

Certaines thérapies peuvent également induire des modifications métaboliques dans les cellules cancéreuses. En ce qui concerne les chimiothérapies classiques, peu de données sont disponibles dans la littérature décrivant un rôle de ces molécules dans le métabolisme. Cependant, dans le cadre des thérapies ciblées, l'utilisation du 2-FDG-TEP-scan en clinique a permis de mettre en évidence l'impact de ces thérapies sur le métabolisme des tumeurs. En effet, les thérapies ciblées, utilisées dans le cancer du poumon, le cancer du sein ou le mélanome, induisent une diminution précoce de la captation du glucose qui peut être suivie chez les patients par cette technique. Ainsi, l'inhibition de certains oncogènes pourrait avoir en premier lieu un effet métabolique qui va se répercuter ensuite sur la prolifération. Ces résultats ont permis de mieux comprendre le rôle essentiel des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs dans la régulation du métabolisme. Un exemple très marquant de ce phénomène est l'inhibition du récepteur EGFR par le géfitinib dans le cancer du poumon où la TEP joue un rôle important dans le suivi du traitement (Sunaga N. et al., 2008). De même, le lapatinib, un inhibiteur du récepteur tyrosine kinase ErbB2 dans le cancer du sein a permis de mettre en évidence l'importance du métabolisme dans la réponse et la résistance aux thérapies ciblées. En effet, dans ce modèle, l'inhibition du récepteur ErbB2 se traduit par une diminution de la captation de glucose et une activation de l'autophagie, favorisant la survie cellulaire. Par ailleurs, cette étude a montré que la privation en glucose peut dans certains cas favoriser l'émergence des mécanismes de résistance au lapatinib (Komurov K. et al., 2012a). De même, une étude très intéressante réalisée par l'équipe de Yun montre que la régulation du métabolisme du glucose joue un rôle essentiel dans le processus d'adaptation des cellules tumorales aux thérapies ciblées. En effet, la privation en glucose des cellules portant des mutations sur la protéine KRAS ou BRAF provoque la sélection de nouvelles mutations qui permettent à ces cellules d'incorporer à nouveau du glucose et de réactiver la prolifération (Yun J. et al., 2009).

## **PARTIE 2 :**

### **LE METABOLISME SPECIFIQUE DU MELANOME**

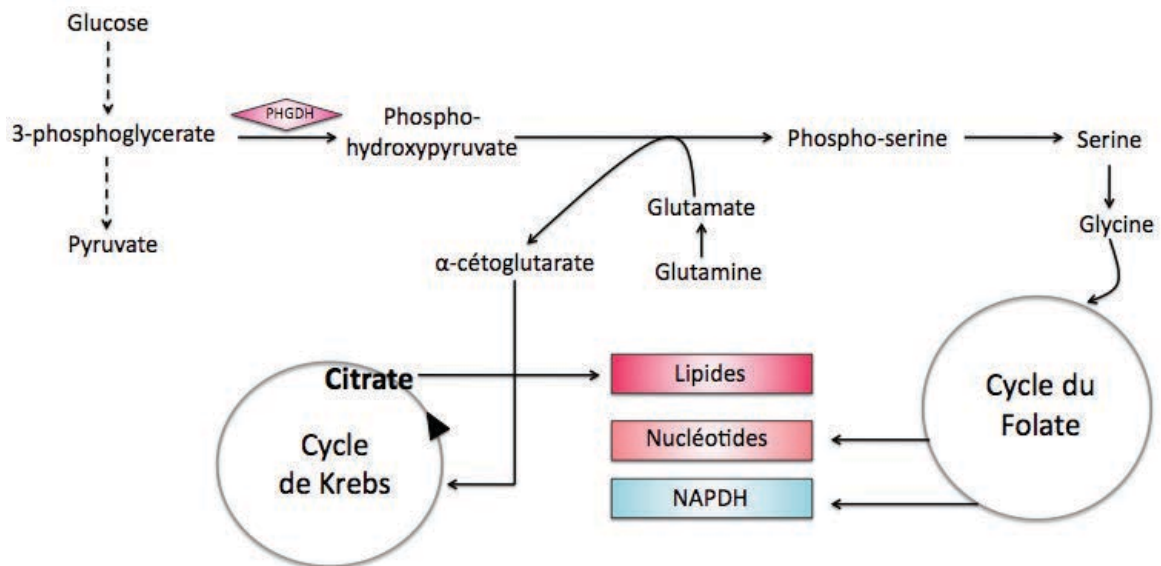
Le mélanome est un cancer qui se développe suite à la prolifération anarchique des mélanocytes transformés. Le mélanome est l'une des formes de cancer de la peau les plus agressives. Bien que cette maladie puisse se soigner efficacement aux stades précoces, au stade métastatique le pronostic est très sombre. Les évaluations du profil génétique du mélanome ont permis de mettre en évidence plusieurs mutations qui conduisent à la transformation des mélanocytes et favorise l'initiation et la progression tumorales. Ainsi, 60% des mélanomes présentent des mutations de la protéine BRAF, 15-20% présentent des mutations au niveau de NRAS et 2% des mélanomes présentent une mutation au niveau de la protéine c-Kit. Jusqu'à il y a quelques années les traitements disponibles pour le mélanome métastatique étaient très décevants et la survie global ne dépassait pas les trois mois. La découverte de ces mutations ainsi que des modifications permettant aux cellules de mélanome de surmonter l'inhibition du système immunitaire a favorisé le développement des nouvelles thérapies. Ainsi, l'inhibiteur de la protéine BRAFV600E est actuellement disponible en clinique, de même que l'Ipilimumab, un anticorps qui augmente la réponse immunitaire. Ces molécules ont révolutionné le traitement du mélanome et ont permis de prolonger de manière importante la survie globale. Cependant, ce cancer présente une forte capacité d'adaptation et la résistance, à ces nouveaux inhibiteurs, survient presque systématiquement.

#### **1 La glycolyse et les voies alternatives dans le mélanome**

La plupart des mélanomes se caractérisent par l'élévation de la consommation de glucose et la libération de lactate, ce que l'on connaît sous le nom d'effet Warburg. Pour cette raison, certains auteurs, comme Haq, considèrent le mélanome comme une maladie métabolique (Haq R., 2014). Le mélanome fait partie des cancers fortement glycolytiques où l'on peut exploiter ce profil métabolique pour le diagnostic et pour le suivi. En effet, le mélanome est l'un de cancers qui se caractérise par une fixation élevée du 2-FDG lors de la TEP (Kumar R. et al., 2010) ainsi que par une

surexpression de la protéine LDHA, responsable de la transformation du pyruvate en lactate (Ho J. et al., 2012). Cette protéine est, de nos jours, l'un des marqueurs incontournables dans le diagnostic du mélanome ainsi que dans le suivi et le pronostic de la maladie. En effet, un taux élevé de LDHA dans le sérum est fortement associé aux mélanomes métastatiques à croissance rapide et fortement invasifs (Zhuang L. et al., 2010). L'expression de cette protéine est donc directement associée au grade ou au stade de la maladie et même, dans certains contextes, à la réponse ou non à un traitement.

Exploiter les particularités métaboliques du mélanome pour le diagnostic et pour le traitement semble très important. Durant plusieurs années l'avantage du phénotype glycolytique dans les cancers a été sujet à controverse. Cependant, la glycolyse permet d'alimenter d'autres voies métaboliques via la bifurcation de certains métabolites. En effet, en 2011, Locasale et son équipe ont montré que d'autres voies métaboliques, telles que la voie de la sérine, jouent un rôle très important dans le mélanome (Figure 12). Ainsi, 40% des mélanomes présentent une amplification de la PHGDH, qui permet la bifurcation du phosphoglycérate de la glycolyse vers la voie de la sérine (**Figure récapitulative pg. 165**). Curieusement, l'amplification de ce gène n'est pas liée à la synthèse de sérine qui peut varier énormément parmi les lignées présentant cette amplification. Il semblerait donc que la surexpression de la protéine PHGDH sert plutôt à la conservation du pool de folate nécessaire à la synthèse des acides nucléiques. De plus, la voie de la sérine peut également alimenter le cycle de Krebs via le  $\alpha$ -cétoglutarate, donnant ainsi du citrate, le substrat essentiel pour la synthèse des acides gras. L'inhibition de cette protéine se traduit par une diminution de la prolifération (Mullarky E. et al., 2011), représentant ainsi une cible thérapeutique très attractive dont le rôle dans la prolifération reste encore à être bien établi dans le mélanome. Au-delà de l'importance de la glycolyse, la contribution d'autres voies métaboliques semble donc également importante et à prendre en compte pour le traitement du mélanome.



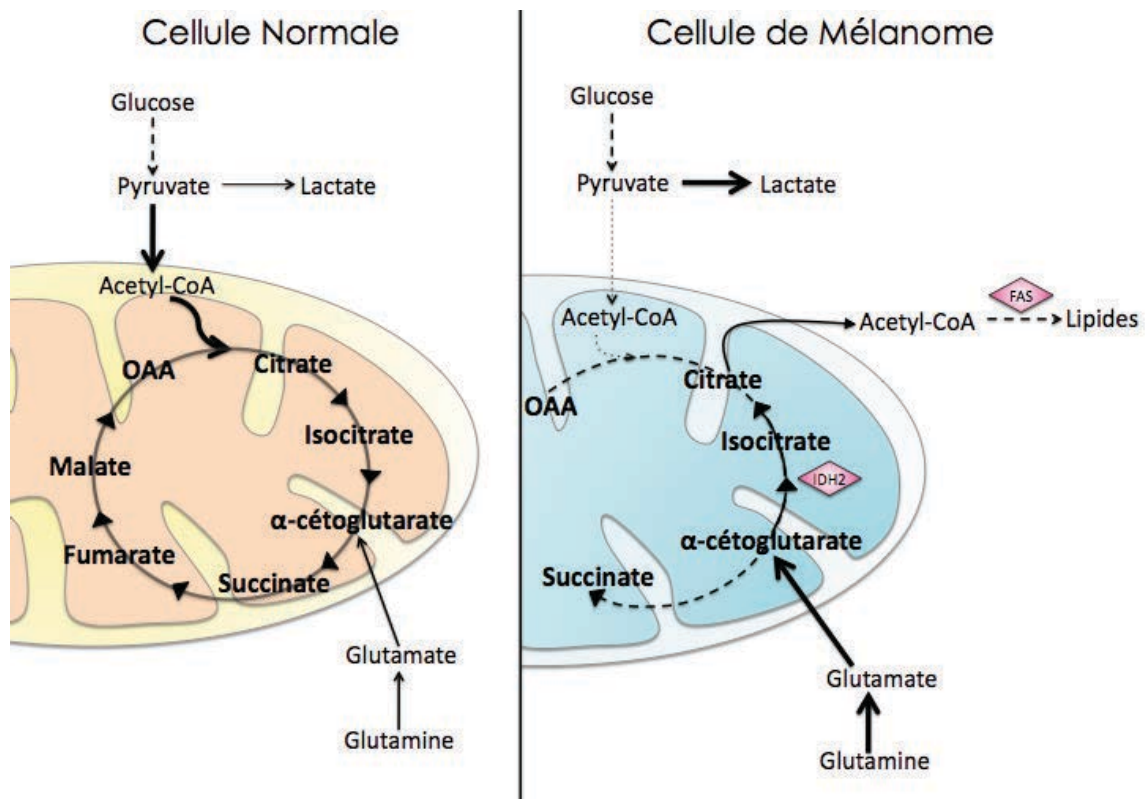
**Figure 12 : Voie de la sérine dans le mélanome.** La voie de la sérine semble jouer un rôle très important dans la prolifération du mélanome. Ainsi, 40% des mélanomes présentent une amplification de la Phosphoglycerate déshydrogénase (PHGDH), la première enzyme de cette voie. De cette manière, le 3-phospho-glycerate est dévié de la glycolyse permettant l'obtention du  $\alpha$ -cétoglutarate et de la glycine. Le  $\alpha$ -cétoglutarate peut entrer dans le cycle de Krebs, où, à travers d'une carboxylation reverse il sera transformé en citrate et permettra la synthèse des acides gras. De son côté la glycine sert à alimenter le pool de folate permettant d'obtenir des acides nucléiques et du pouvoir réducteur sous la forme de NADPH.

## 2 Le métabolisme mitochondrial dans le mélanome

Dans certains cancers, la glycolyse exacerbée semble être liée aux mutations des enzymes du cycle de Krebs qui provoquent un dysfonctionnement mitochondrial (Boland M. et al., 2013). Cependant, dans le mélanome, une seule mutation a été décrite de nos jours. Cette mutation touche les isoformes 1 et 2 de la protéine IDH (et elle est rare), ne représentant que, quelques cas très précis (Lopez G. et al., 2010).

Les études réalisées par l'équipe de Scott ont permis de mieux comprendre le rôle de la mitochondrie dans le mélanome. Scott décrit que, bien que le mélanome est fortement glycolytique et présente une adaptation très forte à l'hypoxie, l'activité mitochondriale reste essentielle et le cycle de Krebs continue à fonctionner même en hypoxie (Scott D. et al., 2011). Ainsi, dans les cellules de mélanome, les mitochondries semblent jouer un rôle important au niveau de réactions anaplerotiques via l'utilisation de la glutamine. Les études réalisées par l'équipe de Filipp sur le profil métabolique du mélanome ont montré que la glutamine, dans ces cellules, peut rentrer dans le cycle de Krebs mais ne suit pas (ou peu) un processus classique de

glutaminolyse (transformation de la glutamine en lactate). Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de Metallo, qui a montré que les mélanomes présentent une faible activité de l'enzyme malique. Ainsi, dans les mélanomes, la glutamine va subir une transformation particulière qui implique la réversion des certaines réactions enzymatiques du cycle de Krebs, permettant ainsi la carboxylation reverse du oxoglutarate en isocitrate et, qui servira, par la suite à l'obtention du citrate, nécessaire à la synthèse des acides gras (Figure 13). L'inhibition des enzymes clés qui catalysent ces réactions, comme la IDH 2 ou la FAS (fatty acid synthase), provoque une diminution drastique de la synthèse des acides gras dans les cellules de mélanome et de leur prolifération (Filipp F. et al., 2011). L'ensemble des études réalisées par ces équipes a permis de montrer l'importance du rôle de la mitochondrie dans les réactions anaplérotiques.



(D'après Erika Pearce, 2013)

**Figure 13 : Les cellules de mélanome présentent une réversion du cycle de Krebs.** Les cellules normales différenciées métabolisent le glucose principalement via la phosphorylation oxydative, ce qui leur permet d'optimiser la consommation du glucose en fonction du rendement énergétique. Ces cellules captent très peu de glutamine. Au contraire, les cellules de mélanome métabolisent le glucose principalement via la glycolyse qui se trouve découplée de la phosphorylation oxydative, le produit final étant le lactate. De plus, ces cellules captent des quantités plus importantes de glutamine qui une fois transformée en  $\alpha$ -cétoglutarate rentre dans le cycle de Krebs et suit un processus de carboxylation reverse. Ainsi, la réversion de ce cycle favorise l'obtention du citrate qui est transporté dans le cytosol et permet la synthèse des lipides.

Concernant le métabolisme du glucose au niveau de la mitochondrie, peu des données sont disponibles. Toutefois, les résultats des analyses par métabolomique des différents groupes ont montré que dans le mélanome, il existe un découplage entre la glycolyse et phosphorylation oxydative (Scott D., 2011), suggérant que le glucose serait peu utilisé par la mitochondrie. Cependant, la raison pour laquelle les cellules de mélanome répriment l'oxydation du glucose dans la mitochondrie est encore mal comprise.

### **3 Les facteurs qui régulent le métabolisme dans le mélanome**

Il a donc été montré que, dans le mélanome, il existe un découplage entre la glycolyse et l'activité mitochondriale, qui reste tout de même réversible, permettant à ces cellules d'avoir une flexibilité métabolique très importante. Néanmoins, il n'existe pas un seul et unique profil métabolique pour toutes les cellules de mélanome. En effet, le profil métabolique est fortement influencé, voir déterminé, par les mutations présentes dans les cellules du mélanome au niveau des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs. Leur inhibition ou réactivation se traduit par une modification importante du métabolisme.

#### **3.1 La protéine JARID1B**

Une protéine qui semble jouer un rôle important dans le métabolisme du mélanome est la protéine JARID1B. Cette protéine fait partie de la famille des déméthylases Jumonji/ARID1 H3K4 et est caractéristique des cellules à potentiel souche ou « slow cycling cells ». L'équipe de Roesch a identifié deux populations au sein des cellules du mélanome, basées sur le taux d'expression de cette protéine. Ainsi, la forte expression de la protéine JARID1B est caractéristique d'une population se divisant plus lentement mais qui est aussi enrichie lors des traitements avec des agents pharmacologiques tels que la cisplatine et le vemurafenib. Cette protéine serait alors nécessaire pour la croissance en continu des cellules de mélanome, de même que pour la résistance aux anticancéreux. De plus, la protéine JARID1B semble aussi réguler le métabolisme car son expression est associée à une forte activité mitochondriale, caractérisée par une augmentation de la phosphorylation oxydative

associée à la production d'ATP et de ROS d'origine mitochondriales. Ainsi, ces cellules sont plus sensibles aux inhibiteurs de l'activité mitochondriale, tels que l'oligomycine A. La combinaison de ce dernier avec des agents comme la cisplatine ou le vemurafenib, peut prolonger de manière significative l'effet thérapeutique de ces médicaments car elle diminuerait la population surexprimant la protéine JARID1B (Roesch A. et al., 2013).

### **3.2 Le facteur HIF-1 alpha dans le mélanome**

Le facteur de transcription HIF-1 est l'un des régulateurs du métabolisme énergétique, le plus important dans le cancer. En condition physiologique, ce facteur, comme cité précédemment, est stabilisé uniquement en hypoxie et permet l'adaptation des cellules aux faibles concentrations d'oxygène, via la modification du métabolisme et de l'angiogénèse. En conditions pathologiques, le facteur HIF-1 est stabilisé de manière aberrante, soit par des mutations qui empêchent la dégradation de sa sous-unité alpha (dont l'expression dépend de la concentration d'oxygène), soit par l'activation des différents oncogènes, comme l'oncogène Myc (Kim J. et al., 2007). L'un des meilleurs exemples de la stabilisation de HIF-1, au-delà des cancers rénaux, est le mélanome. En effet, le mélanome est l'un des cancers qui présente le taux le plus élevé de HIF-1 en normoxie. La stabilisation de ce facteur peut passer par différents mécanismes, tels que l'expression aberrante de la protéine MAGE11, un antigène exprimé uniquement dans les tissus néoplasiques et qui inhibe la protéine PHD, impliquée dans la dégradation de HIF-1 (Aprelikova O. et al., 2009). Il a été montré également, que la mutation BRAFV600E (Kumar S.M. et al., 2007) ou la surexpression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 peuvent aussi favoriser la stabilisation de ce facteur en normoxie. De plus, il a été démontré dans les mélanocytes que les mutations au niveau de la protéine c-Kit (K642E et L576P, fréquemment trouvées dans certains mélanomes) ont besoin de la stabilisation du facteur HIF-1 pour pouvoir induire la transformation de ces cellules (Monsel G. et al., 2010).

Ainsi, ce facteur semble jouer un rôle clé dans l'initiation mais aussi dans la progression du mélanome car plusieurs études ont montré que la stabilisation de HIF-1 est plus importante dans les mélanomes métastatiques de haut grade (Michaylira C. et al., 2006). De même, l'expression élevée de HIF-1 est associée à un

mauvais pronostic et une faible réponse aux chimiothérapies. Le rôle de HIF-1 dans la régulation du métabolisme a été décrit surtout dans les glioblastomes. En effet, il a été montré que HIF-1 peut réguler l'expression de plus de treize protéines qui participent dans la glycolyse, comme la LDHA, régulant ainsi le métabolisme du glucose (Marín-Hernández A. et al., 2009). Dans ces modèles, HIF-1 favorise la glycolyse et diminue l'activité mitochondriale, surtout en ce qui concerne l'utilisation du glucose. Ces résultats suggéraient ainsi que HIF-1, constitutivement exprimé dans le mélanome, pourrait jouer un rôle dans la régulation du métabolisme dans ces cellules. Cependant, jusqu'en 2011, le rôle de HIF-1 dans la régulation du métabolisme du mélanome avait été peu décrit et restait à déterminer.

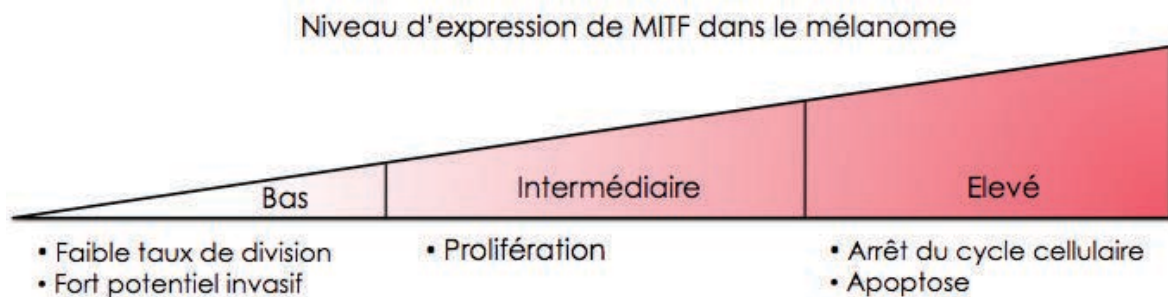
### 3.3 Le facteur MITF dans le mélanome

Le facteur MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor) est l'un des facteurs clés de la régulation de la prolifération cellulaire en contrôlant la progression dans le cycle cellulaire via les protéines CDK2 et p16 (Koludrovic D. et al., 2013). Il existe plusieurs isoformes de ce facteur qui sont exprimées de manière tissu dépendant. Les mélanocytes expriment l'isoforme M de MITF, qui joue un rôle clé dans la régulation de leur développement ainsi que dans la régulation de la production de mélanine, via l'hormone MSH- $\alpha$  (Roydon Price E. et al., 1998) (Figure 14). Le facteur MITF est considéré comme l'un des marqueurs le plus important du phénotype prolifératif. Ainsi, ce facteur est fortement exprimé dans les cellules en prolifération et presque indétectable dans les cellules non-prolifératives ou quiescentes (Hoek K. et al., 2008).

Dans le cadre du mélanome, on trouve très rarement des mutations au niveau de MITF. Ainsi, seulement 10% des mélanomes présentent des mutations ou amplifications de ce gène (Garraway L. et al., 2005b). De plus, l'expression constitutive de MITF, induite par les mutations qui touchent son domaine régulateur, pourrait être associée à un phénotype métabolique fortement glycolitique, via l'activation du facteur HIF-1 (Buscà R. et al., 2006). Bien que les mutations de MITF soient rares, ce facteur joue un rôle clé dans le développement du mélanome, non par des modifications de son activité, mais par la régulation de son expression dans les différents stades de la progression tumorale. En effet, les premières données



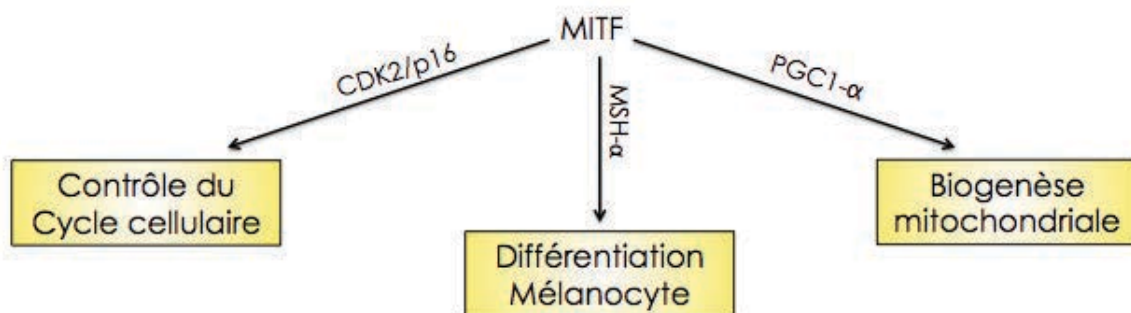
apparues dans la littérature sur le rôle de MITF dans le mélanome étaient contradictoires. Pour certains auteurs, MITF jouait un rôle de gène suppresseur de tumeur qui se trouvait sous-exprimé dans le mélanome (Vachtenheim J. et al., 2001), alors que pour d'autres auteurs, MITF était plutôt un oncogène qui favorise la prolifération des cellules de mélanome (Garraway L. et al., 2005a). Ces sont les études réalisées par l'équipe de Gray-Schopfer qui ont permis de mieux comprendre le rôle de MITF dans le mélanome. En effet, MITF peut jouer des rôles différents selon son niveau d'expression. Ainsi, de faibles taux sont associés aux cellules quiescentes et à potentiel invasif. Les taux trop élevés de cette protéine provoquent l'arrêt du cycle cellulaire et, dans certains cas, l'apoptose, alors que des niveaux intermédiaires favorisent la prolifération (Gray-Schopfer V. et al., 2007). La régulation de MITF semble donc jouer un rôle très important dans la progression des différentes étapes de la tumorigénèse (Figure 14).



**Figure 14: Le rôle de MITF dans le métabolisme et développement du mélanome :** Le facteur MITF peut réguler différents processus cellulaires dans les cellules de mélanome en fonction de son taux d'expression. Un faible taux d'expression de ce facteur est associé à une faible division cellulaire et une augmentation du potentiel invasif. Un taux intermédiaire favorise plutôt la prolifération alors qu'un taux élevée va induire un arrêt du cycle cellulaire et peut même induire la mort de la cellule par apoptose.

Récemment, l'équipe de Vazquez a montré que le facteur MITF peut réguler le métabolisme énergétique dans le mélanome via la protéine PGC1-alpha. Cette dernière est un coactivateur transcriptionnel capable d'interagir avec divers facteurs de transcription et de moduler ainsi leur activité (Vazquez F. et al., 2013). De plus, PGC1-alpha joue un rôle très important dans la régulation de la biogenèse mitochondriale, via son interaction avec le facteur PPAR $\gamma$  (Puigserver P., 2005). Ainsi, selon cette étude, les mélanomes peuvent être classés en deux groupes selon

l'expression du facteur MITF. Un premier groupe (10% de mélanomes) comprendrait les mélanomes avec une forte expression de MITF et donc de PGC1-alpha, qui présentent une dépendance très importante au métabolisme oxydatif mitochondrial (Figure 14). Le deuxième groupe, comprendrait les mélanomes n'exprimant pas ou peu le facteur MITF et par conséquent PGC1-alpha. Ils se caractérisent donc par une faible différenciation et un métabolisme fortement glycolytique (Vazquez F. et al., 2013). Cependant, ces deux groupes ne seraient pas stables et l'expression de MITF pourrait donc varier selon les différents stades de progression. Ainsi, certains mélanomes peuvent passer d'une forte expression de MITF à une très faible expression, et inversement, lors de la progression de la maladie.



**Figure 15: Le rôle de MITF dans le métabolisme et développement du mélanome :** Le facteur MITF peut réguler différents processus cellulaires dans les mélanocytes, comme la progression dans les cycles cellulaires, via l'expression des protéines comme CDK2 et p16. Ce facteur joue également un rôle très important dans la différenciation de ces cellules. MITF est activé lors de l'interaction de l'hormone MSH $\alpha$  avec son récepteur sur la surface des mélanocytes activant une cascade qui induit l'expression des protéines permettant leur différenciation. De même, MITF participe à la biogenèse mitochondriale via la régulation de la protéine PGC1 $\alpha$ . Celle-ci en interagissant avec les facteurs de transcription PPAR $\gamma$  favorise l'expression des protéines impliquées dans ce processus

### 3.4 L'oncogène BRAF dans le mélanome

La protéine BRAF est une kinase qui appartient à la voie de MAPK (mitogen-activated protein kinase). La voie MAPK est constituée de RAS-RAF-MEK-ERK. Elle est activée en cascade par phosphorylation, lors de l'interaction entre les facteurs de croissance et leurs ligands au niveau membranaire. L'activation de cette voie aboutit à la phosphorylation et l'activation d'ERK, permettant sa translocation dans le noyau et l'activation de l'expression des différents gènes participant à la prolifération et à la survie cellulaire. Plus de 50% des mélanomes présentent une mutation au niveau de

la protéine BRAF. La mutation la plus fréquente est celle qui touche la valine 600, provoquant son remplacement par un glutamate (BRAFFV600E) et qui représente 90% des mutations BRAF (Davies H. et al., 2002). Cette mutation confère à la kinase BRAFFV600E une activation constitutive, c'est à dire indépendante de l'activation par RAS.

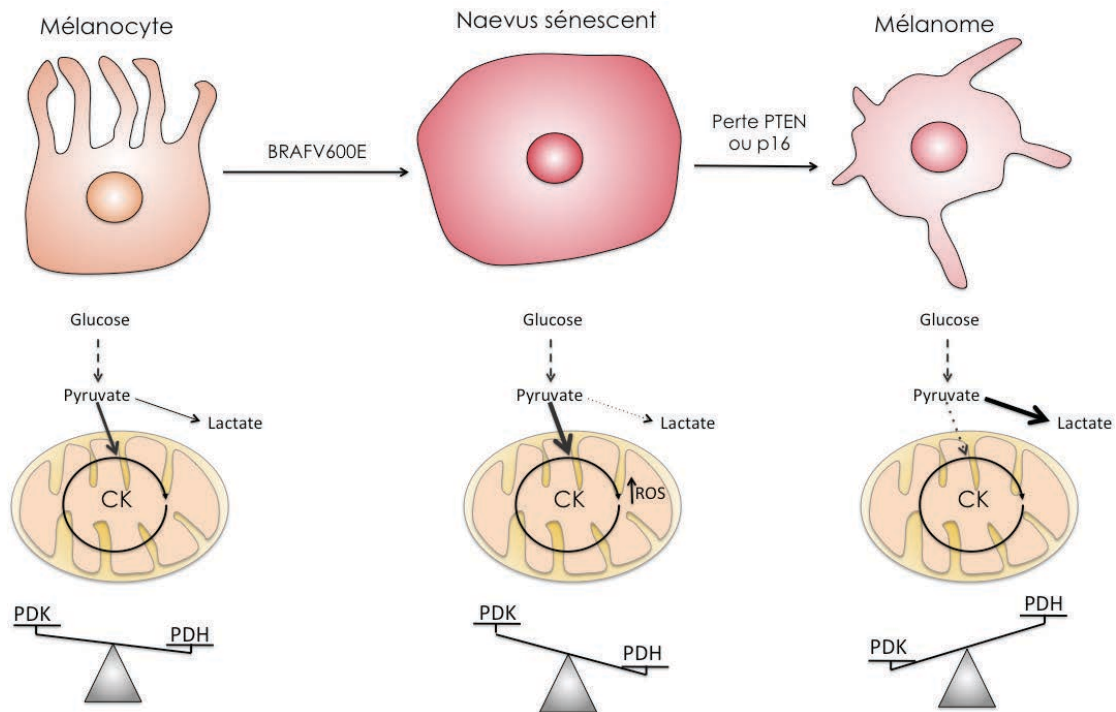
### 3.4.1 Effet métabolique de BRAF au cours de la tumorigenèse

Curieusement, la plupart des lésions cutanées ou naevi présentent la mutation BRAF mais, seulement quelques-unes de ces lésions, seront à l'origine d'un mélanome (Kumar R., 2004). Ainsi, durant un certain temps, ces résultats ont même remis en question le rôle de la mutation BRAF dans la tumorigenèse. Cependant, son rôle a été largement confirmé car l'inhibition de cette mutation provoque un arrêt massif de la prolifération dans les cellules de mélanome (Tsai J. et al., 2008). Cette mutation semble donc importante pour l'initiation tumorale mais pas suffisante.

Ainsi, en 2005 l'équipe de Michaloglou, montrait, pour la première fois, que la mutation BRAFFV600E avait un effet paradoxal sur les naevi. En effet, les naevi présentant la mutation BRAFFV600E expriment tous les marqueurs associés à la sénescence, tels que la SA- $\beta$ -gal ainsi que certaines cytokines et chemokines, ce que l'on connaît aujourd'hui sous le nom de « Oncogen Induced Senescence » (Michaloglou C. et al., 2005). La mutation BRAFFV600E induit donc la sénescence et une deuxième altération génétique serait nécessaire pour la surmonter. Plusieurs équipes ont donc montré que ces altérations pouvaient être très diverses. Le meilleur exemple est l'inactivation du gène suppresseur de tumeur, PTEN (Vredevelde L. et al., 2012) ou encore de la protéine p16 (Sharpless E. et al., 2003), toutes les deux impliquées dans la régulation de la prolifération (Figure 15).

De plus, la sénescence induite par la mutation BRAFFV600E s'accompagne d'un profil métabolique particulier, qui se caractérise par une activité mitochondriale élevée. En effet, la PDH est très active et peu phosphorylée dans le naevus portant la mutation BRAFFV600E et, en concordance, la PDK1 se trouve fortement diminuée. Lorsque les naevi arrivent à surmonter la sénescence induite par cet oncogène, le profil métabolique change et l'on observe alors une forte phosphorylation de la PDH et une surexpression de la PDK1, provoquant une diminution de l'activité mitochondriale

(Kaplon J. et al., 2013) (Figure 15). De plus, l'inhibition de la PDK1 dans les cellules transformées provoque un arrêt de la prolifération. Ces résultats montrent que l'initiation et la progression tumorales, associées à la mutation BRAFV600E, sont accompagnées d'une modification du métabolisme qui semble nécessaire pour surmonter la sénescence.



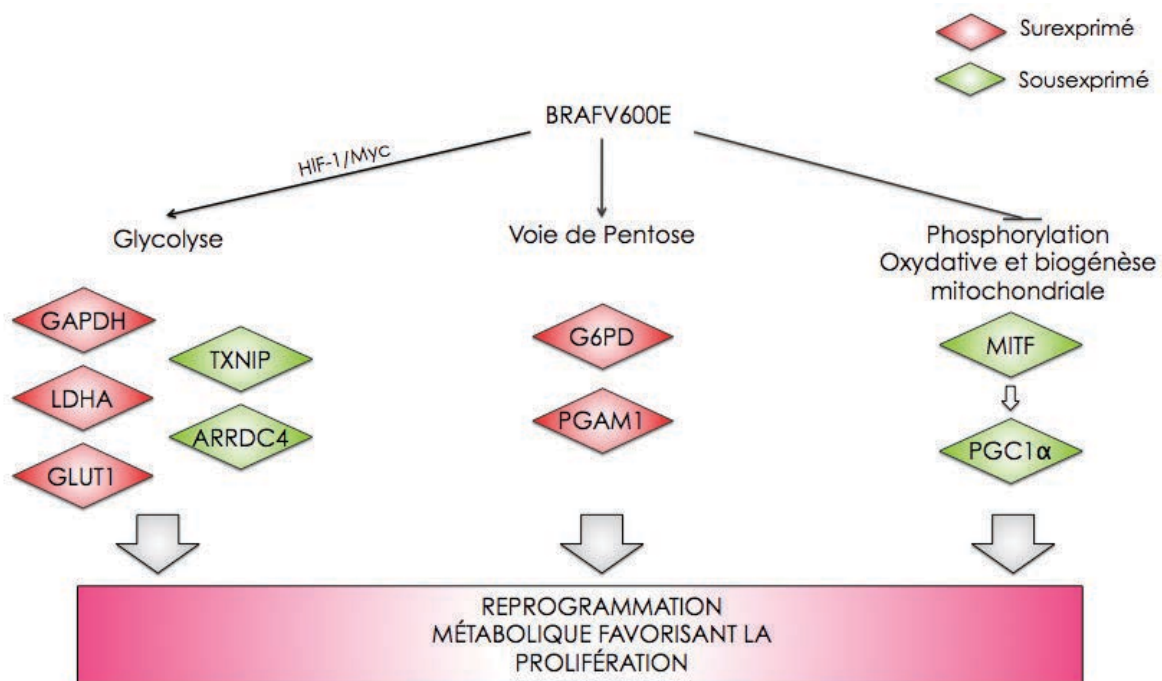
**Figure 16 : Le rôle de BRAF dans la OIS (oncogène induced senescence):** L'apparition de la mutation BRAF induit dans les mélanocytes une sénescence précoce, présentant, ainsi, tous les marqueurs associés à ce phénotype. En termes métaboliques, ces cellules semblent se caractériser par une forte activité mitochondriale associée à la modification de l'expression des protéines qui régulent l'utilisation du pyruvate dans la mitochondrie. Ces cellules présentent ainsi une faible activité de la PDK et une forte activité de la PDH. Cependant, lorsqu'une nouvelle mutation arrive, touchant un gène suppresseur de tumeur comme PTEN ou p16, les mélanocytes surmontent la sénescence et se transforment en cellules tumorales. Ces cellules présentent un nouveau profil métabolique où la glycolyse a pris le dessus sur la phosphorylation oxydative (effet Warburg). Ce nouveau profil s'accompagne d'une inversion dans l'activité des enzymes précédemment citées, où la PDK (pyruvate déshydrogénase kinase) est surexprimé et la PDH (pyruvate déshydrogénase) est faiblement active.

### 3.4.2 BRAF et son rôle dans la glycolyse

En 2013, l'équipe de Hall a montré pour la première fois le rôle de la mutation BRAFV600E au niveau de la glycolyse. En effet, cette mutation favorise plutôt l'activation de la voie glycolytique, via l'augmentation de l'expression des enzymes qui participent à la glycolyse et la voie des pentose phosphates tels que la G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase), la GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase), la PGAM1 (phospho-glyceromutase) et la LDHA (Hall A., et al. 2013). Cependant, la mutation BRAFV600E régulerait la voie glycolytique via un réseau d'autres facteurs, dont le rôle dans la régulation du métabolisme a déjà été établi (comme HIF-1, Myc et MondoA). Dans ce contexte HIF-1 et Myc favorisent l'activation de toute une batterie de gènes codants pour les protéines qui participent au niveau de la voie glycolytique, comme cela a été déjà décrit auparavant. En revanche, le facteur MondoA est un inhibiteur négatif de la consommation du glucose (Figure 16). Il est donc réprimé par BRAFV600E, non pas en terme d'expression, mais en terme d'activation de ces gènes cibles tels que TXNIP (thioredoxin-interacting protein) et ARRDC4 (Arrestin domain-containing 4). L'inhibition de la mutation BRAFV600E se traduit donc par une diminution de l'expression de HIF-1 et Myc et par une augmentation de celle de MondoA (Parmenter T.J. et al., 2014).

### 3.4.3 BRAF et son rôle dans le métabolisme mitochondrial

Il a été récemment décrit que la mutation BRAFV600E peut également réguler le métabolisme mitochondrial. En effet, BRAFV600E est capable d'inhiber la protéine MITF impliquée dans la régulation de l'activité mitochondriale. MITF régule ainsi la biogénèse mitochondriale et la phosphorylation oxydative via l'expression de la protéine PGC1-alpha (Figure 16). L'inhibition du mutant BRAF provoque ainsi la réactivation de la voie MITF/PGC1alpha qui induit, par la suite, une reprogrammation et adaptation métaboliques, rendant les cellules de mélanome dépendantes à la phosphorylation oxydative et résistantes à l'inhibition de la mutation BRAF (Haq R. et al., 2013). De plus, les mélanomes ne pouvant pas exprimer PGC1 alpha seront donc plus sensibles à l'inhibition de ce mutant. Ainsi, la mutation BRAF semble jouer un rôle clé dans la régulation du métabolisme. La reprogrammation métabolique induite par cet oncogène permettrait probablement de surmonter la sénescence ainsi que de subvenir aux besoins prolifératifs.



**Figure 17 : BRAFV600E dans la reprogrammation du métabolisme dans le mélanome.** L'oncogène BRAFV600E est fortement impliqué dans la régulation du métabolisme du mélanome. Il favorise la glycolyse, via l'expression des protéines clés participant dans ce processus. Il peut donc favoriser l'expression des enzymes glycolytiques de manière directe ou à travers les facteurs de transcription HIF-1 et MYC dont le rôle dans la régulation de la glycolyse est bien connu. De même, ce facteur diminue l'expression des régulateurs négatifs du métabolisme du glucose, via l'inhibition du facteur MondoA. BRAFV600E peut également réguler la phosphorylation oxydative en inhibant la voie de MITF/PGC1 $\alpha$  importante dans le fonctionnement et biogénèse mitochondriales. Au delà de ces deux voies métaboliques, cette kinase peut aussi augmenter l'expression des enzymes de la voie des pentose phosphates phosphates (PPP) dont la G6PD (Glucose-6-Phosphate déshydrogénase) qui permet la bifurcation du glucose vers cette voie. L'ensemble de ces modifications permet à la cellule tumorale de survivre et proliférer, même en conditions très hostiles.

#### 3.4.4 Les effets métaboliques des inhibiteurs de BRAFV600E

L'incidence de la mutation BRAFV600E dans le mélanome fait de cette kinase une cible thérapeutique très importante. Ainsi, des inhibiteurs de BRAFV600E ont rapidement été développés, le premier d'entre eux étant le vémurafenib. Les phases d'essai clinique du vémurafenib ont donné des résultats très encourageants et son introduction en clinique a été réalisée en 2011 (Chapman P. et al., 2011). Le vémurafenib permet d'augmenter la survie chez les patients de 4 à 6 mois, par rapport à la dacarbazine, la chimiothérapie de référence dans le mélanome. Lors de son introduction en clinique, le vémurafenib avait été caractérisé comme une molécule capable d'induire l'apoptose des cellules de mélanome, suite à l'inhibition de la voie MAPK. Cependant, les études réalisées sur le vémurafenib ont montré que



l'un de premiers effets de l'introduction de cette molécule était la diminution de la captation du glucose, non seulement *in vitro* mais aussi chez les patients, observée lors de la TEP (Baudy A. et al., 2012). Ce sont ces résultats sur l'effet du vémurafenib au niveau du métabolisme du glucose, qui ont permis de déterminer tous les rôles que l'on connaît aujourd'hui de la mutation BRAFV600E dans la régulation du métabolisme. Ainsi, le vémurafenib induit dans les cellules de mélanome l'inhibition de la glycolyse et une augmentation de l'activité mitochondriale, rendant les cellules dépendantes à la phosphorylation oxydative (Haq R. et al., 2013).

Bien que le vémurafenib et d'autres inhibiteurs comme le dabrafenib ont donné des résultats prometteurs, la plupart des patients deviennent résistants seulement quelques mois après le début du traitement. Ainsi, la résistance à ces inhibiteurs, représente actuellement un problème majeur en clinique. De plus, les mécanismes de résistance au vémurafenib sont très divers et semblent dépendre du contexte.

## **4 La régulation métabolique de l'état redox dans le mélanome**

### **4.1 Les sources de ROS dans le mélanome**

#### **4.1.1 L'importance des mélanosomes dans le stress oxydant**

Les mélanocytes sont les cellules responsables de la production de la mélanine, un pigment qui sert à protéger le revêtement cutané des agressions des rayons UV A-B. Cependant, certaines étapes de la synthèse de mélanine dans ces cellules sont accompagnées de réactions d'oxydation, ce qui provoque la production et l'accumulation de ROS (Koga S., 1992). Les mélanocytes produisent deux types de mélanine : la eumélanine et la pheomélanine. D'un côté, l'eumélanine est la forme plus abondante au niveau des mélanocytes et, bien que sa synthèse induise la production de ROS, cette molécule est surtout associée au rôle antioxydant de la mélanine. D'un autre côté, pheomélanine pour être synthétisée a besoin des réactions supplémentaires qui provoquent une production de ROS encore plus élevée par rapport à l'eumélanine (Simon J. et al., 2009). De plus, la pheomélanine, lors des interactions avec les rayons UV, semble jouer un rôle plus pro-oxydant qu'antioxydant (Figure 17).

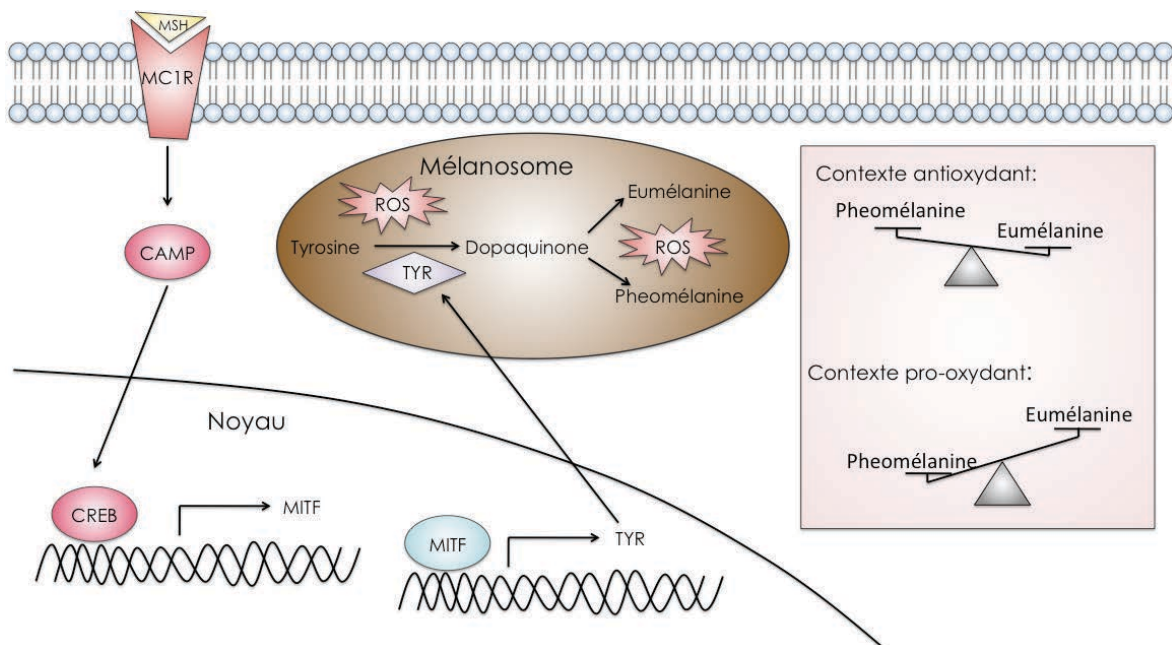
Bien que la production de mélanine soit confinée au niveau de mélanosomes, les mélanocytes présentent un stress oxydant de base plus élevé que d'autres cellules non pigmentées, caractérisé par une augmentation de la 8-oxo-guanine (Mouret S. et al., 2012). Cette dernière est le résultat de l'oxydation des bases guanines au niveau de l'ADN et caractérise le stress oxydant subi par la cellule. Pour faire face au stress oxydant, les mélanocytes augmentent leurs mécanismes de détoxification de ROS. Un des facteurs régulant ce processus est le facteur MITF qui augmente l'expression des enzymes responsables de la réparation de l'ADN, comme l'enzyme APE-1/Ref-1 (Figure 17) (Liu F. et al., 2009). De manière similaire, la mélanocortine ( $\alpha$ -MSH), synthétisée par les keratinocytes et mélanocytes, permet d'induire l'expression de la catalase, qui participe à la détoxification de ROS (Maresca V. et al., 2008). De plus, la  $\alpha$ -MSH lors de son interaction avec le récepteur MC1R, induit dans la cellule une modification globale en terme d'expression de gènes favorisant ainsi la détoxification de ROS (Kadekaro A.L. et al., 2010). Cette hormone est également associée à l'expression du facteur NRF2 dans les mélanocytes (Kokot A. et al., 2009).

L'accumulation des ROS et des dommages à l'ADN particuliers des mélanocytes pourrait donc jouer un rôle important dans la mélanomagenèse. En effet, il y a de plus en plus d'indices qui soutiennent cette hypothèse car les étapes d'initiation et de progression du mélanome se caractérisent, elles aussi, par un taux très élevé de ROS (Denat L. et al., 2014). De plus, les antioxydants, comme la N-acetyl-cystéine peuvent non seulement prévenir le stress oxydant induit par les rayons UV mais aussi retarder le développement des tumeurs chez la souris (Cotter M.A. et al., 2007). Certains auteurs pensent même que les mutations caractéristiques du mélanome, telles que les mutations au niveau de la kinase BRAF ou RAS, pourraient être la conséquence du stress oxydant présent dans les mélanocytes. Ceci est associé au fait que les ROS induisent une forte quantité des dommages à l'ADN et plus de 20 000 paires de bases sont réparées par jour. Certaines de ces bases seront substituées, plus fréquemment que d'autres, en raison d'un taux élevé de réparation erronée et touchent des gènes clés qui favorisent le développement des tumeurs (Jackson A. et al., 2001).

En outre, des modifications, au niveau de la synthèse de la mélanine, peuvent également être associées au développement du mélanome. En effet, les naevi, précurseurs du mélanome, présentent un taux élevé de ROS, associé à une



augmentation de la production de phéomélanine et des dommages à l'ADN (Pavel S. et al., 2004). Il a été montré dans un modèle de souris exprimant la mutation BRAFV600E que l'augmentation de la production de phéomélanine, dans ce contexte génétique, est suffisante pour induire le développement du mélanome (Mitra D. et al., 2012). Ainsi, le déséquilibre entre la production d'eumélanine et phéomélanine, en faveur de cette dernière, augmente la vulnérabilité des mélanocytes au stress oxydant et représente un risque pour le développement du mélanome. (Figure 17)



**Figure 18: Le stress oxydant dans le contexte des mélanocytes.** Les mélanocytes sont responsables de la protection face aux agressions induites par l'exposition aux rayons UV. Lors de l'exposition à ces rayons, l'hormone MSH $\alpha$  va se fixer sur le récepteur (MC1R) présent dans la membrane des mélanocytes. L'interaction entre l'hormone MSH $\alpha$  et son récepteur stimule la production de mélanine, un pigment qui permet de réguler le stress oxydant induit par les rayons UV. Ainsi, l'activation du récepteur provoque une augmentation de la production de cAMP, activant la protéine CREB (C-AMP Response Element-binding protein). Cette protéine va, par la suite, favoriser l'expression de MITF qui va induire l'expression des enzymes participant à la production de mélanine comme la Tyrosinase (TYR). La mélanine produite peut être de deux types l'eumélanine, qui a un rôle plutôt antioxydant, ou la phéomélanine qui a un rôle pro-oxydant. De plus, la production de cette dernière implique aussi la formation de ROS. Dans ce contexte, les mélanocytes sont soumis en permanence à un stress oxydant important. Ainsi, une production exacerbée de phéomélanine peut incrémenter le stress oxydant et favoriser le développement du mélanome via des dommages à l'ADN.

#### 4.1.2 Autres sources de ROS dans le mélanome

Les mélanomes font partie des cancers présentant un niveau de stress oxydant très élevé. Cependant, l'accumulation de ROS dans les mélanomes ne provient pas uniquement du contexte cellulaire. En effet, le taux élevé de ROS dans le mélanome peut également être lié à l'activation de certaines voies de signalisation, la

modification du métabolisme ou l'expression aberrante de certaines protéines. Le rôle de la mitochondrie dans la production de ROS dans le mélanome est encore mal compris. Peu d'études ont établi un lien direct, scientifiquement prouvé. Certains auteurs suggèrent que l'implication de la mitochondrie dans la production de ROS, dans le mélanome, pourrait être associée aux modifications métaboliques induites par l'activation des oncogènes (Liu-Smith F. et al., 2014). Cependant, ceci reste encore une hypothèse qui nécessite d'être encore mieux étudié.

D'autres sources importantes de ROS dans le mélanome qui ont été mieux évaluées que la mitochondrie sont les NADPH oxydases (NOX). Ces enzymes utilisent l'oxygène comme substrat pour produire de l'anion superoxyde et ceci représente un mécanisme de défense face aux agressions extérieures. Ces enzymes se trouvent surexprimés dans le mélanome suite à l'activation des oncogènes comme par exemple AKT, souvent activée dans les mélanomes, dû à la perte de PTEN (Govindarajan B. et al., 2007). Dans le mélanome, la surexpression de NOX1 favorise l'expression des metalloprotéases qui vont conduire vers la transition épithélium-mésenchyme et donc la métastase (Liu F. et al., 2012). De même, l'expression de NOX4 est aussi associée au phénotype invasif et elle est souvent retrouvée dans les mélanomes métastatiques fortement agressifs (Liu G.S. et al., 2012).

## 4.2 La régulation de la production de ROS dans le mélanome

### ◆ Les facteurs FOXM1 et NRF2

Comme les autres cellules cancéreuses, les cellules de mélanome mettent en œuvre plusieurs systèmes de détoxification afin de garder leur stress oxydant à des niveaux compatibles avec la survie. Deux facteurs ont été décrits comme étant capables de réguler l'élimination de ROS dans les cellules de mélanome : le facteur FOXM1 et le facteur NRF2. Le facteur FOXM1 favorise l'expression de la SOD mitochondriale dans le but d'empêcher la sénescence induite par la production de ROS (Kops G.J. et al., 2002), il semble ainsi avoir un rôle important dans la sénescence induite par BRAFV600E (de Keizer P.L. et al., 2010). En ce qui concerne le facteur NRF2, certains mélanomes, comme les mélanomes acrolentigineux présentent des mutations au niveau de la protéine KEAP1. Cette protéine participe à la régulation de ce facteur en

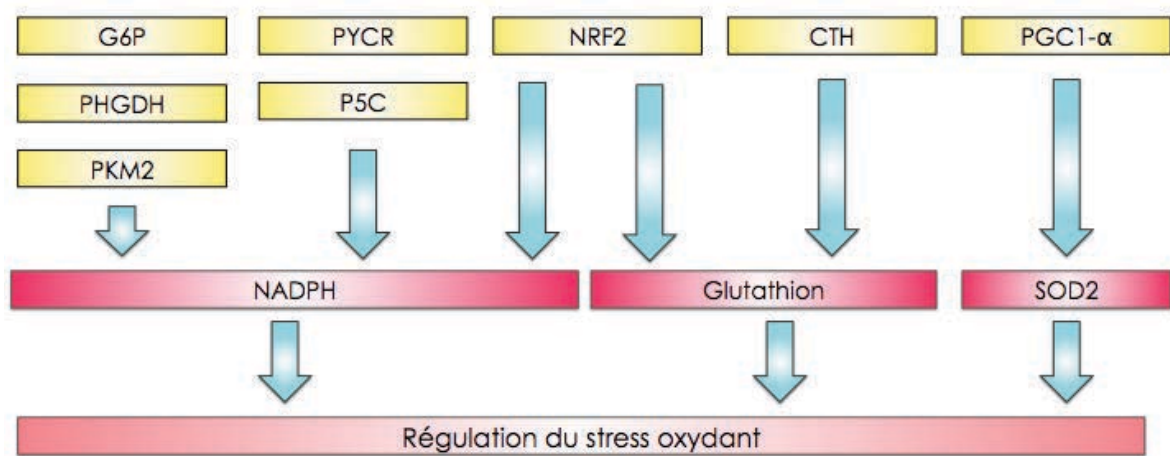
le séquestrant dans le cytoplasme. La mutation décrite au niveau de la protéine KEAP1 touche le domaine DGR/Kelch, nécessaire pour son interaction avec NRF2, qui reste donc constitutivement actif (Miura S. et al., 2014). Le facteur NRF2, peut donc se transloquer au noyau, où il permettra l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant. L'expression constitutive de ce facteur a déjà été associée dans d'autres cancers à une résistance aux inducteurs de ROS, tels que les dérivés du platine ou la dacarbazine, des molécules utilisées dans le traitement du mélanome.

#### ◆ **Le métabolisme dans la régulation de ROS dans le mélanome**

Certaines voies métaboliques pourraient également participer à la régulation du stress oxydant dans le mélanome. Par exemple la plupart des mélanomes expriment la protéine PKM2 qui permet la bifurcation des intermédiaires glycolytiques vers la voie de pentoses phosphates et favorise l'obtention du NADPH. De même, la voie de la sérine semble très importante dans le mélanome car 40% des mélanomes présentent une amplification de la première enzyme de cette voie la PHGDH. Ainsi, l'importance de cette voie pourrait être liée directement à la production de NADPH, le cofacteur important pour la régénération du glutathion (Figure 18).

Une autre voie métabolique beaucoup moins étudiée est celle de la proline. La synthèse de la proline est très dépendante de l'incorporation de glutamine et les enzymes participant dans cette voie (PYCR1 ou la P5C) sont souvent surexprimées dans les mélanomes (Figure 18). Cette voie participe à la régulation de l'état redox, via la production de NADPH (Filipp V. et al., 2012). De même, autre protéine qui joue un rôle important dans l'adaptation du mélanome au stress oxydant est la cystathionase (CTH), qui permet la synthèse *de novo* de la cystéine, très importante pour la synthèse du glutathion et donc pour la défense de la cellule face au stress oxydant (Figure 18). De plus, cette protéine semble jouer un rôle indispensable pour surmonter la sénescence lors de l'activation de MYC dans les mélanocytes, favorisant la transformation (Leikam C. et al., 2014). L'expression du facteur PGC1-alpha, impliqué dans la régulation du métabolisme du mélanome, peut également jouer un rôle protecteur face au stress oxydant, via l'expression de la SOD2 ainsi que des enzymes qui participent dans la synthèse du glutathion (Figure 18) (Vazquez F. et al., 2013).

Il est important de préciser que les études réalisées par l'équipe de Scott ont montré que, dans la plupart des mélanomes, les mitochondries sont fonctionnelles. Cependant, les mélanomes présentent souvent une répression de l'oxydation du glucose et peu d'études ont évalué la possibilité que la répression de l'oxydation du glucose, dans les cellules de mélanome, puisse représenter un mécanisme par lequel ces cellules régulent la production de ROS mitochondriaux. Ainsi, le lien entre la production de ROS et l'activité mitochondriale dans le mélanome reste encore à être démontré.



**Figure 19 : La régulation du stress oxydant dans le mélanome.** De manière semblable aux autres types de cancers, les cellules de mélanome mettent en place plusieurs mécanismes pour éliminer les ROS et empêcher l'induction de la mort. Le métabolisme dans ces cellules contribue de manière importante à la lutte face aux ROS, via la production du pouvoir réducteur sous la forme de NADPH. Ainsi, dans ces cellules, l'expression de la PKM2 provoque une accumulation des intermédiaires glycolytiques qui peuvent basculer vers la voie de PPP ou vers la voie de la serine, les deux menant à la production de NADPH. De même, dans le mélanome, il a été observé que la glutamine, via sa bifurcation vers la voie de la proline, peut participer à l'obtention de ce pouvoir réducteur. Le facteur NRF2, quand à lui, a un rôle beaucoup plus large dans le mélanome car il favorise les voies qui mènent vers la production du NADPH mais aussi celles qui permettent l'obtention des substrats nécessaires à la synthèse de glutathion. Ce facteur est aidé par la cysthationase (CTH) impliqué dans la synthèse de la cystéine. D'autres facteurs comme PGC1 $\alpha$  moins souvent exprimés dans le mélanome, peuvent également participer à la régulation du stress oxydant, via la régulation transcriptionnelle des enzymes antioxydantes.

## 5 Le stress oxydant comme cible thérapeutique dans le mélanome

### 5.1 L'approche thérapeutique pro-oxydant:

Depuis longtemps, plusieurs équipes cherchent à exploiter le stress oxydant dans les cellules cancéreuses, dans le but de les éradiquer de manière spécifique. Ainsi deux manières de cibler le stress oxydant dans les cellules cancéreuses sont possibles. Une première approche consiste à augmenter les défenses antioxydantes, dans le but de diminuer les ROS et empêcher la cellule tumorale d'obtenir un bénéfice de ceux-ci. Etant donné que les ROS sont associés à la mutagénèse, qui pourrait favoriser l'initiation et progression tumorale, la diminution de ces derniers, en utilisant des agents antioxydants, devrait permettre de diminuer cet effet. Cependant, selon certains auteurs, l'approche antioxydante serait uniquement préventive et n'aurait aucun effet, une fois la tumeur établie (Klein E. et al., 2011). De plus, les approches antioxydantes utilisées jusqu'aujourd'hui, comme le sélénium, semblent avoir un effet plutôt pro-tumorigène, car les cellules tumorales pourraient utiliser les agents antioxydants pour éliminer leur surcharge en ROS (Omenn G. et al., 1996).

Une deuxième approche cherche plutôt à augmenter la production de ROS dans les cellules tumorales afin de surpasser leurs défenses antioxydantes et déclencher ainsi la mort cellulaire. En effet, dans les cellules tumorales le taux élevé de ROS est compensé par l'augmentation des défenses antioxydantes. Cependant, dans ces cellules, on trouve un équilibre très précaire entre la production et détoxification de ROS, car la plupart des systèmes de détoxification sont à saturation. Dans ce contexte, l'utilisation d'agents pro-oxydants pour augmenter la production de ROS devrait permettre d'induire un stress oxydant trop important pour la cellule, qui dépasserait alors ses défenses antioxydantes et la conduirait vers la mort (Gorrini C. et al., 2013). Ces agents pro-oxydants n'auraient pas ou peu d'effets sur les cellules normales car elles présentent un taux très faible de ROS, très loin du seuil létal. Ainsi, leur système de détoxification n'étant pas saturé ces cellules peuvent faire face à la production de ROS induite par les agents pro-oxydants.

## 5.2 Exemples des molécules pro-oxydants

La piperlongumine, un composé dérivé du piment, capable d'induire la production de ROS dans les cellules tumorales a récemment attiré l'attention dans le traitement du cancer. Une partie du mécanisme de la piperlongumine reposerait sur la régulation de la GST-P1, une enzyme qui participe dans le métabolisme du glutathion (Raj L. et al., 2011). Cependant, l'efficacité de la piperlongumine dans les cellules de mélanome dépendrait du taux d'expression de la protéine PGC1-alpha. En effet, l'expression de PGC1-alpha conduit à une augmentation des défenses antioxydantes, provoquant ainsi la diminution de l'effet de la piperlongumine (Vazquez F. et al., 2013).

D'autres molécules ciblant spécifiquement le stress oxydant dans les cellules tumorales ont été également développées. C'est le cas de l'elesclomol, la première molécule développée pour cibler le stress oxydant d'origine mitochondriale. Cette molécule est capable de perturber le flux d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et d'induire la production de ROS mitochondriaux (Blackman R. et al., 2012). De plus, le stress oxydant induit par l'elesclomol, provoque une chute du potentiel de membrane mitochondriale et la mort de la cellule par apoptose (Kirshner J. et al., 2008). Cette molécule a été testée lors de plusieurs essais cliniques dans le mélanome. Cependant, il a été montré que l'efficacité de l'elesclomol est associée au taux de LDH-A chez les patients de mélanome. Ainsi, les patients présentant un taux élevé de LDHA sérique, caractéristique des tumeurs fortement glycolytiques, ne répondent pas au traitement (Blackman R., 2012). L'efficacité de l'elesclomol dépend donc de l'état d'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ceci limite donc son utilisation en clinique, car la plupart des patients atteints d'un mélanome présentent un phénotype métabolique plutôt glycolytique. Ces résultats révèlent l'importance de l'état du métabolisme mitochondrial dans l'effet de ces types d'agents pro-oxydants dans le traitement du mélanome et d'autres cancers.

## PROBLEMATIQUE

Le mélanome se caractérise par une reprogrammation métabolique décrite sous le nom d'effet Warburg. Cette reprogrammation a attiré énormément d'attention car il s'agit d'une caractéristique particulière des cellules tumorales, exploitée pour le diagnostic/le suivi des mélanomes et pourrait être exploitée pour déterminer des nouveaux traitements. La plupart des études se sont surtout intéressées à la glycolyse comme cible thérapeutique favorisant le développement des plusieurs molécules dans le but d'inhiber ce processus. Bien que la glycolyse semble être une cible thérapeutique importante les résultats des essais cliniques avec des molécules ciblant cette voie n'ont pas été très encourageants. Il semble ainsi que les cellules tumorales présentent une forte flexibilité métabolique leur permettant de s'adapter aux conditions de stress. Les travaux réalisés dans d'autres cancers ont soulevé l'importance de l'activité mitochondriale. Ainsi, l'importance du métabolisme mitochondriale dans le mélanome a été mise en évidence par l'équipe de Scott et Filipp, surtout en ce qui concerne l'utilisation de la glutamine via les réactions anapérotyques qui permettent l'obtention des substrats nécessaires à la prolifération.

Cependant, le rôle de la phosphorylation oxydative mitochondriale dans le métabolisme des mélanomes a été beaucoup moins étudié. Quelle est l'activité de la phosphorylation oxydative des mélanomes? Est-elle réprimée? Quels sont les facteurs impliqués dans cette répression? Peut-on lever cette répression? En constatant l'expression importante de HIF-1 $\alpha$  dans les mélanomes et son rôle prépondérant dans le contrôle du métabolisme, nous avons émis l'hypothèse que ce facteur de transcription pourrait limiter le fonctionnement des mitochondries. Nous avons tout d'abord évalué l'expression de HIF-1 dans des mélanomes en condition de normoxie. Puis nous avons étudié le rôle de HIF-1 sur la phosphorylation oxydative. La modulation pharmacologique de HIF-1 ou des protéines qu'il régule pourrait-elle alors constituer une cible thérapeutique?

Plusieurs auteurs ont envisagé que la répression de la phosphorylation oxydative constituait un mécanisme permettant de limiter la production du stress oxydant. En effet, la mitochondrie pourrait représenter une source trop importante de ROS en conditions de prolifération élevée. Dans un second temps, nous avons donc voulu

déterminer si la stimulation de la phosphorylation oxydative liée à l'inhibition de HIF-1 se traduit par une augmentation de la production de ROS au niveau des mitochondries ? Est-ce que ce stress oxydant est létal pour les mélanomes ? Est ce que la stimulation des mitochondries pourrait augmenter la cytotoxicité d'agents prooxydants développés dans le traitement des cancers?

Afin de confirmer que la réduction de la phosphorylation oxydative est un mécanisme nécessaire pour limiter la production de ROS dans les mélanomes,, nous avons utilisé un autre modèle de mélanomes exprimant la protéine BRAFV600E. En effet, il a été précédemment décrit que BRAF réprime la phosphorylation oxydative et qu'à l'inverse l'inhibition pharmacologique de cette sérine/thréonine kinase par le vémurafenib stimule la consommation d'oxygène des mitochondries. Afin de confirmer notre hypothèse, nous avons donc déterminé si cette augmentation de la consommation d'oxygène induite par le vémurafenib pourrait augmenter le stress oxydant des mélanomes. Enfin, puisque les mélanomes devenus résistants au vémurafenib sont à ce jour dépourvus de solutions thérapeutiques, nous avons envisagé d'éradiquer ces cellules en ciblant la phosphorylation oxydative et le stress oxydant d'origine mitochondriale.



# RÉSULTATS

---

## ARTICLE 1

## RESUMÉ ARTICLE 1

La plupart des cellules tumorales présentent une reprogrammation métabolique connue sous le nom d'effet Warburg. Cette reprogrammation empêche l'oxydation du pyruvate, provenant du glucose, au niveau de la mitochondrie provoquant ainsi une répression de la phosphorylation oxydative. Dans le contexte du mélanome la plupart des ces cancers présentent un profil métabolique dépendant fortement de la glycolyse avec une faible phosphorylation oxydative. Nous avons déterminé quelles étaient les protéines qui participent à la reprogrammation métabolique dans ce cancer. Ainsi, nous avons confirmé que le mélanome présente une glycolyse exacerbée même en condition de normoxie. Les lignées de mélanome que nous avons utilisé dans cette étude montrent également une forte stabilisation du facteur HIF-1 en normoxie. Ce facteur est considéré comme l'un des plus importants régulateurs du métabolisme, nous avons ainsi évalué son rôle dans le métabolisme mitochondrial du mélanome. La diminution de l'expression de HIF-1, via un shRNA ou en utilisant l'inhibiteur pharmacologique YC1, provoque l'augmentation significative de la phosphorylation oxydative, suggérant ainsi une réactivation du fonctionnement mitochondrial. De plus, l'inhibition de HIF-1 est fortement liée à la diminution de l'expression de la Pyruvate Déshydrogénase kinase 3 (PDK3). L'inhibition directe de cette protéine, en utilisant le Dichloroacetate (DCA), est suffisante pour augmenter la phosphorylation oxydative ainsi que la production de ROS mitochondriaux. Nous avons ensuite évalué la possibilité d'exploiter cette réactivation de l'activité mitochondriale dans le but de potentialiser l'effet des agents pro-oxydants ciblant la production de ROS mitochondriaux. En effet, la combinaison du DCA avec l'elesclomol, un agent pro-oxydant en phase d'essai clinique dans le mélanome, permet de potentialiser de manière synergique, non seulement la production de ROS mais également la mort cellulaire induite par cet agent. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* chez la souris immunodéprimée où la combinaison DCA avec l'elesclomol permet de réduire de manière efficace le volume tumoral. De plus, la combinaison du DCA avec l'elesclomol est capable d'induire une production de ROS très importante dans les cellules de mélanome devenues résistantes à l'inhibiteur de la kinase BRAFV600E : le vemurafenib. Cependant, il reste à déterminer la raison pour laquelle ces cellules présentent une sensibilité plus importante à cette

combinaison. Ces résultats sont très encourageants et permettent non seulement de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques mais ils mettent également en évidence l'importance de l'état de l'activité mitochondriale dans l'efficacité des agents antitumoraux ciblant la production de ROS mitochondriaux.

# RÉSULTATS

---

## ARTICLE 2

## RESUMÉ ARTICLE 2 :

Le mélanome métastatique est l'un des cancers solides les plus agressifs avec une très faible réponse aux chimiothérapies conventionnelles. Le traitement de cette maladie a été révolutionné avec la découverte de la mutation BRAFV600 présente dans plus de 50% des mélanomes. Le vémurafenib est le premier inhibiteur spécifique de la mutation BRAFV600E à avoir été développé. Les études réalisées sur le vémurafenib ont permis de mettre en évidence le rôle clé de la mutation BRAFV600E dans la régulation du métabolisme du mélanome. En effet, cette kinase favorise la glycolyse en augmentant l'expression des enzymes clés de ce processus. L'équipe de Haq a montré que l'oncogène BRAFV600E peut également réguler l'activité mitochondriale via la voie MITF/PGC1 alpha. Dans ce contexte, nous avons montré que l'inhibition de cette mutation dans nos modèles de mélanome se traduit par une forte diminution de la glycolyse et une augmentation de la phosphorylation oxydative dépendante ou non de PGC1- $\alpha$ . Cette augmentation de l'activité mitochondriale est associée à une augmentation de la production de ROS. Ainsi, la combinaison des inhibiteurs de la phosphorylation oxydative avec le vémurafenib permet d'augmenter l'efficacité de ce dernier. Bien que l'introduction en clinique du vémurafenib ait donné des résultats impressionnants en clinique, la plupart des patients développent une résistance à cet inhibiteur seulement quelques mois après le début du traitement. Dans ce contexte, nous avons mis au point quatre modèles des lignées résistantes au vémurafenib. Ces lignées nous ont permis de montrer que les cellules résistantes au vémurafenib présentent une forte augmentation de l'activité mitochondriale caractérisée par une dépendance importante à la phosphorylation oxydative. De plus, ces lignées présentent un stress oxydant chronique ce qui les rend plus sensibles aux molécules pro-oxydants telles que l'elesclomol. Ces données montrent que les modifications métaboliques mitochondriales induites par le vémurafenib peuvent représenter des cibles thérapeutiques exploitables afin d'éradiquer les cellules sensibles et résistantes au vémurafenib.

# DISCUSSION

---

## DISCUSSION PARTIE 1

Le mélanome métastatique est l'un des cancers solides les plus agressifs et résistant à la plupart des chimiothérapies classiques. Il y a quelques années encore, la survie globale des patients atteints de cette maladie ne dépassait pas les trois mois. Les études réalisées sur le profil génétique du mélanome ont permis de mieux comprendre l'implication et l'importance de certains oncogènes dans le développement des mélanomes. Ces études ont montré que les oncogènes fréquemment altérés dans ce cancer ne jouent pas seulement un rôle dans la régulation de la prolifération mais aussi dans la régulation du métabolisme tumoral. Dans ce contexte, depuis quelques années, de nombreuses études se sont concentrées sur cet aspect pour mieux caractériser le profil métabolique des mélanomes en fonction des altérations génétiques présentes. Ainsi, ces études montrent que la plupart des mélanomes présentent une glycolyse exacerbée, qui joue un rôle important dans le soutien de la prolifération cellulaire (Scott D. et al., 2011). Deux protéines sont particulièrement impliquées dans ces changements métaboliques : d'une part, le facteur de transcription HIF-1 et, d'autre part, la Sérine/Thréonine kinase BRAF. Dans ce contexte la glycolyse pourrait être une cible thérapeutique attractive. Néanmoins, les études réalisées *in vitro* sur différentes lignées de mélanome, ont montré que les mélanomes présentent également une forte flexibilité métabolique leur permettant de surmonter l'inhibition d'une voie métabolique par l'activation d'une autre (Marchetti P. et al., 2014). Cet aspect pourrait donc limiter l'efficacité des molécules développées ciblant uniquement la glycolyse.

En ce qui concerne le rôle de la mitochondrie dans le métabolisme du mélanome, il a été montré, qu'elle joue un rôle très important au niveau des réactions anaplérotiques. Ces réactions permettent, à travers l'utilisation de la glutamine, d'obtenir les intermédiaires nécessaires à la synthèse des macromolécules, favorisant ainsi la prolifération. Cependant, en ce qui concerne le métabolisme du glucose dans le mélanome, il semble qu'il y ait un découplage entre la glycolyse et la phosphorylation oxydative (Scott D., 2011). Ainsi, la mitochondrie semble peu

participer au métabolisme du glucose. Curieusement, ceci pourrait conférer aux mélanomes des avantages car, dans certains modèles, la diminution de la phosphorylation oxydative est associée à l'hyperpolarisation de la mitochondrie, une diminution de la production de ROS et une résistance à l'apoptose (Sutendra G. et al., 2013). Une question a donc été soulevée : quelles seront les conséquences de la stimulation de la phosphorylation oxydative dans les mélanomes ?

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'un des oncogènes les plus connus dans la régulation du métabolisme dans les cellules cancéreuses : le facteur HIF-1, constitutivement exprimé dans le mélanome.

**(1) Nous avons montré, à partir de trois lignées différentes de mélanomes, que le facteur HIF-1 $\alpha$  était exprimé, même en présence d'oxygène (Article 1, Figure 2).** Ce résultat confirme les observations faites par d'autres équipes montrant que ce facteur est souvent stabilisé en normoxie dans le mélanome. Les mécanismes sont ainsi très variés et impliquent la protéine BRAFV600E (Kumar S.M., 2007), la protéine BCL2 (Trisciuglio D. et al., 2010), la protéine MAGE11 (Aprelikova O., 2009) ou encore la protéine NF $\kappa$ B. Ainsi, dans la lignée A375 que nous avons utilisée, la présence de la mutation BRAFV600E pourrait favoriser la stabilisation de HIF-1. D'autres altérations génétiques sont également compatibles avec ce résultat, puisqu'il a été démontré que les mutations de la protéine c-Kit ont besoin de l'expression de HIF-1 pour pouvoir induire la tumorigenèse (Monsel G., 2010). Ainsi la mutation D820Y sur la protéine c-KIT dans la lignée HBL, utilisée lors de notre étude, pourrait être associée à la stabilisation de HIF-1.

**(2) Nos travaux ont permis de confirmer que HIF-1 $\alpha$  favorise la glycolyse et, pour la première fois, nous montrons que HIF-1 réprime le fonctionnement de la phosphorylation oxydative dans les mélanomes (Article 1, Fig. 3).** Ainsi, l'inhibition de ce facteur provoque une diminution importante de l'expression des enzymes clés participant à la glycolyse comme la HKII ou LDH-A. Nous avons également montré que l'inhibition de HIF-1 se traduit par une augmentation de la consommation d'oxygène au niveau des mitochondries. Ceci est compatible avec les observations précédemment faites dans d'autres modèles, qui ont montré qu'il est possible de réactiver la phosphorylation oxydative dans différents cancers. Ainsi,



Rossignol et ses collaborateurs ont montré qu'en substituant le glucose au galactose, on observe une augmentation de la biogénèse mitochondriale, ce qui permet aux cellules tumorales de basculer vers la phosphorylation oxydative pour obtenir de l'énergie (Jose C. et al., 2011). L'équipe de Fantin a complété ces résultats en montrant que l'inhibition de la LDH-A peut stimuler la respiration mitochondriale dans le cancer du sein, suggérant ainsi que l'augmentation du pool de pyruvate disponible pour être transformé en Acetyl coA pourrait également induire la réactivation de la phosphorylation oxydative (Fantin V. et al., 2006). De plus, l'équipe de Bonnet a relevé l'importance de la PDK2 dans les glioblastomes. Ainsi, l'inhibition de cette protéine, via un siRNA ou en utilisant l'inhibiteur pharmacologique dichloroacetate (DCA), diminue de manière significative la glycolyse et favorise l'oxydation du glucose dans la mitochondrie. L'inhibition de cette protéine dans les glioblastomes n'induit pas seulement une réactivation de la phosphorylation oxydative, mais également la mort de la cellule par apoptose (Bonnet S. et al., 2007). ***Nos résultats, associés à ces travaux, démontrent donc que, dans les modèles de mélanomes utilisés ainsi que dans d'autres cancers, la phosphorylation oxydative mitochondriale n'est pas irréversiblement altérée.***

Les avantages que pourrait apporter la répression de la phosphorylation oxydative, menée par HIF-1, sont encore mal compris. D'une part, certains auteurs suggèrent que, HIF-1, en réprimant l'activité mitochondriale, peut favoriser la glycolyse. En effet, en réprimant l'utilisation du pyruvate par les mitochondries et en favorisant son utilisation par la lactate déshydrogénase, HIF-1 favorise la génération du NAD<sup>+</sup>, un cofacteur limitant et important dans les réactions enzymatiques des premières étapes de la glycolyse (Lunt S. et al., 2011).

D'autre part, certaines études suggèrent que l'expression du facteur HIF-1 limiterait la production de ROS d'origine mitochondriale (Kim J. et al., 2006). Ces mécanismes ont été principalement décrits en condition d'hypoxie. En effet, il a été montré qu'en diminuant la consommation d'oxygène par les mitochondries, HIF-1 réduit la production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. (Semenza G., 2011). Cette réduction ferait partie d'une boucle de rétrocontrôle, car ce sont d'abord les ROS produits au niveau du complexe III de la chaîne respiratoire qui favorisent la stabilisation du facteur HIF-1 en inhibant les prolyl-hydroxylases (PHD) (Klimova T.

et al., 2008) . Il a également été montré que HIF-1 est capable de modifier la composition du complexe IV de la chaîne respiratoire, afin d'optimiser le transport d'électrons et de diminuer les fuites responsables de la production de ROS. En effet, HIF-1 peut favoriser la dégradation de l'isoforme COX 4-1 présente au niveau du complexe IV en conditions normoxiques. Cette isoforme serait ainsi remplacée par la COX 4-2, exprimée lors de l'hypoxie et diminuerait la production de ROS dans la cellule. De plus, HIF-1 peut également favoriser l'expression du miR-210, qui empêche l'expression des gènes ISCU1 et ISCU2. Ces deux derniers sont très importants pour l'assemblage des centres sulfure des complexes I (NDUFA4), II (SDHD) et IV (COX10) (Semenza G. 2011). Tous ces résultats montrent que HIF-1 joue un rôle important dans la régulation de l'activité mitochondriale, particulièrement en ce qui concerne le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Il est important de préciser que, dans certains cancers, comme les cancers du rein présentant une mutation de la protéine VHL, HIF-2 peut également réguler le métabolisme glycolytique et même l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Majmundar A. et al., 2010). Cependant, dans le mélanome, les données sur le rôle de HIF-2 ne sont pas nombreuses. En effet, nous savons qu'il peut participer à la régulation de l'invasion et de l'angiogenèse, mais son rôle dans la régulation du métabolisme n'a pas encore été évalué.

Dans ce contexte, l'ensemble des mécanismes régulés par HIF-1 dans le mélanome fait de ce facteur une cible thérapeutique très attractive. Néanmoins, bien que plusieurs inhibiteurs pharmacologiques de ce facteur aient été développés, les résultats des évaluations précliniques et cliniques ont été très décevantes en raison de la faible spécificité et des effets secondaires importants induits par ces molécules.

**(3) Nous avons montré que, dans le mélanome, la répression de la phosphorylation oxydative dépendante de HIF-1 implique l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase 3 (PDK3) (Article 1, Fig. 3).** Ce résultat est très intéressant car il a été décrit dans différents modèles, en conditions physiologiques, comme pathologiques, que le facteur HIF-1 peut réguler au moins deux des quatre isoformes de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK1 et PDK3). Ainsi, dans nos

modèles de mélanome, comme dans les modèles de cancer du colon, HIF-1 semble favoriser l'expression de la PDK3 (Lu CW., 2008). Cependant, dans les cancers du rein comme dans les cancers des voies aérodigestives supérieures, HIF-1 favorise plutôt l'expression de la PDK1 (McFate T. et al., 2008). Ces résultats appuient les observations faites par Denko et al, montrant que la réponse transcriptionnelle, régulée par le facteur HIF-1, peut varier selon le contexte cellulaire (Denko N. et al., 2003). Les mécanismes qui déterminent dans quel contexte HIF-1 régule une isoforme ou l'autre ne sont pas encore bien établis. De même, dans certains modèles tels les glioblastomes, c'est l'isoforme PDK2 qui est souvent surexprimée. Cependant, il n'est pas encore clairement établi que cette isoforme pourrait également être régulée par le facteur HIF-1.

Fait intéressant, nous avons montré que la diminution de l'expression de PDK3 est suffisante pour augmenter, non seulement la consommation d'oxygène mitochondriale, mais aussi la production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. ***Ce résultat démontre que la répression de la phosphorylation oxydative limite la production de ROS dans les mélanomes.***

**(4) Vu la difficulté d'inhiber le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , nous avons montré que l'on pouvait lever le frein qui repose sur la phosphorylation oxydative mitochondriale via l'inhibition pharmacologique de la PDK3 par le Dichloroacétate (Article 1, Fig. 3 et 4)** Cet inhibiteur est un médicament qui a été utilisé pour traiter les acidoses lactiques chez l'enfant. Bien que le DCA ait une spécificité plus importante pour la PDK1, nous avons constaté que cet inhibiteur permet de diminuer efficacement l'activité de la PDK3 (surexprimée dans nos modèles cellulaires), d'augmenter la consommation d'oxygène mitochondriale et la production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire. Cet effet du DCA a également été décrit dans d'autres modèles, tels les glioblastomes, le cancer du sein ou le cancer du poumon (Michelakis E. et al., 2008).

**(5) De manière inattendue, nous avons observé que le dichloracétate réduit l'expression de la protéine HIF-1 $\alpha$  (Article 1, Fig 3).** Ce résultat est particulièrement intéressant puisque cela se traduit par une diminution de la LDH-A, enzyme régulé par HIF-1. En diminuant l'expression de la LDH-A, le DCA pourrait

donc favoriser le pool de pyruvate disponible pour la mitochondrie. Pour expliquer ce résultat, l'équipe de Sutendra a montré, dans une modèle de cancer du poumon, que l'inhibition de la PDK2, induite par le DCA, permet la réactivation du cycle de Krebs et augmente ainsi le taux de  $\alpha$ -cétoglutarate . Ce dernier va permettre la réactivation de la PHD-2 au niveau du cytosol et va favoriser la dégradation de HIF-1 (Sutendra G. et al., 2013). Le DCA pourrait donc induire indirectement une diminution de la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  et favoriser, de manière plus importante encore, l'inhibition de tous les processus pro-tumorigènes régulés par ce facteur.

**(6) Nous avons montré que le fait de réactiver la phosphorylation oxydative dans le mélanome ne suffit pas pour induire un effet antitumoral (Article 1 Fig.5).** En effet, aux doses utilisées, le DCA induit, dans nos modèles cellulaires *in vitro*, une faible toxicité. De même, dans nos modèles *in vivo*, l'effet antitumoral du DCA reste très limité. Ceci suggère que, bien que l'inhibition de la PDK induit dans nos modèles de mélanome une réactivation de la phosphorylation oxydative et une forte production de ROS, ceci ne se traduit pas par une induction importante de la mort cellulaire.

Nos observations sont compatibles avec le fait que, en dehors des glioblastomes dans certains cancers, on doit administrer des doses très élevées de DCA pour observer un effet antitumoral. Ceci suggère donc que, dans certains contextes, il existerait une résistance intrinsèque à ce médicament, ce qui représente un problème majeur à l'utilisation de cette molécule. En effet, les fortes doses de DCA ont été associées à l'apparition de neuropathies chez certains patients. Le mécanisme par lequel le DCA induit ces neuropathies n'est pas encore connu, mais il semble que le DCA pourrait induire des modifications, tant morphologiques que métaboliques, au niveau des axones neuronaux (Calcutt N. et al., 2010). La première piste de la résistance intrinsèque au DCA a été donnée par l'équipe de Babu qui a montré que le DCA rentre dans les cellules via le transporteur SLC5A8, qui transporte cette molécule de manière spécifique et très efficace. Cependant, ce transporteur peut se trouver sous-exprimé à cause de modifications épigénétiques dans certains cancers comme le cancer du sein, le cancer du colon et le cancer de la prostate (Babu E. et al., 2011). Ceci peut donc expliquer pourquoi, dans certaines lignées tumorales, il est nécessaire d'administrer de fortes doses. L'expression de ce transporteur n'a pas encore été

évaluée dans le mélanome mais elle semble très importante pour pouvoir guider l'utilisation du DCA dans le cadre du traitement de ce cancer.

Par ailleurs, d'autres approches sont en cours de développement pour aborder cette même problématique. Ainsi, un dérivé du DCA a été développé : le mito-DCA. Ce dérivé garde la composition biochimique du DCA associée à un cation lipophile : le triphenylphosphonium (TPP). Celui-ci lui permet de traverser les membranes, de manière passive et de s'accumuler au niveau de la mitochondrie (Pathak R. et al., 2014). Ainsi, cette modification permet que la captation du DCA soit indépendante de l'expression des transporteurs et de la compétition avec d'autres substrats au niveau de la membrane plasmique, comme de la membrane interne mitochondriale. Cette molécule entrerait donc de manière plus efficace dans les cellules et dans la mitochondrie. L'ajout du cation lipophile pourrait donc avoir une répercussion importante sur l'efficacité de cette molécule. Ainsi, par rapport au DCA, le mito-DCA a une activité anti-tumorale beaucoup plus importante dans les cellules du cancer du pancréas. L'ensemble de ces résultats montre que le DCA permet de réactiver les fonctions mitochondriales dans plusieurs modèles de cancer. Cette réactivation de l'activité mitochondriale favorise la production de ROS qui conduit la cellule vers la mort.

**(7) Malgré l'absence d'effet cytotoxique et d'effet antitumoral aux doses utilisées, nous avons démontré que le DCA était capable d'augmenter la phosphorylation oxydative. Ainsi, nous avons donc décidé d'associer le DCA à un médicament antitumoral en essai clinique, qui agit en favorisant la production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Article 1 Fig.3)**

L'elesclomol est l'une des premières molécules développées dans le but de cibler les mitochondries dans les cellules tumorales pour induire une production létale de ROS. Elle est capable d'interagir avec le cuivre qui lui confère une conformation plane particulière facilitant sa captation par la cellule. L'elesclomol altère le flux d'électrons au niveau des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et son interaction avec le cuivre favorise les réactions d'oxydo-réduction, ce qui conduit à la production de ROS. L'augmentation de la production de ROS, induite par cette molécule, se

traduit ensuite par une diminution importante du potentiel de membrane mitochondriale. Ceci provoque la libération du cytochrome C, induisant ainsi la mort de la cellule par apoptose (Kirshner J. et al., 2008).

L'évaluation de l'elesclomol lors de la phase II d'essai clinique chez les patients atteints d'un mélanome métastatique n'a pas donné de résultats encourageants avec un faible pourcentage des patients répondant au traitement. Dans cette étude, on observe que ce sont les patients qui présentent un faible taux de LDH-A sérique qui répondent le mieux au traitement. D'autres études réalisées par l'équipe de Blackman, en collaboration avec notre équipe, ont permis de montrer que l'effet antitumoral de l'elesclomol est fortement lié à l'état de l'activité mitochondriale. Ainsi, cette molécule est dépendante du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale pour pouvoir induire la production de ROS. En effet, l'elesclomol n'a aucun effet dans les cellules  $\rho 0$  qui présentent une chaîne respiratoire non fonctionnelle, du fait de l'absence d'ADN mitochondrial (Blackman R. et al., 2012). Ainsi, il est probable que l'échec des essais cliniques utilisant l'Elesclomol soit lié à la faible activité de la phosphorylation dans les mélanomes, notamment par les mécanismes que nous avons démontrés.

**(8) Nous avons montré que le DCA, via la réactivation de la phosphorylation oxydative, permet d'augmenter *in vitro* et *in vivo* la production mitochondriale de ROS, la cytotoxicité et l'effet antitumoral de l'elesclomol ou d'autres agents pro-oxydants (Article 1, Fig. 5).**

L'équipe de Van-Houten a également réalisé des études sur l'effet de l'elesclomol dans le mélanome montrant que l'elesclomol inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et induit une production accrue de ROS. De plus, cette équipe a mis en évidence que le traitement avec l'elesclomol mène à une sélection de cellules fortement glycolytiques ne répondant plus à celui-ci (Ho J. et al., 2012). Nos résultats démontrent que la combinaison DCA + elesclomol est plus efficace que l'elesclomol seul. Il serait alors pertinent d'évaluer si l'augmentation de l'activité de cette combinaison pourrait être liée à l'éradication des cellules fortement glycolytiques.

A forte dose, l'utilisation du DCA conduit à des neuropathies chez les patients. Or, nous avons observé que **la combinaison du DCA avec l'elesclomol permet de**

**réduire de manière significative la dose de DCA nécessaire pour atteindre l'effet anti-tumoral.** En effet, alors que la majorité des expérimentations menées in vitro utilisent le DCA à des concentrations supérieures ou égales à 5mM, nous démontrons que la dose de 0.5mM est suffisante pour lever le frein qui repose sur la phosphorylation oxydative.

Les études combinant le DCA avec d'autres molécules sont de plus en plus nombreuses. Parmi ces molécules, plusieurs d'entre elles impliquent la génération d'un stress oxydant dans leur mécanisme d'action. C'est le cas, du cisplatine (Garon E. et al., 2014), du 5-Fluoro-uracile (Xuan Y. et al., 2014) ou de la metformine (Choi Y. et al., 2014). Par exemple, le 5-FU, en plus d'induire des dommages à l'ADN, peut également induire la production de ROS mitochondriaux via la voie de p53. Ainsi, la combinaison du 5-FU avec le DCA permettrait probablement d'augmenter la production de ROS mitochondriaux, via la réactivation de la phosphorylation oxydative induite par le DCA. La production de ROS pourrait donc être, en partie, responsable de l'effet anticancéreux de cette combinaison.

**(9) Nous avons également montré que la combinaison DCA + Elesclomol est suffisante pour induire la mort des mélanomes mutés sur la protéine BRAFV600E et devenus résistants à l'inhibiteur de cette mutation : le vémurafenib (Article 1, Fig.5).** Le vémurafenib a donné des résultats très impressionnants en terme de réponse et de survie globale des patients. Cependant, la plupart des patients développent, dans les 8 à 16 mois qui suivent le début du traitement, une résistance à cet inhibiteur. Ceci pose donc un problème clinique majeur dans la prise en charge thérapeutique de ces patients. La combinaison DCA + Elesclomol pourrait alors être envisagée dans cette situation en l'absence de solution thérapeutique.

Fait intéressant, nous avons montré que l'elesclomol, seul ou combiné avec le DCA, induit une production de ROS et un effet cytotoxique plus important dans les cellules résistantes au vémurafenib que dans les cellules sensibles. Dans un second travail (cf article 2), ce résultat nous a conduit à évaluer plus précisément le métabolisme mitochondrial dans des cellules sensibles ou résistantes aux inhibiteurs de BRAF.

*En utilisant des modèles cellulaires et des modèles animaux, ce travail démontre que la stratégie qui consiste à cibler la mitochondrie dans le mélanome et à induire un stress oxydant létal, pourrait être envisagée dans le traitement du mélanome, car le DCA ou l'elesclomol sont deux molécules qui ont déjà été évaluées individuellement dans le traitement du cancer.*



## DISCUSSION PARTIE 2

L'incidence de la mutation BRAFV600E, fait de cette kinase l'une des cibles thérapeutiques les plus importantes dans le mélanome. Cette mutation provoque l'activation constitutive de la voie MAPK, qui favorise la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. Le rôle de cette mutation a, tout d'abord, été associé à la régulation de la prolifération. Cependant, des études récentes ont montré que cette kinase peut également jouer un rôle dans la régulation du métabolisme. Les leçons apportées par les travaux réalisés sur la fonction suppresseur de tumeur de la protéine p53 et l'importance de cette fonction sur le métabolisme, suggèrent que le rôle métabolique des oncogènes et/ou gènes suppresseurs de tumeurs est crucial dans le phénotype cancéreux.

La mutation BRAFV600E rend la cellule dépendante à la glycolyse et Parmenter et al. ont montré que ceci passe notamment par l'activation de deux facteurs connus pour leurs rôles dans la régulation de la glycolyse : le facteur HIF-1 et le facteur Myc (Parmenter T., 2013) L'interaction entre BRAFV600E et HIF-1 avait déjà été décrite par l'équipe de Kumar en 2007, montrant ainsi que l'expression de HIF-1 est fortement corrélée à l'expression de la mutation BRAFV600E. Cette équipe a même suggéré qu'une partie des effets tumoraux de BRAFV600E passait probablement par la stabilisation du facteur HIF-1 (Kumar S. M. et al., 2007). Ces deux études montrent ainsi que la régulation du métabolisme en général n'est pas menée par un seul facteur mais probablement par différents facteurs qui interagissent pour réguler, de manière harmonique, tous ces processus. Il n'est donc pas étonnant que les études réalisées sur l'effet du vemurafenib dans les cellules de mélanome, montrent que cette molécule, en inhibant la protéine BRAFV600E, induit un changement dans le profil métabolique de ces cellules. Ainsi, le traitement au vemurafenib induit une diminution de la glycolyse, accompagnée d'une diminution de l'expression des facteurs de transcription HIF-1 et Myc (Parmenter T., 2013). Ceci se caractérise par la diminution de la captation du glucose et de la libération de lactate *in vitro* comme *in vivo*. De plus, cette diminution de la captation du glucose peut même être observée chez les patients via la TEP, ce qui permet de suivre, en clinique, la réponse au traitement.

De même, la mutation BRAFV600E réprime la phosphorylation oxydative en inhibant l'expression des facteurs MITF et PGC1A, impliqués dans la biogénèse mitochondriale. Ainsi, l'inhibition de BRAFV600E par le vémurafenib lève le frein sur ces protéines et stimule la biogénèse mitochondriale. Cette biogénèse mitochondriale a été identifiée comme un facteur de résistance au vémurafenib et l'utilisation d'inhibiteurs de la phosphorylation oxydative augmente la cytotoxicité de cette thérapie ciblée (Haq R., 2013).

**(1) En complément de ces travaux, nous avons montré que le traitement des mélanomes BRAFV600E avec le vémurafenib stimule la phosphorylation oxydative des mélanomes exprimant ou non le facteur PGC1 $\alpha$  (Article 2, Fig. 1).**

Nous avons montré que les mélanomes BRAFV600E sont peu sensibles à l'inhibition de la phosphorylation oxydative alors que les mélanomes BRAFV600E, traités au vémurafenib, deviennent « dépendants » de cette voie métabolique. Il semblerait donc que ce traitement, en inhibant la glycolyse, limite la flexibilité métabolique de ces cellules tumorales. *Nous confirmons, ainsi, le phénotype d'addiction à la phosphorylation oxydative des mélanomes traités par le vémurafenib.*

Lors de notre étude, nous avons montré que certaines lignées de mélanomes qui n'expriment pas ce facteur peuvent également basculer vers la phosphorylation oxydative. Cela suggère que des mécanismes indépendants de l'expression de PGC1- $\alpha$ , peuvent également se mettre en place pour favoriser l'adaptation de ces cellules. En effet, l'évaluation de la biogénèse mitochondriale, régulée par les membres de la famille PGC1, a montré que PGC1 $\alpha$  n'est pas le seul facteur à réguler ce processus. Ainsi, en absence de ce facteur, PGC1 $\beta$  et PRC peuvent prendre le relais dans la régulation de la biogénèse mitochondriale (Kelly D. et al., 2004).

Le suivi des différents cancers, en utilisant le TEP-scan avec du 2-FDG, a montré qu'un bon nombre des thérapies ciblées sont capables d'induire une diminution importante de la captation du glucose qui pourrait induire une modification du métabolisme dans les cellules tumorales. Dans ce contexte, le nombre de travaux sur l'effet métabolique des thérapies ciblées ne cesse de croître. Ainsi, outre le vémurafenib, d'autres molécules, comme l'imatinib, induisent dans les cellules présentant la mutation BCR-Abl, une diminution significative de la captation du glucose et une augmentation de la

phosphorylation oxydative mitochondriale (Kominsky D. et al., 2009). De même le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques, avec le dasatinib, induit une reprogrammation métabolique et ces cellules tumorales basculent alors de la glycolyse vers la phosphorylation oxydative (Marignac V. et al., 2013). Les mécanismes qui contrôlent cette reprogrammation métabolique dans ce type de leucémie ne sont pas encore bien établis. Cependant, il est possible que le métabolisme mitochondrial puisse représenter un frein dans l'efficacité des nombreuses thérapies ciblées.

Dans ce contexte, la phosphorylation oxydative apparaît clairement comme un mécanisme de résistance au vémurafenib. Ainsi, nous nous sommes demandé si les mélanomes ayant acquis une résistance au vémurafenib, présentent une modification de leur métabolisme mitochondrial, ce qui pourrait favoriser leur phénotype résistant.

**(2) Nous avons démontré que plusieurs modèles de résistance au vémurafenib présentent un phénotype d'addiction à la phosphorylation oxydative (Article 2, Fig.3)**

Les mécanismes de résistance au vémurafenib sont très nombreux et peu prédictibles (cf. annexe 1). Le nombre de mécanismes de résistance au vémurafenib ne fait que croître, suggérant ainsi qu'il est presque impossible de cibler spécifiquement un type de résistance chez un patient. De plus, les différentes métastases, chez un même patient, peuvent développer des mécanismes de résistance différents. Dans ce contexte très complexe, ce qui semble plus accessible et réalisable serait de trouver des caractéristiques en commun à ces différentes cellules résistantes, dans le but de pouvoir cibler une grande majorité d'entre-elles.

Dans notre équipe, nous avons obtenu, de manière indépendante, quatre modèles de résistance au vémurafenib à partir des lignées présentant la mutation BRAFV600E. En étudiant le métabolisme de ces lignées, nous avons montré qu'elles présentent un profil métabolique différent, caractérisé par une addiction à la phosphorylation oxydative mitochondriale et, cela même, en absence de vémurafenib. De plus, la dépendance accrue de ces cellules à la phosphorylation oxydative les rend plus sensibles aux agents inhibant l'activité mitochondriale.

Plus intéressant encore, nous avons évalué les mécanismes de résistance de nos différentes lignées et nous avons pu conclure que les quatre lignées, dont une obtenue *in vivo* chez la souris immunodéprimée, ne présentent pas le même mécanisme de résistance. Ainsi, **dans nos modèles, la dépendance à l'activité mitochondriale et l'augmentation du stress oxydant semblent être une caractéristique commune aux lignées résistantes, quel que soit le mécanisme de résistance (Article 2, Fig.2)**. Cependant, une autre équipe a récemment publié une étude sur des cellules résistantes au vemurafenib, dont le mécanisme de résistance repose sur la mutation N-RAS<sup>Q61K</sup>. Dans cette étude, ces cellules montrent une diminution de l'activité mitochondriale et consomment donc moins d'oxygène (Parmenter T., 2013). Ceci va à l'encontre de nos résultats et soulève l'importance de déterminer quels mécanismes de résistance sont capables d'induire une augmentation de la phosphorylation oxydative. De plus, les effets des mutations au niveau de N-RAS<sup>Q61K</sup> sur le métabolisme ont été peu étudiés. Cependant, les mutations au niveau d'une autre protéine, qui appartient à cette même famille K-RAS ont été montrées comme étant capables d'induire des modifications métaboliques dans d'autres cancers. Ainsi, l'incorporation de la mutation K-RAS, dans les fibroblastes NIH3T3, induit le même effet que la mutation BRAFV600E, c'est à dire un découplage de la glycolyse et la phosphorylation oxydative, provoquant ainsi une dépendance à cette première (Gaglio D. et al., 2011). Il est donc probable que les cellules résistantes, portant des mutations au niveau des protéines de la famille RAS, présentent un comportement métabolique différent.

Le changement métabolique semble ainsi être corrélé à l'acquisition d'un phénotype de résistance mais les liens moléculaires à l'origine de ces modifications restent à ce jour non déterminés. Il est cependant possible que les modifications métaboliques soient liées à l'activation d'autres oncogènes ou voies de signalisation déjà décrites. C'est ainsi le cas, par exemple, des mutations activatrices des protéines NRAS ou KRAS qui ont été associées au mécanisme de résistance au vemurafenib et dont le rôle dans le métabolisme a déjà été décrit dans d'autres modèles tumoraux.

***(3) Nous savions que le métabolisme des cellules tumorales varie en fonction de l'environnement, des oncogènes ou des suppresseurs des tumeurs inactivés. Dans ce travail, nous démontrons que le métabolisme peut être différent, en fonction***

***du phénotype sensibilité/résistance à un traitement anticancéreux.*** Néanmoins, les cellules résistantes au vémurafenib ne représentent pas le seul modèle où la résistance est associée à une modification du métabolisme. En effet, en 2011 notre équipe a montré que les cellules leucémiques résistantes à l'imatinib présentent également un profil métabolique différent de celui des cellules sensibles. Ces cellules se caractérisent par une modification de l'activité mitochondriale, associée à une production significative de ROS (Kominsky D., 2009). Par ailleurs, les cellules du cancer du sein, devenues résistantes au lapatinib (un inhibiteur du récepteur tyrosine/kinase ErBB2), présentent également un métabolisme très différent des cellules sensibles. En effet, les cellules résistantes à cet inhibiteur présentent une augmentation significative de l'autophagie et l'inhibition de cette voie conduit à une forte diminution de la prolifération cellulaire (Komurov K. et al., 2012). Un autre modèle intéressant est celui des cellules leucémiques lymphoïdes chroniques résistantes au dasatinib (un inhibiteur de la kinase BCR-Abl). En effet, ces cellules présentent un métabolisme plutôt catabolique où le glucose est métabolisé principalement via la phosphorylation oxydative (Marignac V., 2013). Ainsi, la modification du profil métabolique semble être un caractère commun aux cellules devenues résistantes aux thérapies ciblées et, dans la majorité des cas, le nouveau profil métabolique est souvent directement ou indirectement associé à une augmentation de l'activité mitochondriale.

**(4) Nous démontrons que le phénotype d'addiction à la phosphorylation oxydative s'accompagne d'une augmentation des ROS mitochondriaux (Article 2, Fig.3).**

Qu'il s'agisse des mélanomes traités au vémurafenib ou des mélanomes ayant acquis une résistance à cette molécule, l'addiction à la phosphorylation oxydative a été clairement liée à une augmentation de la production de ROS. **Encore une fois, nous démontrons que l'augmentation de phosphorylation oxydative dans les mélanomes s'accompagne d'une augmentation irrémédiable de la production de ROS.**

Ces résultats sont compatibles avec le fait que les cellules résistantes présentent également une augmentation du taux de glutathion et de l'expression de la catalase,

ce qui participe à la détoxification de ROS. Ceci semble donc en accord avec les résultats de l'équipe de Vazquez, montrant que les mélanomes traités par le vémurafenib augmentent leurs défenses antioxydantes (Vazquez F., 2013). Cependant, cette augmentation du mécanisme de détoxification de ROS ne semble pas être suffisante car les cellules sensibles, traitées au vemurafenib, ou les cellules résistantes, souffrent d'un stress oxydant chronique. Dans ce contexte, il serait donc important de déterminer si l'augmentation de la production de ROS est juste une conséquence de l'augmentation de l'activité mitochondriale ou si les ROS jouent un rôle dans l'adaptation à cet inhibiteur. En effet, il a été montré, dans différents modèles de cancer, qu'une accumulation importante de ROS peut favoriser la mutagénèse. Ainsi, à travers la mutagénèse, l'augmentation du stress oxydant pourrait faciliter l'apparition des clones ayant acquis des modifications génétiques supplémentaires leur permettant de résister au vémurafenib, en activant d'autres voies qui régulent la prolifération, voire la reprogrammation métabolique.

**(5) Nous avons exploité ce phénotype d'addiction à la phosphorylation oxydative en éradiquant les mélanomes BRAFV600E avec l'elesclomol (Article 2, Fig. 4)**

Ainsi, l'évaluation du nouveau profil métabolique des cellules devenues résistantes aux inhibiteurs de BRAFV600E est très importante. Dans le cadre de nos modèles de résistance, les cellules présentent une réactivation de l'activité mitochondriale, faisant de ces cellules une cible appropriée pour l'utilisation de l'elesclomol. **Nous avons pu montrer que l'elesclomol induit, de manière efficace, une augmentation de la production de ROS associée à une cytotoxicité accrue dans les lignées résistantes au vémurafenib.** De même, nous avons confirmé ces résultats *in vivo*, permettant de montrer que l'elesclomol diminue de manière significative la croissance tumorale et induit l'apoptose. Ce résultat confirme nos précédentes observations (Article 1), montrant que l'utilisation de l'elesclomol n'est envisageable que dans des mélanomes présentant une forte phosphorylation oxydative.

Du fait de la difficulté d'évaluer le métabolisme chez les patients, nous avons mis en place des modèles de souris PDTX (patient derived tumor xenograph). Ces modèles

permettent d'évaluer l'efficacité d'un traitement en clinique, à partir d'une tumeur de patient xéno greffe, dans la souris immunodéprimée. Nous avons ainsi réalisé cela à partir d'un échantillon de tumeur provenant d'un patient caractérisé en clinique, comme étant en progression sous vémurafenib. Nous avons, tout d'abord, validé les résultats cliniques *in vitro* comme *in vivo*, montrant bien que ces cellules ne répondent plus à cet inhibiteur. Par la suite, ce modèle nous a permis de montrer que, **dans le cadre de cette tumeur de patient, le traitement avec l'agent pro-oxydant (elesclomol), permet de diminuer de manière significative la croissance tumorale (Article 2, Fig. 5)**. L'évaluation d'un plus large panel d'échantillons comme celui-ci permettra de valider les résultats obtenus chez ce patient. De plus, l'étude d'un plus grand nombre des tumeurs de patients pourrait permettre d'établir si, effectivement, la plupart des mécanismes de résistance sont associés à une augmentation du stress oxydant.

D'autres combinaisons de traitements ont été évaluées contre les mélanomes devenus résistants au vémurafenib. Par exemple, l'équipe de Mc Arthur a montré que le DCA + Vémurafenib rétablit l'effet antitumoral du vémurafenib dans les cellules résistantes, présentant la mutation N-RAS<sup>Q61K</sup>. Les auteurs suggèrent que l'effet du DCA est lié à sa capacité à inhiber la glycolyse, en redirigeant le pyruvate vers la mitochondrie (Parmenter T., 2013). Il serait cependant nécessaire d'évaluer le rôle des ROS mitochondriaux dans ce contexte.

**Cette étude montre l'importance du métabolisme mitochondrial dans la réponse au traitement dans le mélanome. D'autres travaux, issus de la littérature scientifique, suggèrent que cela pourrait aussi être le cas dans d'autres cancers. Ainsi, l'évaluation des profils métaboliques et leur changement en fonction des traitements semble indispensable dans le traitement du cancer. Néanmoins, l'évaluation du profil métabolique d'une tumeur chez le patient reste encore trop difficile à accomplir. Il est donc indispensable de développer des techniques permettant l'évaluation et la détermination du profil métabolique des tumeurs, dans le but de choisir les molécules les plus adaptées pour le cibler. Dans ce contexte les modèles de tumeurs de patients, greffés sur des souris immunodéprimées (PDTX), pourraient être une solution envisageable.**

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---



## CONCLUSION GÉNÉRALE

Nos travaux viennent compléter d'autres études de la littérature confirmant que les mitochondries ne sont pas irréversiblement altérées dans les tumeurs. A l'aide de plusieurs modèles de mélanome, nous démontrons que l'axe HIF-1 $\alpha$ /PDK3 exerce un frein sur la phosphorylation oxydative des mitochondries qu'il est possible de lever à l'aide d'une approche pharmacologique tels que le DCA. La réactivation de cette fonction mitochondriale se traduit irrémédiablement par une augmentation de la production de ROS mitochondriaux. Bien que cette approche n'ait pas été suffisante pour obtenir un effet antitumoral satisfaisant, le DCA permet de potentialiser l'activité de l'elesclomol, un médicament antitumoral agissant au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'utilisation de médicaments tels que le dichloroacétate ou l'Elesclomol démontre que les mitochondries pourraient être une cible dans le traitement des cancers. Cependant, la diversité des profils métaboliques des tumeurs exige de caractériser la phosphorylation oxydative mitochondriale en fonction des anomalies génétiques de l'environnement tumoral et nos travaux démontrent qu'il est nécessaire de l'évaluer aussi en fonction du phénotype de sensibilité/résistance aux médicaments anticancéreux.

## PERSPECTIVES

Plusieurs questions n'ont pas été résolues dans ce travail.

D'une part, nous souhaitons continuer à évaluer la stratégie visant à éradiquer les cellules tumorales en induisant un stress oxydant létal d'origine mitochondrial. Il reste, cependant, un aspect important dont il faut tenir compte car la mise en évidence d'une population de cellules souches cancéreuses au sein des tumeurs représente un problème majeur en clinique. En effet, la plupart du temps ces cellules sont très résistantes aux traitements. Dans le cadre du mélanome, il a été observé que le traitement avec des chimiothérapies conventionnelles comme la cisplatine ou avec des thérapies ciblées comme le vemurafenib, conduit à un enrichissement en cellules souches, exprimant le facteur JARID1B, au sein de la population tumorale (Roesch A., 2013). Ces cellules semblent présenter un métabolisme différent avec une préférence pour la phosphorylation oxydative. Ainsi, la plupart des molécules qui inhibent la glycolyse n'ont pas d'effets sur les cellules souches tumorales ce qui pourrait expliquer en partie l'échec de ces thérapies. Il serait donc intéressant d'évaluer la combinaison du vemurafenib avec des molécules ciblant la phosphorylation oxydative ou encore avec des molécules induisant un stress oxydant mitochondrial comme l'elesclomol. Ces combinaisons pourraient ainsi s'avérer plus efficaces sur la population de cellules souches.

D'autre part, nous souhaitons comprendre comment l'augmentation de la phosphorylation oxydative limitait la cytotoxicité du vemurafenib ?

Deux hypothèses sont à envisager :

- (1) Il a été démontré que le vemurafenib inhibe la glycolyse et cet effet est fortement lié à son rôle cytotoxique. On peut alors envisager que l'augmentation de l'activité mitochondriale observée après traitement a pour objectif de compenser la perte d'ATP produit par la glycolyse. Ainsi, l'inhibition de la phosphorylation oxydative par différents inhibiteurs se traduirait en présence de vemurafenib par une déplétion accrue en ATP.
- (2) Le vemurafenib induit également un puissant stress réticulaire probablement dû à la diminution de la captation de glucose associée à ce traitement (Beck D.

et al., 2013). Ainsi, le stress réticulaire induit par cette molécule provoque l'activation de la voie UPR qui peut conduire la cellule vers la mort ou vers la survie en fonction de l'intensité du stress. En parallèle, d'autres études ont montré que la phosphorylation oxydative détermine l'efficacité de la réponse UPR et, qu'à l'inverse, l'inhibition de cette fonction mitochondriale favorise la mort suite au stress réticulaire (Bravo R. et al., 2011). Ces résultats suggèrent donc que la mitochondrie pourrait jouer un rôle clé dans le processus d'adaptation au stress réticulaire induit par le vémurafenib dans le but de favoriser la survie.

Ainsi, nous voulons déterminer quel est le rôle de la mitochondrie dans la résistance au vémurafenib ? Pourquoi l'inhibition de l'activité mitochondriale augmente l'efficacité du vémurafenib ? Pourquoi l'augmentation de l'activité mitochondriale induite par le vémurafenib pourrait-elle, non seulement être là pour compenser l'inhibition de la glycolyse, mais aussi pour soutenir l'adaptation au stress réticulaire induit par cette molécule empêchant la mort de la cellule ?

# ANNEXE

---

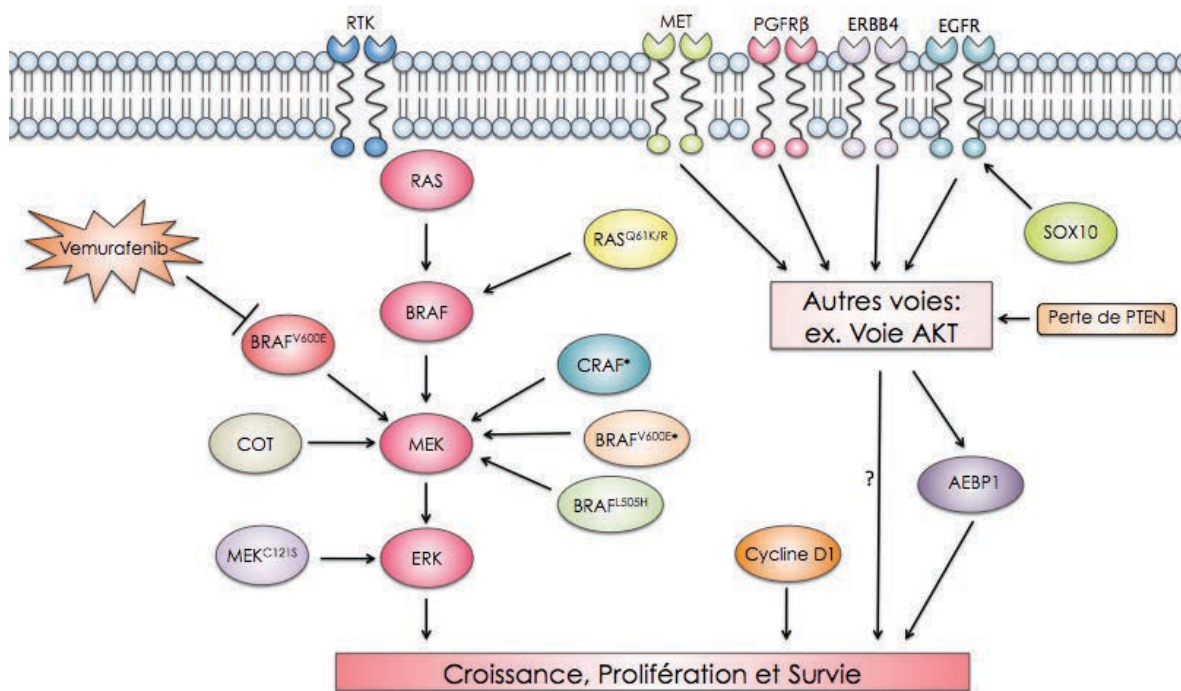
## ANNEXE : Les mécanismes de résistance au vémurafenib.

Les études réalisées sur le vémurafenib, ont permis de mettre en évidence l'hétérogénéité en ce qui concerne les mécanismes qui mènent à la résistance face à cet inhibiteur. Ainsi, on peut trouver des mécanismes qui permettent à nouveau l'activation de la voie MAPK ou des mécanismes qui favorisent l'activation des voies alternatives comme la voie AKT /PI3K.

En ce qui concerne la voie MAPK, aucune mutation supplémentaire, au niveau de la protéine BRAF, n'a été décrite en clinique. Cependant, très récemment, une équipe a montré *in vitro* qu'une mutation au niveau du site d'interaction du vémurafenib (L505H) peut conduire à une résistance aux inhibiteurs de BRAFV600E. De même, des amplifications du gène codant pour cette protéine et des isoformes différentes dues à un splicing alternatif ont été décrites (BRAFFV600E\*) (Poulikakos P. et al, 2011). Par ailleurs, d'autres isoformes de RAF sont également impliquées dans la résistance, comme CRAF, dont l'amplification a été décrite dans certains échantillons de patientes (Montagut C. et al., 2008). Un peu plus loin dans la voie, d'autres études avec des échantillons provenant de patients, ont montré que des mutations au niveau du domaine kinase de MEK1 (MEK<sup>C121S</sup>) peuvent aussi apparaître et qu'elles ne confèrent pas seulement une résistance aux inhibiteurs de BRAFFV600E mais aussi aux inhibiteurs de MEK (Wagle N. et al., 2011). Cette même kinase peut également être activée indirectement par la kinase COT, dont la surexpression a également été observée dans certaines tumeurs de patients (Johannessen C. et al., 2010). L'ensemble de ces mutations aboutit donc à la réactivation d'ERK et à la reprise de la prolifération cellulaire.

En ce qui concerne les voies alternatives, celle qui semble jouer un rôle très important est la voie AKT/PI3K. Cette voie peut être activée lors de la perte de son régulateur négatif PTEN, dont la diminution de l'expression est fortement associée à la réponse au vémurafenib. En effet, dans les mélanomes où le gène PTEN est intact, le vémurafenib est capable d'induire l'apoptose de manière plus importante que dans le mélanome où ce gène se trouve sous-exprimé (Xing F. et al., 2012). La voie AKT peut

être également activée lors de l'apparition au niveau de la protéine RAS (RAS<sup>Q61K</sup> ou <sup>Q61L</sup>) ou lors la surexpression des récepteurs des facteurs de croissance tels que PGFR $\beta$ , IGFR, EGFR, MET ou ERBB4, conférant ainsi une résistance au vemurafenib (Nazarian R. et al., 2010). De plus, l'activation du récepteur EGFR, dans ce contexte, a été associée à l'augmentation de l'expression de la protéine SOX10. Une autre étude a montré que dans certains contextes, l'activation de la voie AKT peut conduire à l'activation de la protéine AEBP1 qui favorise la prolifération. Cependant, tous les mécanismes de résistance qui activent la voie AKT ne conduisent pas forcément à l'activation de cette protéine. Certains régulateurs du cycle cellulaire peuvent aussi jouer un rôle dans la résistance. C'est le cas de la cycline D1 dont la surexpression est liée à la résistance face à l'inhibition de BRAFV600E (Smalley K. et al., 2009). Ainsi, les mécanismes de résistance sont très hétérogènes et difficiles à prédire, ce qui complique la prise en charge thérapeutique des patients. Les études actuellement réalisées cherchent donc à surmonter la résistance aux vémurafenib en exploitant les particularités des cellules devenues résistantes ou en combinant le vémurafenib avec d'autres molécules qui empêcheraient la mise en place de la résistance.



**Figure 17 : Les mécanismes de résistance au vémurafenib.** La voie MAPK est une voie qui régule la prolifération et survie de la cellule. Cette voie est activée lors des interactions au niveau membranaire des facteurs de croissance avec leurs récepteurs. La mutation au niveau de la protéine BRAFV600E provoque une activation constitutive de cette voie menant ainsi vers une prolifération indépendante de la présence des facteurs de croissance. Le vémurafenib est un inhibiteur spécifique de la mutation BRAFV600E, il provoque dans les cellules présentant cette mutation une diminution de la phosphorylation d'ERK. Cependant, les cellules tumorales développent plusieurs mécanismes qui leur permettent de surmonter cette inhibition. Ces mécanismes peuvent permettre de réactiver la voie MAPK à d'autres endroits, en aval ou en amont. De même, d'autres voies qui mènent également à la prolifération peuvent être activées suite à la surexpression des récepteurs des facteurs de croissance et d'autres protéines.

# BIBLIOGRAPHIE

---



- Abbas, S.**, Lugthart, S., Kavelaars, F.G., Schelen, A., Koenders, J.E., Zeilemaker, A., van Putten, W.J.L., Rijnveld, A.W., Löwenberg, B., and Valk, P.J.M. (2010). Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood* 116, 2122–2126.
- Anastasiou, D.**, Poulogiannis, G., Asara, J., Boxer, M., Jiang, J.-K., Shen, M., Bellinger, G., Sasaki, A., Locasale, J., Auld, D., Thomas, C., Vander, H., Cantley, L. (2014). Inhibition of Pyruvate Kinase M2 by Reactive Oxygen Species Contributes to Cellular Antioxidant Responses. *Science* (80-. ). 334, 1278–1282.
- Aprelikova, O.**, Pandolfi, S., Tackett, S., Ferreira, M., Salnikow, K., Ward, Y., Risinger, J.I., Barrett, J.C., and Niederhuber, J. (2009). Melanoma antigen-11 inhibits the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 and activates hypoxic response. *Cancer Res.* 69, 616–624.
- Atsumi, T.**, Chesney, J., Metz, C., Cancers, H., Leng, L., Donnelly, S., Makita, Z., Mitchell, R., and Bucala, R. (2002). High Expression of Inducible ( iPFK-2 ; PFKFB3 ) in Human Cancers. *Cancer Res.* 62, 5881–5887.
- Azoulay-Zohar, H.**, Israelson, A., Abu-Hamad, S., and Shoshan-Barmatz, V. (2004). In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem. J.* 377, 347–355.
- Babu, E.**, Ramachandran, S., CoothanKandaswamy, V., Elangovan, S., Prasad, P.D., Ganapathy, V., and Thangaraju, M. (2011). Role of SLC5A8, a plasma membrane transporter and a tumor suppressor, in the antitumor activity of dichloroacetate. *Oncogene* 30, 4026–4037.
- Barrett, W.C.**, DeGnore, J.P., Keng, Y.-F., Zhang, Z.-Y., Yim, M.B., and Chock, P.B. (1999). Roles of Superoxide Radical Anion in Signal Transduction Mediated by Reversible Regulation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* 274, 34543–34546.
- Baudy, A.R.**, Dogan, T., Flores-Mercado, J.E., Hoeflich, K.P., Su, F., van Bruggen, N., and Williams, S.-P. (2012). FDG-PET is a good biomarker of both early response and acquired resistance in BRAFV600 mutant melanomas treated with vemurafenib and the MEK inhibitor GDC-0973. *EJNMMI Res.* 2, 22.
- Baysal, B.E.** (2000). Mutations in SDHD, a Mitochondrial Complex II Gene, in Hereditary Paraganglioma. *Science* (80-. ). 287, 848–851.
- Beck, D.**, Niessner, H., Smalley, K.S.M., Flaherty, K., Paraiso, K.H.T., Busch, C., Sinnberg, T., Vasseur, S., Iovanna, J.L., Drießen, S., et al. (2013). Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAFV600E melanoma cells. *Sci. Signal.* 6, 7.
- Bensaad, K.**, Tsuruta, A., Selak, M. a, Vidal, M.N.C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126, 107–120.
- Bentzinger, C.F.**, Romanino, K., Cloëtta, D., Lin, S., Mascarenhas, J.B., Oliveri, F., Xia, J., Casanova, E., Costa, C.F., Brink, M., et al. (2008). Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab.* 8, 411–424.
- Berwick, D.C.**, Hers, I., Heesom, K.J., Moule, S.K., and Tavare, J.M. (2002). The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 33895–33900.
- Biswas, S.**, Troy, H., Leek, R., Chung, Y.-L., Li, J.-L., Raval, R.R., Turley, H., Gatter, K., Pezzella, F., Griffiths, J.R., et al. (2010). Effects of HIF-1alpha and HIF2alpha on Growth and Metabolism of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma 786-0 Xenografts. *J. Oncol.* 2010, 757–908.
- Blackman, R.K.**, Cheung-Ong, K., Gebbia, M., Proia, D. a, He, S., Kepros, J., Jonneaux, A., Marchetti, P., Kluza, J., Rao, P.E., et al. (2012). Mitochondrial electron transport is the cellular target of the oncology drug elesclomol. *PLoS One* 7, e29798.
- Boland, M.L.**, Chourasia, A.H., and Macleod, K.F. (2013). Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Front. Oncol.* 3, 292.

- Bonnet, S.**, Archer, S.L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C.T., Lopaschuk, G.D., Puttagunta, L., Bonnet, S., et al. (2007). A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11, 37–51.
- Brand, M.D.** (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45, 466–472.
- Brar, S.S.**, Kennedy, T.P., Sturrock, A.B., Huecksteadt, T.P., Quinn, M.T., Whorton, a R., and Hoidal, J.R. (2002). An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C1212–24.
- Bravo, R.**, Vicencio, J.M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J.P., Bui, M., Quiroga, C., Rodriguez, a. E., Verdejo, H.E., Ferreira, J., et al. (2011). Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J. Cell Sci.* 124, 2511–2511.
- Buscà, R.**, Berra, E., Pouyssegur, J., Ballotti, R., Buscà, R., and U, R.B.I. (2006). HIF1 a est une nouvelle cible du facteur de transcription MITF Implication de la cascade des mélanomes. *Med Sci* 22, 10–13.
- Bustamante, E.**, Morris, H.P., and Pedersen, P.L. (1981). Energy Metabolism of Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* 256, 8699–8704.
- Cairns, R. A.**, Harris, I., McCracken, S., and Mak, T.W. (2011a). Cancer cell metabolism. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 76, 299–311.
- Cairns, R. A.**, Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011b). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 85–95.
- Calcutt, N.A.**, Lopez, V.L., Bautista, A.D., Mizisin, L.M., Torres, B.R., Shroads, A.L., Mizisin, A.P., and Peter, W. (2010). NIH Public Access. *J. Neuropathol Exp Neurol* 68, 985–993.
- Cantor, J.R.**, and Sabatini, D.M. (2012). Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov.* 2, 881–898.
- Cao, X.**, Fang, L., Gibbs, S., Huang, Y., Dai, Z., Wen, P., Zheng, X., Sadee, W., and Sun, D. (2007). Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 59, 495–505.
- Cavalli, R.**, and Liang, C. (1997). Diminished Tumorigenic of Mitochondrial Phenotype after Depletion. 8, 1189–1198
- Chandel N.S.**, Maltepe E., Goldwasser E., Mathieu C. E., Simon M.C and Schumacker, P.T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 11715–11720.
- Chapman, P.B.**, Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., et al. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* 364, 2507–2516.
- Chen, W.**, Sun, Z., Wang, X.-J., Jiang, T., Huang, Z., Fang, D., and Zhang, D.D. (2009a). Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol. Cell* 34, 663–673.
- Chen, Z.**, Zhang, H., Lu, W., and Huang, P. (2009b). Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 553–560.
- Choi, Y.W.**, and Lim, I.K. (2014). Sensitization of metformin-cytotoxicity by dichloroacetate via reprogramming glucose metabolism in cancer cells. *Cancer Lett.* 346, 300–308.
- Costantini, P.**, Belzacq, a S., Vieira, H.L., Larochette, N., de Pablo, M. a, Zamzami, N., Susin, S. a, Brenner, C., and Kroemer, G. (2000). Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene* 19, 307–314.

- Cotter, M. A.**, Thomas, J., Cassidy, P., Robinette, K., Jenkins, N., Florell, S.R., Leachman, S., Samlowski, W.E., and Grossman, D. (2007). N-acetylcysteine protects melanocytes against oxidative stress/damage and delays onset of ultraviolet-induced melanoma in mice. *Clin. Cancer Res.* *13*, 5952–5958.
- Dang, L.**, White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M. A, Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., et al. (2010). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* *465*, 966.
- David, C.J.**, Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., and Manley, J.L. (2010). HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* *463*, 364–368.
- Davies, H.**, Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* *417*, 949–954.
- DeBerardinis, R.J.**, Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19345–19350.
- Degenhardt, K.**, Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., et al. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* *10*, 51–64.
- Denat, L.**, Kadekaro, A.L., Marrot, L., Leachman, S. a, and Abdel-Malek, Z. a (2014). Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress. *J. Invest. Dermatol.* 1–7.
- Denko, N.C.**, Fontana, L. a, Hudson, K.M., Sutphin, P.D., Raychaudhuri, S., Altman, R., and Giaccia, A.J. (2003). Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns. *Oncogene* *22*, 5907–5914.
- Emadi, A.**, Jun, S.A., Tsukamoto, T., Fathi, A.T., Minden, M.D., and Dang, C. V (2013). Inhibition of glutaminase selectively suppresses the growth of primary acute myeloid leukemia cells with IDH mutations. *Exp. Hematol.* *42*, 247–251.
- Endesfelder, D.**, Math, D., Gronroos, E., Ph, D., Martinez, P., Matthews, N., Sc, B., Stewart, A., Sc, M., Tarpey, P., et al. (2012). *New England Journal.* *366*, 833–892.
- Fan, J.**, Ye, J., Kamphorst, J.J., Shlomi, T., Thompson, C.B., and Rabinowitz, J.D. (2014). Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature* *510*, 298–302.
- Fantin, V.R.**, St-Pierre, J., and Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* *9*, 425–434.
- Figuroa, M.E.**, Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., et al. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* *18*, 553–567.
- Filipp, F. V.**, Scott, D.A., Ronai, Z.A., Osterman, A.L., and Smith, J.W. (2011). Reverse TCA cycle flux through isocitrate dehydrogenases 1 and 2 is required for lipogenesis in hypoxic melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* *25*, 375–383.
- Filipp, F. V.**, Ratnikov, B., De Ingeniis, J., Smith, J.W., Osterman, A.L., and Scott, D. A. (2012). Glutamine-fueled mitochondrial metabolism is decoupled from glycolysis in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* *25*, 732–739.
- Fitzgerald, J.P.**, Nayak, B., Shanmugasundaram, K., Friedrichs, W., Sudarshan, S., Eid, A. A., DeNapoli, T., Parekh, D.J., Gorin, Y., and Block, K. (2012). Nox4 mediates renal cell carcinoma cell invasion through hypoxia-induced interleukin 6- and 8- production. *PLoS One* *7*, e30712.

- Friesen, C., Kiess, Y., and Debatin, K.-M.** (2004). A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Cell Death Differ.* *11 Suppl 1*, S73–85.
- Fukuyama, M., Rokutan, K., Sano, T., Miyake, H., Shimada, M., and Tashiro, S.** (2005). Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon. *Cancer Lett.* *221*, 97–104.
- Gaglio, D., Metallo, C.M., Gameiro, P. a, Hiller, K., Danna, L.S., Balestrieri, C., Alberghina, L., Stephanopoulos, G., and Chiaradonna, F.** (2011). Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Mol. Syst. Biol.* *7*, 523.
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.-C., Lee, Y.-S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., et al.** (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* *458*, 762–765.
- Gao, X., Wang, H., Yang, J.J., Liu, X., and Liu, Z.-R.** (2012). Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Mol. Cell* *45*, 598–609.
- Garon, E.B., Christofk, H.R., Hosmer, W., Britten, C.D., Bahng, A., Crabtree, M.J., Hong, C.S., Kamranpour, N., Pitts, S., Kabbinar, F., et al.** (2014). Dichloroacetate should be considered with platinum-based chemotherapy in hypoxic tumors rather than as a single agent in advanced non-small cell lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *140*, 443–452.
- Garraway, L. A., Weir, B. A., Zhao, X., Widlund, H., Beroukhim, R., Berger, A., Rimm, D., Rubin, M. A., Fisher, D.E., Meyerson, M.L., et al.** (2005a). “Lineage addiction” in human cancer: lessons from integrated genomics. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *70*, 25–34.
- Garraway, L. A., Widlund, H.R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A.J., Ramaswamy, S., Beroukhim, R., Milner, D. A., Granter, S.R., Du, J., et al.** (2005b). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* *436*, 117–122.
- Goel, A., Mathupala, S.P., and Pedersen, P.L.** (2003). Glucose metabolism in cancer. Evidence that demethylation events play a role in activating type II hexokinase gene expression. *J. Biol. Chem.* *278*, 15333–15340.
- Goldberg, M.S., and Sharp, P. a** (2012). Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression. *J. Exp. Med.* *209*, 217–224.
- Goldin, N., Arzoine, L., Heyfets, A., Israelson, a, Zaslavsky, Z., Bravman, T., Bronner, V., Notcovich, A., Shoshan-Barmatz, V., and Flescher, E.** (2008). Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase. *Oncogene* *27*, 4636–4643.
- Gorrini, C., Harris, I.S., and Mak, T.W.** (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 931–947.
- Govindarajan, B., Sligh, J.E., Vincent, B.J., Li, M., Canter, J.A., Nickoloff, B.J., Rodenburg, R.J., Smeitink, J.A., Oberley, L., Zhang, Y., et al.** (2007). Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *117*.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., and Marais, R.** (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* *445*, 851–857.
- de Groof, A.J.C., te Lindert, M.M., van Dommelen, M.M.T., Wu, M., Willemse, M., Smift, A.L., Winer, M., Oerlemans, F., Pluk, H., Franssen, J. a M., et al.** (2009). Increased OXPHOS activity precedes rise in glycolytic rate in H-RasV12/E1A transformed fibroblasts that develop a Warburg phenotype. *Mol. Cancer* *8*, 54.
- Groves, A.M., Win, T., Haim, S. Ben, and Ell, P.J.** (2007). Non- [ <sup>18</sup>F ] FDG PET in clinical oncology. *Lancet Oncol.* *8*, 822–830.

- Gurpreet, S.**, Grem, J.L., and Cooney, D.A. (1990). Metabolism and action of amino-acid analog Anti-cancer Agents. *Pharmac. Ther.* *46*, 243–271.
- Hall, A.**, Meyle, K.D., Lange, M.K., Klima, M., Dahl, C., Abildgaard, C., Thorup, K., Moein, S., Jensen, P.B., Bartek, J., et al. (2013). Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the V600E BRAF oncogene. *Oncotarget* *4*, 584–599.
- Hanahan, D.**, and Weinberg, R. a (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Handy, D.E.**, and Loscalzo, J. (2012). Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid. Redox Signal.* *16*, 1323–1367.
- Haq, R.** (2014). Metabolic dysregulation in melanoma: cause or consequence? *Cancer Discov.* *4*, 390–391.
- Haq, R.**, Shoag, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G.C., Frederick, D.T., Hurley, A.D., Nellore, A., Kung, A.L., et al. (2013). Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 $\alpha$  and MITF. *Cancer Cell* *23*, 302–315.
- Hassanein, M.**, Hoeksema, M.D., Shiota, M., Qian, J., Harris, B.K., Chen, H., Clark, J.E., Alborn, W.E., Eisenberg, R., and Massion, P.P. (2013). SLC1A5 mediates glutamine transport required for lung cancer cell growth and survival. *Clin. Cancer Res.* *19*, 560–570
- Vander Heiden, M.G.**, Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* *324*, 1029–1033.
- Vander Heiden, M.G.**, Locasale, J.W., Swanson, K.D., Sharfi, H., Heffron, G.J., Amador-Noguez, D., Christofk, H.R., Wagner, G., Rabinowitz, J.D., Asara, J.M., et al. (2010a). Evidence for an alternative glycolytic pathway in rapidly proliferating cells. *Science* *329*, 1492–1499.
- Vander Heiden, M.G.**, Christofk, H.R., Schuman, E., Subtelny, A.O., Sharfi, H., Harlow, E.E., Xian, J., and Cantley, L.C. (2010b). Identification of small molecule inhibitors of pyruvate kinase M2. *Biochem. Pharmacol.* *79*, 1118–1124.
- Hernlund, E.**, Ihlund, L.S., Khan, O., Ates, Y.O., Linder, S., Panaretakis, T., and Shoshan, M.C. (2008). Potentiation of chemotherapeutic drugs by energy metabolism inhibitors 2-deoxyglucose and etomoxir. *Int. J. Cancer* *123*, 476–483.
- Ho, J.**, de Moura, M.B., Lin, Y., Vincent, G., Thorne, S., Duncan, L.M., Hui-Min, L., Kirkwood, J.M., Becker, D., Van Houten, B., et al. (2012). Importance of glycolysis and oxidative phosphorylation in advanced melanoma. *Mol. Cancer* *11*, 76.
- Hoek, K.S.**, Eichhoff, O.M., Schlegel, N.C., Döbbeling, U., Kobert, N., Schaerer, L., Hemmi, S., and Dummer, R. (2008). In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res.* *68*, 650–656.
- Hudson, C.C.**, Liu, M., Chiang, G.G., Diane, M., Loomis, D.C., Kaper, F., Giaccia, A.J., Abraham, R.T., and Otterness, D.M. (2002). Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1  $\alpha$  Expression and Function by the Mammalian Target of Rapamycin Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 Expression and Function by the Mammalian Target of Rapamycin. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7004–7014.
- Jackson, A.L.**, and Loeb, L. A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.* *477*, 7–21.
- Johannessen, C.M.**, Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Wardwell, L., Johnson, L. A., Emery, C.M., Stransky, N., Cogdill, A.P., Barretina, J., et al. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* *468*, 968–972.
- Jose, C.**, Bellance, N., and Rossignol, R. (2011). Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 552–561.

- Kadekaro, A.L.**, Leachman, S., Kavanagh, R.J., Swope, V., Cassidy, P., Supp, D., Sartor, M., Schwemberger, S., Babcock, G., Wakamatsu, K., et al. (2010). Melanocortin 1 receptor genotype: an important determinant of the damage response of melanocytes to ultraviolet radiation. *FASEB J.* *24*, 3850–3860.
- Kaplon, J.**, Zheng, L., Meissl, K., Chaneton, B., Selivanov, V. a, Mackay, G., van der Burg, S.H., Verdegaal, E.M.E., Cascante, M., Shlomi, T., et al. (2013). A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* *498*, 109–112.
- de Keizer, P.L.J.**, Packer, L.M., Szypowska, A. a, Riedl-Polderman, P.E., van den Broek, N.J.F., de Bruin, A., Dansen, T.B., Marais, R., Brenkman, A.B., and Burgering, B.M.T. (2010). Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence. *Cancer Res.* *70*, 8526–8536.
- Kelly, D.P.**, and Scarpulla, R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* *18*, 357–368.
- Kim, J.**, Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* *3*, 177–185.
- Kim, J.**, Gao, P., Liu, Y.-C., Semenza, G.L., and Dang, C. V. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 7381–7393.
- Kinch, L.**, Grishin, N. V, and Brugarolas, J. (2011). Succination of Keap1 and activation of Nrf2-dependent antioxidant pathways in FH-deficient papillary renal cell carcinoma type 2. *Cancer Cell* *20*, 418–420.
- Kirshner, J.R.**, He, S., Balasubramanyam, V., Kepros, J., Yang, C.-Y., Zhang, M., Du, Z., Barsoum, J., and Bertin, J. (2008). Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 2319–2327.
- Klein, E.A.**, Jr, I.M.T., Tangen, C.M., Crowley, J.J., Lucia, M.S., Goodman, P.J., Minasian, L.M., Ford, L.G., Parnes, H.L., Gaziano, J.M., et al. (2011). Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer. *Am. Med. Assoc.* *306*, 1549–1556.
- Klimova, T.**, and Chandel, N.S. (2008). Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ.* *15*, 660–666.
- Kohn, A.D.**, Summers, S.A., Morris, J., Roth, R.A., and Birnbaum, M.J. (1996). Cell Biology and Metabolism : Expression of a Constitutively Active Akt Ser / Thr Kinase in 3T3-L1 Adipocytes Stimulates Glucose Uptake and Glucose Transporter 4 Translocation. *J.Biol. Chem.* *271*, 31372-31378.
- Kokot, A.**, Metze, D., Mouchet, N., Galibert, M.-D., Schiller, M., Luger, T. a, and Böhm, M. (2009). Alpha-melanocyte-stimulating hormone counteracts the suppressive effect of UVB on Nrf2 and Nrf-dependent gene expression in human skin. *Endocrinology* *150*, 3197–3206.
- Koludrovic, D.**, and Davidson, I. (2013). MITF, the Janus transcription factor of melanoma. *Futur. Oncol.* *9*, 235–244.
- Kominsky, D.J.**, Klawitter, J., Brown, J.L., Boros, L.G., Melo, J. V, Eckhardt, S.G., and Serkova, N.J. (2009). Abnormalities in glucose uptake and metabolism in imatinib-resistant human BCR-ABL-positive cells. *Clin. Cancer Res.* *15*, 3442–3450.
- Komurov, K.**, Tseng, J.-T., Muller, M., Seviour, E.G., Moss, T.J., Yang, L., Nagrath, D., and Ram, P.T. (2012a). The glucose-deprivation network counteracts lapatinib-induced toxicity in resistant ErbB2-positive breast cancer cells. *Mol. Syst. Biol.* *8*, 596.
- Komurov, K.**, Dursun, S., Erdin, S., and Ram, P.T. (2012b). NetWalker: a contextual network analysis tool for functional genomics. *BMC Genomics* *13*, 282.

- Kops, G.J.P.L.**, Dansen, T.B., Polderman, P.E., and Bos, J.L. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419, 316–321.
- Kumar, R.**, Angelini, S., Snellman, E., and Hemminki, K. (2004). BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi. *J. Invest. Dermatol.* 122, 342–348.
- Kumar, R.**, Halanaik, D., and Malhotra, a (2010). Clinical applications of positron emission tomography-computed tomography in oncology. *Indian J. Cancer* 47, 100–119.
- Kumar, S.M.**, Yu, H., Edwards, R., Chen, L., Kazianis, S., Brafford, P., Acs, G., Herlyn, M., and Xu, X. (2007). Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1alpha expression in melanoma. *Cancer Res.* 67, 3177–3184.
- Lee, J.-M.**, Calkins, M.J., Chan, K., Kan, Y.W., and Johnson, J. A. (2003). Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J. Biol. Chem.* 278, 12029–12038.
- Lee, S.-R.**, Yang, K.-S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., and Rhee, S.G. (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 277, 20336–20342.
- Leikam, C.**, Hufnagel, A., Walz, S., Kneitz, S., Fekete, A., Müller, M.J., Eilers, M., Schartl, M., and Meierjohann, S. (2014). Cystathionase mediates senescence evasion in melanocytes and melanoma cells. *Oncogene* 33, 771–782.
- Letouzé, E.**, Martinelli, C., Loriot, C., Burnichon, N., Abermil, N., Ottolenghi, C., Janin, M., Menara, M., Nguyen, A.T., Benit, P., et al. (2013). SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell* 23, 739–752.
- Li, F.**, Wang, Y., Zeller, K.I., Potter, J.J., Wonsey, D.R., Donnell, K.A.O., Kim, J., Yustein, J.T., Lee, L.A., and Dang, C. V (2005). Myc Stimulates Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes and Mitochondrial Biogenesis Myc Stimulates Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes and Mitochondrial Biogenesis †. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6225–6234.
- Li, Q.K.**, Singh, A., Biswal, S., Askin, F., and Gabrielson, E. (2011). KEAP1 gene mutations and NRF2 activation are common in pulmonary papillary adenocarcinoma. *J. Hum. Genet.* 56, 230–234.
- Li, T.**, Kon, N., Jiang, L., Tan, M., Ludwig, T., Zhao, Y., Baer, R., and Gu, W. (2012). Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell* 149, 1269–1283.
- Liang, H.**, He, S., Yang, J., Jia, X., Wang, P., Chen, X., Zhang, Z., Zou, X., McNutt, M. A., Shen, W.H., et al. (2014). PTEN $\alpha$ , a PTEN Isoform Translated through Alternative Initiation, Regulates Mitochondrial Function and Energy Metabolism. *Cell Metab.* 19, 836–848.
- Lieberman, B.P.**, Ploessl, K., Wang, L., Qu, W., Zha, Z., Wise, D.R., Chodosh, L. a, Belka, G., Thompson, C.B., and Kung, H.F. (2011). PET imaging of glutaminolysis in tumors by 18F-(2S,4R)4-fluoroglutamine. *J. Nucl. Med.* 52, 1947–1955.
- Lister, A.**, Nedjadi, T., Kitteringham, N.R., Campbell, F., Costello, E., Lloyd, B., Copple, I.M., Williams, S., Owen, A., Neoptolemos, J.P., et al. (2011). Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. *Mol. Cancer* 10, 37.
- Liu, F.**, Fu, Y., and Meyskens, F.L. (2009a). MiTF regulates cellular response to reactive oxygen species through transcriptional regulation of APE-1/Ref-1. *J. Invest. Dermatol.* 129, 422–431.
- Liu, F.**, Gomez Garcia, A.M., and Meyskens, F.L. (2012a). NADPH oxidase 1 overexpression enhances invasion via matrix metalloproteinase-2 and epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2033–2041.

- Liu, G.-S.**, Peshavariya, H., Higuchi, M., Brewer, A.C., Chang, C.W.T., Chan, E.C., and Dusting, G.J. (2012b). Microphthalmia-associated transcription factor modulates expression of NADPH oxidase type 4: a negative regulator of melanogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1835–1843.
- Liu, H.**, Jiang, C.C., Lavis, C.J., Croft, A., Dong, L., Tseng, H.-Y., Yang, F., Tay, K.H., Hersey, P., and Zhang, X.D. (2009b). 2-Deoxy-D-glucose enhances TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells through XBP-1-mediated up-regulation of TRAIL-R2. *Mol. Cancer* 8, 122.
- Liu-Smith, F.**, Dellinger, R., and Meyskens, F.L. (2014). Updates of reactive oxygen species in melanoma etiology and progression. *Arch. Biochem. Biophys.*
- Locasale, J.W.** (2013). Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer* 13, 572–583.
- Lopez, G.Y.**, Reitman, Z.J., Solomon, D., Waldman, T., Bigner, D.D., McLendon, R.E., Rosenberg, S. A., Samuels, Y., and Yan, H. (2010). IDH1(R132) mutation identified in one human melanoma metastasis, but not correlated with metastases to the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 585–587.
- Lu, C.**, Ward, P.S., Kapoor, G.S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C.R., Khanin, R., Figueroa, M.E., Melnick, A., et al. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 483, 474–478.
- Lu, C.-W.**, Lin, S.-C., Chen, K.-F., Lai, Y.-Y., and Tsai, S.-J. (2008). Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance. *J. Biol. Chem.* 283, 28106–28114.
- Lu, C.-W.**, Lin, S.-C., Chien, C.-W., Lin, S.-C., Lee, C.-T., Lin, B.-W., Lee, J.-C., and Tsai, S.-J. (2011). Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 3 increases drug resistance and early recurrence in colon cancer. *Am. J. Pathol.* 179, 1405–1414.
- Lunt, S.Y.**, and Vander Heiden, M.G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 441–464.
- Luo, W.**, Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O’Meally, R., Cole, R.N., Pandey, A., and Semenza, G.L. (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 145, 732–744.
- Maciag, A.**, Sithanandam, G., and Anderson, L.M. (2004). Mutant K-rasV12 increases COX-2, peroxides and DNA damage in lung cells. *Carcinogenesis* 25, 2231–2237.
- Macintyre, A.N.**, and Rathmell, J.C. (2011). PKM2 and the tricky balance of growth and energy in cancer. *Mol. Cell* 42, 713–714.
- Majmundar, A.J.**, Wong, W.J., and Simon, M.C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell* 40, 294–309.
- Marchetti, P.**, Guerreschi, P., Kluza, J., and Mortier, L. (2014). Metabolic Features of Melanoma : A Gold Mine of New Therapeutic Targets ?. *Current Cancer. Drug Targets.* 14, 357-370
- Maresca, V.**, Flori, E., Briganti, S., Mastrofrancesco, A., Fabbri, C., Mileo, A.M., Paggi, M.G., and Picardo, M. (2008). Correlation between melanogenic and catalase activity in in vitro human melanocytes: a synergic strategy against oxidative stress. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21, 200–205.
- Marignac, V.M.**, Smith, S., Toban, N., Bazile, M., and Aloyz, R. (2013). Resistance to Dasatinib in primary chronic lymphocytic leukemia lymphocytes involves AMPK-mediated energetic re- programming. *Oncotarget* 4, 2550–2566.
- Marín-Hernández, A.**, Gallardo-Pérez, J.C., Ralph, S., Rodríguez, S., and Moreno-sánchez, R. (2009). HIF-1  $\alpha$  modulates energy metabolism in cancer cells by modifying the status of glycolytic enzymes. *Mini Rev Med Chem.* 9, 1–46.



- Martínez-Reyes, I.**, and Cuezva, J.M. (2014). The H<sup>+</sup>-ATP synthase: A gate to ROS-mediated cell death or cell survival. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 1099–1112.
- Mathupala, S.P.**, Rempel, a, and Pedersen, P.L. (2001). Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J. Biol. Chem.* 276, 43407–43412.
- Mathupala, S.P.**, Ko, Y.H., and Pedersen, P.L. (2009). Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin. Cancer Biol.* 19, 17–24.
- Maxwell, P.H.**, Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275.
- McFate, T.**, Mohyeldin, A., Lu, H., Thakar, J., Henriques, J., Halim, N.D., Wu, H., Schell, M.J., Tsang, T.M., Teahan, O., et al. (2008). Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 283, 22700–22708.
- Michaloglou, C.**, Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M. a M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAF600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720–724.
- Michaylira, C.Z.**, and Nakagawa, H. (2006). Hypoxic Microenvironment as a Cradle for Melanoma Development and Progression. *5*, 476–479.
- Michelakis, E.D.**, Webster, L., and Mackey, J.R. (2008). Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br. J. Cancer* 99, 989–994.
- Migneco, G.**, Whitaker-Menezes, D., Chiavarina, B., Castello-Cros, R., Pavlides, S., Pestell, R.G., Fatatis, A., Flomenberg, N., Tsirogos, A., Howell, A., et al. (2010). Glycolytic cancer associated fibroblasts promote breast cancer tumor growth, without a measurable increase in angiogenesis: evidence for stromal-epithelial metabolic coupling. *Cell Cycle* 9, 2412–2422.
- Mitra, D.**, Luo, X., Morgan, A., Wang, J., Hoang, M.P., Lo, J., Guerrero, C.R., Lennerz, J.K., Mihm, M.C., Wargo, J. a, et al. (2012). An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature* 491, 449–453.
- Mitsuishi, Y.**, Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., Yamamoto, M., and Motohashi, H. (2012). Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 22, 66–79.
- Miura, S.**, Shibasaki, M., Kasai, S., Yasuhira, S., Watanabe, A., Inoue, T., Kageshita, Y., Tsunoda, K., Takahashi, K., Akasaka, T., et al. (2014). A somatic mutation of the KEAP1 gene in malignant melanoma is involved in aberrant NRF2 activation and an increase in intrinsic drug resistance. *J. Invest. Dermatol.* 134, 553–556.
- Monsel, G.**, Ortonne, N., Bagot, M., Bensussan, a, and Dumaz, N. (2010). c-Kit mutants require hypoxia-inducible factor 1alpha to transform melanocytes. *Oncogene* 29, 227–236.
- Montagut, C.**, Sharma, S. V, Shioda, T., McDermott, U., Ulman, M., Ulkus, L.E., Dias-Santagata, D., Stubbs, H., Lee, D.Y., Singh, A., et al. (2008). Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res.* 68, 4853–4861.
- Mouret, S.**, Forestier, A., and Douki, T. (2012). The specificity of UVA-induced DNA damage in human melanocytes. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 155–162.

- Mullarky, E.**, Mattaini, K.R., Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Locasale, J.W. (2011). PHGDH amplification and altered glucose metabolism in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 1112–1115.
- Mullen, A.R.**, Hu, Z., Shi, X., Jiang, L., Boroughs, L.K., Kovacs, Z., Boriack, R., Rakheja, D., Sullivan, L.B., Linehan, W.M., et al. (2014). Oxidation of Alpha-Ketoglutarate Is Required for Reductive Carboxylation in Cancer Cells with Mitochondrial Defects. *Cell Rep.* 1–12
- Muller, P. A. J.**, and Vousden, K.H. (2013). P53 Mutations in Cancer. *Nat. Cell Biol.* 15, 2–8.
- Murphy, M.P.** (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.
- Nakajima, E.C.**, and Van Houten, B. (2013). Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens. *Mol. Carcinog.* 52, 329–337.
- Nazarian, R.**, Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Chen, Z., Lee, M., Attar, N., Sazegar, H., Nelson, S.F., et al. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468, 973–977.
- Nicklin, P.**, Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136, 521–534.
- Nioi, P.**, and Nguyen, T. (2007). A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 816–821.
- Omenn, G.S.**, Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Glass, a, Keogh, J.P., Meyskens, F.L., Valanis, B., Williams, J.H., et al. (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 334, 1150–1155.
- Papandreou, I.**, Cairns, R. a, Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 3, 187–197.
- Parmenter, T.J.**, Kleinschmidt, M., Kinross, K.M., Bond, S.T., Li, J., Kaadige, M.R., Rao, A., Sheppard, K.E., Hugo, W., Pupo, G.M., et al. (2014). Response of BRAF-Mutant Melanoma to BRAF Inhibition Is Mediated by a Network of Transcriptional Regulators of Glycolysis. *Cancer Discov.* 423–433.
- Parsons, D.W.**, Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807–1812.
- Pathak, R.K.**, Marrache, S., Harn, D. A., and Dhar, S. (2014). Mito-DCA: A Mitochondria Targeted Molecular Scaffold for Efficacious Delivery of Metabolic Modulator Dichloroacetate. *ACS Chem. Biol.* 9, 1178–1187.
- Pavel, S.**, van Nieuwpoort, F., van der Meulen, H., Out, C., Pizinger, K., Cetkovská, P., Smit, N.P.M., and Koerten, H.K. (2004). Disturbed melanin synthesis and chronic oxidative stress in dysplastic naevi. *Eur. J. Cancer* 40, 1423–1430.
- Pollard, P.J.**, Brière, J.J., Alam, N. A, Barwell, J., Barclay, E., Wortham, N.C., Hunt, T., Mitchell, M., Olpin, S., Moat, S.J., et al. (2005). Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2231–2239.
- Pollard, P.J.**, Spencer-Dene, B., Shukla, D., Howarth, K., Nye, E., El-Bahrawy, M., Deheragoda, M., Joannou, M., McDonald, S., Martin, A., et al. (2007). Targeted inactivation of fh1 causes proliferative renal cyst development and activation of the hypoxia pathway. *Cancer Cell* 11, 311–319.
- Porporato, P.E.**, Dhup, S., Dadhich, R.K., Copetti, T., and Sonveaux, P. (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front. Pharmacol.* 2, 49.

**Poulikakos, P.I.**, Persaud, Y., Janakiraman, M., Kong, X., Ng, C., Moriceau, G., Shi, H., Atefi, M., Titz, B., Gabay, M.T., et al. (2011). RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 480, 387–390.

**Puigserver, P.** (2005). Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1- $\alpha$ . *Int. J. Obes.* 29, S5–9.

**Quinlan, C.L.**, Orr, A.L., Perevoshchikova, I. V, Treberg, J.R., Ackrell, B. A, and Brand, M.D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* 287, 27255–27264.

**Raj, L.**, Ide, T., Gurkar, A.U., Foley, M., Schenone, M., Li, X., Tolliday, N.J., Golub, T.R., Carr, S. A, Shamji, A.F., et al. (2011). Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* 475, 231–234.

**Rempel, A.**, Mathupala, S.P., Griffin, C.A., Griffin, A., Hawkins, A.L., and Pedersen, P.L. (1996). Glucose Catabolism in Cancer Cells : Amplification of the Gene Encoding Type II Hexokinase Advances in Brief Glucose Catabolism in Cancer Cells : Amplification of the Gene Encoding. *Cancer Res.* 56, 2468–2471.

**Robinson, M.M.**, McBryant, S.J., Tsukamoto, T., Rojas, C., Ferraris, D. V, Hamilton, S.K., Hansen, J.C., and Curthoys, N.P. (2007). Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *Biochem. J.* 406, 407–414.

**Roche, T.E.**, and Hiromasa, Y. (2007). Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 830–849.

**Roesch, A.**, Vultur, A., Bogeski, I., Wang, H., Zimmermann, K.M., Speicher, D., Körbel, C., Laschke, M.W., Gimotty, P. A., Philipp, S.E., et al. (2013). Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell* 23, 811–825.

**Roydon Price E.**, Martin A. Horstmann, Audrey G. Wells, Kathy N. Weilbaeher, C., and Takemoto, M.W.L. and Fisher D.E. (1998).  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating Hormone Signaling Regulates Expression of microphthalmia, a Gene Deficient in Waardenburg Syndrome. *J. Biol. Chem.* 273, 33042–33047.

**Schwartzberg-bar-yoseph, F.**, Armoni, M., and Karnieli, E. (2004). The Tumor Suppressor p53 Down-Regulates Glucose Transporters GLUT1 and GLUT4 Gene Expression. *Cancer Res.* 64, 2627–2633.

**Scott, D. A.**, Richardson, A.D., Filipp, F. V, Knutzen, C. a, Chiang, G.G., Ronai, Z. a, Osterman, A.L., and Smith, J.W. (2011). Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. *J. Biol. Chem.* 286, 42626–42634.

**Selak, M. A.**, Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B., and Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7, 77–85.

**Semenza, G.L.**, Jiang, B., Leung, W., Passantino, R., Maire, P., Giallongo, A., Leung, S.W., and Concordet, J. (1996). Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1 and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Hypoxia Factor 1. *J. Biol. Chem.* 271, 32529–32537.

**Semenza, G.L.** (2011). Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1263–1268.

**Semenza, G.L.** (2013). Review series HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J. Clin. Invest.* 123, 3664–3671.

**Sharpless, E.**, and Chin, L. (2003). The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* 22, 3092–3098.  
**Shim, H.**, Dolde, C., Lewis, B.C., Wu, C.-S., Dang, G., Jungmann, R.A., Dalla-Favera, R., and Dang, C. V (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 6658–6663.

- Simon, J.D.**, Peles, D., Wakamatsu, K., and Ito, S. (2009). Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res.* *22*, 563–579.
- Smalley, K.S.M.**, Lioni, M., Palma, M.D., Xiao, M., Desai, B., Egyhazi, S., Hansson, J., Wu, H., King, A.J., Belle, P. Van, et al. (2009). Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E–mutated melanomas. *Mol. Cancer. Ther.* *7*, 2876–2883.
- Šmerc, A.**, Sodja, E., and Legiša, M. (2011). Posttranslational modification of 6-phosphofructo-1-kinase as an important feature of cancer metabolism. *PLoS One* *6*, e19645.
- Smolková, K.**, and Ježek, P. (2012). The Role of Mitochondrial NADPH-Dependent Isocitrate Dehydrogenase in Cancer Cells. *Int. J. Cell Biol.* 2012.
- Song, J.**, Su, H., Zhou, Y.-Y., and Guo, L.-L. (2014). Cyclooxygenase-2 expression is associated with poor overall survival of patients with gastric cancer: a meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* *59*, 436–445.
- Sonneaux, P.**, Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M.C., Verrax, J., Rabbani, Z.N., Saedeleer, C.J. De, Kennedy, K.M., Diepart, C., Jordan, B.F., et al. (2014). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* *124*, 3930–3942.
- Sosa, V.**, Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., and LLeonart, M.E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res. Rev.* *12*, 376–390.
- Strohecker, A.M.**, Guo, J.Y., Karsli-Uzunbas, G., Price, S.M., Chen, G.J., Mathew, R., McMahon, M., and White, E. (2013). Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors. *Cancer Discov.* *3*, 1272–1285.
- Sunaga, N.**, Oriuchi, N., Kaira, K., Yanagitani, N., Tomizawa, Y., Hisada, T., Ishizuka, T., Endo, K., and Mori, M. (2008). Usefulness of FDG-PET for early prediction of the response to gefitinib in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* *59*, 203–210.
- Sutendra, G.**, and Michelakis, E.D. (2013). Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front. Oncol.* *3*, 38.
- Suzuki, S.**, Tanaka, T., Poyurovsky, M. V, Nagano, H., Mayama, T., Ohkubo, S., Lokshin, M., Hosokawa, H., Nakayama, T., Suzuki, Y., et al. (2010). Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 7461–7466.
- Ternette, N.**, Yang, M., Laroyia, M., Kitagawa, M., O’Flaherty, L., Wolhuter, K., Igarashi, K., Saito, K., Kato, K., Fischer, R., et al. (2013). Inhibition of mitochondrial aconitase by succination in fumarate hydratase deficiency. *Cell Rep.* *3*, 689–700.
- Thornburg, J.M.**, Nelson, K.K., Clem, B.F., Lane, A.N., Arumugam, S., Simmons, A., Eaton, J.W., Telang, S., and Chesney, J. (2008). Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res.* *10*, R84.
- Tomlinson, I.P.M.**, Alam, N.A., Rowan, A.J., Barclay, E., Jaeger, E.E.M., Kelsell, D., Leigh, I., Gorman, P., Lamlum, H., Rahman, S., et al. (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat. Genet.* *30*, 406–410.
- Trisciuglio, D.**, Gabellini, C., Desideri, M., Ziparo, E., Zupi, G., and Del Bufalo, D. (2010). Bcl-2 regulates HIF-1alpha protein stabilization in hypoxic melanoma cells via the molecular chaperone HSP90. *PLoS One* *5*, e11772.
- Tsai, J.**, Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N.K., et al. (2008). Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3041–3046.

**Turcan, S.**, Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L. a, Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A.W.M., Lu, C., Ward, P.S., et al. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 483, 479–483.

**Vachtenheim, J.**, Novotna, H., and Ghanem, G. (2001). Transcriptional repression of the microphthalmia gene in melanoma cells correlates with the unresponsiveness of target genes to ectopic microphthalmia-associated transcription factor. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1505–1511.

**Vazquez, F.**, Lim, J.-H., Chim, H., Bhalla, K., Girnun, G., Pierce, K., Clish, C.B., Granter, S.R., Widlund, H.R., Spiegelman, B.M., et al. (2013). PGC1 $\alpha$  Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. *Cancer Cell* 23, 287–301.

**Vredeveld, L.C.W.**, Possik, P. a, Smit, M. a, Meissl, K., Michaloglou, C., Horlings, H.M., Ajouaou, A., Kortman, P.C., Dankort, D., McMahon, M., et al. (2012). Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev.* 26, 1055–1069.

**Wagle, N.**, Emery, C., Berger, M.F., Davis, M.J., Sawyer, A., Pochanard, P., Kehoe, S.M., Johannessen, C.M., Macconail, L.E., Hahn, W.C., et al. (2011). Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J. Clin. Oncol.* 29, 3085–3096.

**Wallace, D.C.** (2012). Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 685–698.

**Warburg, B.Y.O.**, and Wind, F. (1927). I. Killing-Off of Tumor Cells in Vitro .

**Ward, P.S.**, and Thompson, C.B. (2012). Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* 21, 297–308.

**Ward, P.S.**, Patel, J., Wise, D.R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B.D., Collier, H. a, Cross, J.R., Fantin, V.R., Hedvat, C. V, Perl, A.E., et al. (2010). The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 17, 225–234.

**Wasilewicz, M.P.**, Kołodziej, B., Bojułko, T., Kaczmarczyk, M., Sulzyc-Bielicka, V., Bielicki, D., and Ciepiela, K. (2010). Overexpression of 5-lipoxygenase in sporadic colonic adenomas and a possible new aspect of colon carcinogenesis. *Int. J. Colorectal Dis.* 25, 1079–1085.

**Wise, D.R.**, DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., et al. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18782–18787.

**Wong, J.Y.Y.**, Huggins, G.S., Debidda, M., Munshi, N.C., and De Vivo, I. (2008). Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 109, 394–402.

**Wu, P.**, Inskeep, K., Bowker-Kinley, M.M., Popov, K.M., and Harris, R. a (1999). Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. *Diabetes* 48, 1593–1599.

**Xiang, L.**, Xie, G., Liu, C., Zhou, J., Chen, J., Yu, S., Li, J., Pang, X., Shi, H., and Liang, H. (2013). Knock-down of glutaminase 2 expression decreases glutathione, NADH, and sensitizes cervical cancer to ionizing radiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 2996–3005.

**Xing F.**, Persaud Y, Pratilas CA, Taylor BS, Jnakiraman M, She QB, Gallardo H, Liu C, Merghoud T, Hefter B, Dolgalev I, Viale A, heguy A, De Stanchina E, Cobrinik D, Bollag G, Wolchok J, Houghton A, S.D. (2012). Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring V600E BRAF. *Oncogene* 31, 446–457.

- Xu, W.**, Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.-H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M.-T., et al. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* *19*, 17–30.
- Xuan, Y.**, Hur, H., Ham, I.-H., Yun, J., Lee, J.-Y., Shim, W., Kim, Y.B., Lee, G., Han, S.-U., and Cho, Y.K. (2014). Dichloroacetate attenuates hypoxia-induced resistance to 5-fluorouracil in gastric cancer through the regulation of glucose metabolism. *Exp. Cell Res.* *321*, 219–230.
- Yang, C.**, Sudderth, J., Dang, T., Bachoo, R.M., Bachoo, R.G., McDonald, J.G., and DeBerardinis, R.J. (2009). Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Res.* *69*, 7986–7993.
- Yuan, T.L.**, and Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* *27*, 5497–5510.
- Yun, J.**, Rago, C., Cheong, I., Pagliarini, R., Angenendt, P., Rajagopalan, H., Schmidt, K., Willson, J.K. V, Markowitz, S., Zhou, S., et al. (2009). Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science* *325*, 1555–1559.
- Yuneva, M.O.**, Fan, T.W.M., Allen, T.D., Higashi, R.M., Ferraris, D. V, Tsukamoto, T., Matés, J.M., Alonso, F.J., Wang, C., Seo, Y., et al. (2012). The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab.* *15*, 157–170.
- Zhuang, L.**, Scolyer, R. a, Murali, R., McCarthy, S.W., Zhang, X.D., Thompson, J.F., and Hersey, P. (2010). Lactate dehydrogenase 5 expression in melanoma increases with disease progression and is associated with expression of Bcl-XL and Mcl-1, but not Bcl-2 proteins. *Mod. Pathol.* *23*, 45–53.
- Ziech, D.**, Franco, R., Pappa, A., and Panayiotidis, M.I. (2011). Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* *711*, 167–173.
- de Zio, D.**, Cianfanelli, V., and Cecconi, F. (2013). New insights into the link between DNA damage and apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* *19*, 559–571.

# Figure Récapitulative

---

### **Figure Recapitulative: Le métabolisme dans les cellules cancéreuses.**

La plupart des cellules cancéreuses présente une augmentation de la glycolyse et une diminution de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Ce profil métabolique, nommé effet Warburg, s'accompagne d'une augmentation des enzymes impliquées dans l'incorporation du glucose (GLUTs) ou dans sa transformation via la voie glycolytique, telles que la Hexokinase II (HKII), la Phosphofructokinase (PFK). L'augmentation de l'expression ces protéines contribue à l'augmentation du flux glycolytique. Curieusement, ces cellules expriment également une isoforme spécifique de la pyruvate kinase, la PKM2, qui présente une activité enzymatique plus faible que l'isoforme PKM1 (couramment exprimé dans les cellules normales). Ainsi, l'expression de la PKM2 favorise l'accumulation des métabolites glycolytiques et leur orientation vers d'autres voies métaboliques. Par exemple, le glucose-6-phosphate peut partir vers la voie de pentose phosphates, grâce à l'enzyme Glucose 6-phosphate, souvent surexprimée dans les cellules cancéreuses. Cette voie, via l'obtention du ribose-5-phosphate, favorise la synthèse des acides nucléiques. De même, un autre métabolite glycolytique, le 3-phosphoglycerate, peut bifurqué vers la voie de la sérine, grâce à l'action de la PHGDH (Phosphoglycerate déshydrogénase). Cette voie, qui permet d'obtenir de la sérine, nécessaire à la synthèse des acides aminés, peut également favoriser l'obtention de la glycine capable d'entrer dans le cycle du folate et favoriser la synthèse des nucléotides.

Une autre caractéristique de l'effet Warburg est la diminution de l'oxydation du glucose au niveau mitochondrial. Ainsi, le pyruvate, provenant de la transformation du glucose via la glycolyse, est peu utilisée par la mitochondrie car la enzyme responsable de sa transformation en Acetyl-CoA, la Pyruvate déshydrogénase (PDH) est faiblement active dans ces cellules. En effet, les cellules cancéreuses surexpriment souvent l'enzyme pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), qui en phosphorylant la PDH, inhibe son activité enzymatique. De cette manière, le pyruvate est peu utilisé par les mitochondries et ce métabolite est plutôt transformé en lactate, grâce à la lactate déshydrogénase (LDH).

Les cellules cancéreuses présentent également une augmentation de la captation de la glutamine via des transporteurs comme la SLC5A. Tout d'abord, la glutamine est transformée en glutamate grâce à la glutaminase (GLS). Ce glutamate peut ensuite partir vers la voie de la proline et favoriser la synthèse des acides aminées ou peut être transformé en  $\alpha$ -ketoglutarate et entrer dans le cycle de Krebs. Une fois dans le cycle de Krebs, le  $\alpha$ -ketoglutarate permet l'obtention du citrate et la synthèse des acides gras, indispensables pour la prolifération. Une autre possibilité, suggère que l' $\alpha$ -ketoglutarate peut aussi être transformé en malate. Ce malate sort de la mitochondrie pour donner pyruvate, celui qui ensuite transformé en lactate. Cette réaction favorise la synthèse des acides aminés.

Il est important de préciser que l'ensemble de voies métaboliques actives dans les cellules cancéreuses peuvent être interconnectées. Par exemple, la bifurcation du 3-phosphoglycerate, vers la voie de la sérine, peut favoriser également la synthèse du  $\alpha$ -ketoglutarate. Celui-ci peut par la suite entrer dans le cycle de Krebs où il sera utilisé pour la synthèse du citrate dans le but de favoriser la production des acides gras



