



HAL
open science

Le métabolisme mitochondrial: un facteur clé dans la survie des cellules cancéreuses sous traitements anticancéreux

Anne Trinh

► To cite this version:

Anne Trinh. Le métabolisme mitochondrial: un facteur clé dans la survie des cellules cancéreuses sous traitements anticancéreux. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT: 2019LILUS071 . tel-03532466

HAL Id: tel-03532466

<https://theses.hal.science/tel-03532466>

Submitted on 18 Jan 2022

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.

UNIVERSITE DE LILLE – HAUTS-DE-FRANCE
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET SANTÉ

Thèse

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE BIOLOGIE – SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTÉ DE L'UNIVERSITÉ LILLE

Soutenue le 28 Novembre 2019

par ANNE TRINH

**Le métabolisme mitochondrial : un facteur clé dans la survie des
cellules cancéreuses sous traitements anticancéreux**

Thèse dirigée par :

M. le Professeur Philippe MARCHETTI

MEMBRES DU JURY COMPOSÉS PAR :

M. le Professeur Didier BOUSCARY	Université de Paris	<i>Rapporteur</i>
Mme. la Docteure Béatrice TURCQ	Université de Bordeaux	<i>Rapporteuse</i>
M. le Professeur Bruno QUESNEL	Université de Lille	<i>Examineur</i>
M. le Professeur Philippe MARCHETTI	Université de Lille	<i>Examineur</i>
M. le Docteur Jérôme KLUZA	Université de Lille	<i>Membre invité</i>



*Je dédie cette thèse à ma grand-mère,
Bà Ngoại thương của cháu.*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs de mon jury de thèse. Monsieur Didier Bouscary, je vous remercie pour votre accompagnement et vos conseils lors de mes comités de suivi individuels. Madame Béatrice Turcq, je tenais à vous remercier de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et pour vos précieux conseils.

Je remercie le Centre Hospitalier Universitaire de Lille et la Région Hauts-de-France pour l'allocation recherche qui m'a été accordée et sans laquelle je n'aurais pu réaliser cette thèse.

Je remercie le Pr. Bruno Quesnel pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour avoir suivi mon projet tout au long de ces années.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, le Professeur Phillippe Marchetti. Durant ces 4 années que j'ai passées au sein du laboratoire, vous avez toujours été disponible et vous m'avez accompagnée, soutenue et encouragée en toutes circonstances. Vous m'avez poussée à aller jusqu'au bout de mes idées et de mes projets. Je vous remercie pour votre bienveillance, pour votre patience, pour vos conseils, vos connaissances et votre confiance qui m'ont permis de progresser et de mûrir du master à la thèse. Et enfin, merci mille fois de m'avoir soutenue dans ce projet d'études de médecine que j'entreprends aujourd'hui.

Je remercie le Docteur Jérôme Kluza pour m'avoir formée et encadrée scientifiquement dès le master. Votre bonne humeur, votre passion pour la recherche, votre disponibilité, vos conseils scientifiques et techniques m'ont permis de débiter mon projet dans les meilleures conditions possibles et de m'épanouir dans ce projet de recherche.

Je tenais à remercier le Docteur Thierry Idziorek pour m'avoir formée aux expériences *in vivo*, pour sa disponibilité et pour sa bienveillance.

Je remercie le Professeur Bernard Sablonnière et Monsieur Delcroix pour leur bienveillance et pour leur soutien dans mon projet professionnel.

Un grand merci à Nathalie Jouy et Emilie Floquet pour leur aide scientifique tout au long de ce projet, mais également pour les bons moments partagés.

Je remercie les membres de mon équipe, ceux présents mais aussi ceux partis, qui m'ont accompagnée tout le long du master et de la thèse.

Un grand merci à Raeeka : tu as été présente dès le début de cette aventure (et pour un long moment encore j'espère). Ton soutien sans faille, ton côté pétillant, ton humour débordant, ta

bienveillance ont illuminé mes journées et m'ont permis de rester motivée durant ces 4 années. Merci pour cette amitié inestimable.

Merci à Corentin d'avoir été présent tout le long de ces années, pour ton amitié, pour tous les bons moments passés et tous ces fous-rires. Je me souviendrai longtemps de ton premier jour au labo et de l'épisode de la centri...

Merci à Quentin, le super infographiste du labo, dont l'humour très singulier et l'optimisme en toute circonstance m'ont permis de passer de très bons moments au laboratoire.

Merci à Salim et William, pour l'aide technique que vous m'avez apportée dans ce projet, mais également pour vos encouragements et tous ces bons moments que nous avons pu partager.

Merci à Stéphanie, ta gentillesse, ta bonne humeur quotidienne et tes mimiques ont permis d'égayer mes journées et de créer de bons moments de rires.

Merci à Nicolas, Darlène, Claudia, Karen, Samuel, Corentin, pour votre bonne humeur quotidienne, pour votre humour et tous ces bons moments passés ensemble.

Je remercie également nos ex-colocataires et membres de l'EA4483. Merci à Jules, Romain, Yara pour tous ces moments que nous avons pu partager ensemble.

Un grand merci à mes amis, Kévin, Lucas, Ninon, Elodie, Julien, Jaouad, Elise, Justine... pour tous les bons moments passés ensemble, pour m'avoir accompagnée et pour votre soutien.

Merci à Jimmy, tu m'as soutenue durant de nombreuses années et tu m'as aidée à tenir bon. Merci pour ta gentillesse, pour ta patience, pour ta présence.

Je remercie sincèrement et profondément mes parents, vous m'avez soutenue et encouragée dans tous mes projets depuis toujours. Je pourrais vous remercier pour mille et une choses, mais surtout, merci pour votre amour et pour avoir toujours cru en moi.

Un immense merci à ma famille, et en particulier merci à mes frères et sœur Jean-Michel, Guillaume et France.

Je dédie cette thèse à ma chère grand-mère, ma Ba Ngoai. Depuis que je suis née, tu n'as été que bienveillance, amour, tendresse, soutien, bonne humeur et gentillesse. Tu m'as montrée ce qu'était la force et le courage, l'humilité, l'altruisme, le partage. Tu m'as encouragée dans ma vie et dans mes études, et tu m'as toujours accueillie avec ce grand sourire qui restera gravé dans ma mémoire. « *Souviens-toi que je t'aime* ».

Résumé

Le métabolisme mitochondrial : un facteur clé dans la survie des cellules cancéreuses sous traitements anticancéreux

De nombreux arguments indiquent que les cellules cancéreuses présentent une glycolyse exacerbée quelle que soit la teneur en oxygène, un phénomène appelé « Effet Warburg » ou glycolyse aérobie. Cependant, contrairement à ce que pensait Otto Warburg, ce phénomène n'est pas secondaire à une altération irréversible du métabolisme des mitochondries. Plusieurs travaux ont récemment montré l'importance du métabolisme mitochondrial dans les différentes caractéristiques tumorigéniques des cellules cancéreuses, tels que la prolifération cellulaire, la survie, la résistance au stress oxydant et au stress réticulaire, mais également dans la résistance aux traitements anticancéreux. Dans un modèle de leucémie aigüe myéloïde, nous avons montré que la surexpression de la protéine GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper) permet de rediriger le métabolisme des cellules leucémiques vers la phosphorylation oxydative (OXPHOS) mitochondriale et d'augmenter le niveau de ROS mitochondriaux, les rendant alors sensibles aux molécules pro-oxydantes ciblant la mitochondrie. D'autre part, dans un modèle de mélanome muté BRAV^{600E}, les cellules résistantes aux inhibiteurs de BRAF (BRAFi) remodelent leur réseau mitochondrial autour du réticulum endoplasmique (RE), permettant la captation de calcium du RE dans les mitochondries et de limiter le stress réticulaire. Ces cellules présentent une augmentation de leur OXPHOS mitochondriale et de la production de ROS mitochondriaux. Afin de faire face au stress oxydatif, les cellules de mélanome mutées BRAF^{V600E} surexpriment le facteur NRF2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) afin d'augmenter la voie des pentoses phosphates et la production de glutathion. Les mitochondries peuvent également participer à la survie des cellules cancéreuses sous chimiothérapies en utilisant des voies métaboliques alternatives. Dans la leucémie myéloïde chronique présentant BCR-Abl, le traitement à l'Imatinib induit une diminution de l'activité glycolytique qui participe aux effets anti-tumoraux de ce médicament. Cependant, certaines cellules sont capables de survivre et de persister sous traitement au travers de l'utilisation d'autres substrats métaboliques tel que la glutamine. Nous avons alors montré que l'association de thérapies ciblées et d'inhibiteurs du métabolisme de la glutamine était efficace pour induire une coopérativité anti-métabolique affectant la survie de ces cellules dans différents modèles de résistance et de persistance. Nos différents travaux montrent que le métabolisme mitochondrial joue un rôle clé dans la tumorigénèse et la survie des cellules cancéreuses sous thérapies ciblées quelque soit le modèle. Par conséquent, l'utilisation d'inhibiteurs de la mitochondrie représente une cible thérapeutique intéressante en combinaison avec d'autres chimiothérapies afin d'induire une létalité synthétique et traiter les cancers.

Mots clés : métabolisme, mitochondrie, cancer, thérapies ciblées, coopérativité anti-métabolique, ciblage mitochondrial

Abstract

Mitochondrial metabolism : a key factor in cancer cell survival upon exposure to anticancer treatments

Numerous evidence has shown that cancer cells present an exacerbated glycolysis regardless of oxygen tension, the so-called « Warburg effect » or aerobic glycolysis. However, unlike Otto Warburg thought, this phenomenon is not a consequence of an irreversible alteration of mitochondrial metabolism. Many works have recently shown the significance of mitochondrial metabolism in the different tumorigenic features of cancer cells, such as cell proliferation, survival, oxidative stress and reticular stress resistance, but also in the resistance of anticancer treatments. In a model of acute myeloid leukemia, we have shown that GILZ (Glucocorticoid-Induces Leucine Zipper) protein overexpression rewires leukemic cell metabolism toward mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) and increases mitochondrial ROS levels, which makes them more sensitive to pro-oxidants molecules targeting mitochondria. Furthermore, in a BRAF^{V600E} mutated melanoma model, BRAF inhibitor resistant cells remodel their mitochondrial network near endoplasmic reticulum (ER), leading to calcium uptake in mitochondria to limit the ER stress. These cells display an increase in mitochondrial OXPHOS and ROS production. To cope with oxidative stress, melanoma cells overexpress the NRF2 protein (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like2) to induce an increase in the pentose phosphate pathway and to activate glutathion production. Mitochondria are also involved in cancer cell survival under chemotherapies exposure, by using alternative metabolic pathways. In chronic myeloid leukemia harboring BCR-Abl, Imatinib treatment induces a decrease in glycolytic activity which participate to the antitumor effects of this drug. However, some cells can survive and persist under Imatinib treatment through by using other metabolic substrates like glutamine. We have shown that targeted therapies and glutamine metabolism inhibitors combination is effective to induce an anti-metabolic cooperativity affecting cancer cell survival in different models of resistance and persistence. In different cancer cell types, we have shown the key role of mitochondrial metabolism in tumorigenesis and cancer cell survival upon exposure to targeted therapy treatments regardless of the model. Consequently, the use of mitochondrial inhibitors represents an interesting therapeutic target in association with other chemotherapies in order to induce a synthetic lethality and to treat cancers.

Key words: metabolism, mitochondria, cancer, targeted therapies, anti-metabolic cooperativity, mitochondrial targeting

Valorisation scientifique

André F*, **Trinh A***, Balayssac S, et al. Metabolic rewiring in cancer cells overexpressing the glucocorticoid-induced leucine zipper protein (GILZ): Activation of mitochondrial oxidative phosphorylation and sensitization to oxidative cell death induced by mitochondrial targeted drugs. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017;85:166-174.

Marchetti P, **Trinh A**, Khamari R, Kluza J. Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2018;1862(4):999-1005.

Khamari R*, **Trinh A***, Gabert PE, et al. Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):325.

**co-première auteure*

PRÉAMBULE

Parmi les nombreuses caractéristiques des cellules cancéreuses, tels que la résistance à la mort cellulaire ou l'évasion aux suppresseurs de tumeur, le changement de métabolisme est aujourd'hui vu comme une caractéristique émergente des cellules cancéreuses (Hanahan D et Weinberg RA, 2011). En 1956, Otto Warburg avait montré que des cellules cancéreuses issues d'ascite présentaient une forte activité glycolytique, et ce même en présence d'oxygène, un événement qu'il avait alors appelé « glycolyse aérobie », ou aujourd'hui connu comme l'effet Warburg. Par ailleurs, Otto Warburg avait émis l'idée que la respiration mitochondriale était alors altérée de manière irréversible, et que les cellules cancéreuses ne survivaient qu'au travers d'une glycolyse intense (*Warburg O, 1956*). De nombreux travaux ont montré à ce jour que les mitochondries des cellules cancéreuses restent fonctionnelles, et peuvent participer à la tumorigenèse. Le métabolisme mitochondrial joue également un rôle majeur dans l'efficacité des thérapies anticancéreuses. C'est notamment le cas des thérapies ciblées, dont l'inhibition de la glycolyse participe à leur efficacité anti-tumorale. Cependant, de par leur hétérogénéité et leur adaptabilité, les cellules cancéreuses sont capables de remodeler leur métabolisme et ainsi, de diminuer l'efficacité de certaines thérapies anticancéreuses. De nombreux articles ont montré l'importance de la mitochondrie dans la survie des cellules tumorales sous thérapies ciblées. Par exemple, dans le cas du mélanome muté BRAF^{V600E}, il a été montré que sous Vemurafenib, le remodelage du métabolisme mitochondrial participe à l'échappement des cellules au traitement. De par la flexibilité métabolique des cellules cancéreuses, il est donc important de cibler à la fois la glycolyse et les mécanismes compensatoires, notamment le métabolisme mitochondrial qui participe à leur survie et à l'échappement aux traitements, afin de cibler les cellules cancéreuses.

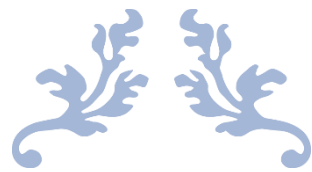


TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	7
Résumé.....	11
Le métabolisme mitochondrial : un facteur clé dans la survie des cellules cancéreuses sous traitements anticancéreux	11
Abstract	13
Mitochondrial metabolism : a key factor in cancer cell survival upon exposure to anticancer treatments.....	13
Valorisation scientifique.....	15
PRÉAMBULE.....	17
TABLE DES MATIÈRES	19
Abréviations	27
RÉSUMÉ DES FIGURES	31
Figures	33
Tableaux	34
INTRODUCTION	35
Partie 1 – Métabolisme et cancer	37
1. Le métabolisme : généralités	38
1.1. La glycolyse.....	39
Le glucose : principal carburant de la glycolyse	39
La voie des pentoses phosphate	40
o Mécanistique de la voie des pentoses phosphate	40
o Implication de la voie des pentoses phosphate dans les cancers.....	42
1.2. La phosphorylation oxydative mitochondriale.....	42
1.2.1. La chaîne de transport des électrons (ETC).....	43
2. L'effet Warburg	45
2.1. Historique	45
2.2. Les mécanismes moléculaires favorisant l'effet Warburg	46
☒ Implication du métabolisme du pyruvate dans le phénotype Warburg	48
o La pyruvate kinase.....	48
o L'axe PDK/PDH.....	49
☒ La lactate déhydrogénase.....	50
☒ HIF-1 α	50
3. L'acidose : une conséquence de l'effet Warburg.....	52
4. Rôles du métabolisme mitochondrial dans les cellules cancéreuses.....	55
4.1. Rôle des substrats pour alimenter l'OXPPOS mitochondriale	55
4.1.1. Dérégulation du transport mitochondrial du pyruvate dans les cancers.....	55

4.1.2.	Dérégulation du métabolisme de la glutamine dans les cancers.....	56
4.1.2.1.	Le transport de la glutamine	56
4.1.2.2.	Réactions anaplérotiques issues de la glutamine	57
4.1.2.3.	Ciblage du métabolisme de la glutamine dans les cancers.....	59
4.1.3.	Dérégulation du métabolisme des acides gras dans les cancers	60
4.1.3.1.	Dérégulation de la synthèse des acides gras.....	60
4.1.3.2.	Dérégulation de la FAO	62
4.1.3.3.	Dérégulation du transport des acides gras	62
5.	Les autres rôles de la mitochondrie dans les cancers	63
5.1.	Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose.....	63
5.2.1.	L'apoptose	63
5.2.2.	Les modifications morphologiques lors de l'apoptose.....	63
5.2.3.	Les évènements moléculaires de l'apoptose	64
5.2.4.	La voie intrinsèque de l'apoptose	64
5.2.5.	La voie extrinsèque de l'apoptose.....	65
5.2.6.	La dérégulation du processus apoptotique dans les pathologies : exemple des cancers	66
5.2.7.	Cross-talk entre métabolisme mitochondrial et mort cellulaire	68
5.2.	La production de ROS et les mécanismes de détoxification	69
5.3.	Mitochondries et stress réticulaire	73
6.	La régulation du métabolisme par les mitochondries dans les cancers.....	74
6.1.	Les voies de signalisation.....	74
6.1.1.	La voie MAPK.....	74
6.1.2.	La voie PI3K/Akt/mTOR	74
6.2.	Autres régulateurs : les glucocorticoïdes et GILZ	76
6.2.1.	Rôle et mode d'action des glucocorticoïdes	76
6.2.2.	Implication des glucocorticoïdes dans les cancers.....	76
6.2.3.	Implication des glucocorticoïdes dans le métabolisme des cellules cancéreuses	77
7.	Hétérogénéité tumorale et métabolisme	78
8.	Implications de mécanismes non métaboliques dans la résistance aux traitements anticancéreux	80
8.1.	Les cellules souches cancéreuses	80
8.1.1.	Les caractéristiques particulières des cellules souches cancéreuses.....	80
8.1.2.	Les marqueurs des cellules souches cancéreuses.....	80
8.1.2.1.	Les facteurs de transcription.....	80
8.1.2.2.	Les cascades de signalisation	81

8.1.2.3.	Le métabolisme des cellules souches cancéreuses.....	81
8.1.3.	Ciblage des CSCs	82
8.2.	La dormance tumorale et la maladie résiduelle minimale.....	83
8.2.1.	La maladie résiduelle minimale.....	83
8.2.2.	La dormance tumorale	85
8.3.	Rôle du microenvironnement dans la réponse et la résistance des cellules cancéreuses aux thérapies anticancéreuses.....	88
8.3.1.	Les cellules mésenchymateuses.....	88
8.3.1.1.	Les cellules stromales.....	88
8.3.1.2.	Les fibroblastes.....	88
8.3.1.3.	Les adipocytes	88
8.3.1.4.	Les ostéoblastes	90
8.3.2.	L'échappement au système immunitaire.....	90
Partie 2 – Implication du métabolisme dans l'efficacité et la résistance aux thérapies anticancéreuses : cas de la leucémie myéloïde chronique (LMC).....		
1.	L'hématopoïèse.....	92
1.1.	L'hématopoïèse normale.....	92
1.2.	Les cellules souches hématopoïétiques	92
2.	La leucémie myéloïde chronique	94
2.1.	Epidémiologie et caractéristiques cliniques.....	95
2.2.	Origine des cellules leucémiques	96
2.2.1.	A l'origine de la LMC : le chromosome de Philadelphie et la protéine de fusion BCR-Abl 96	
2.3.	Les voies de signalisation activées par BCR-Abl	97
3.	Les traitements de la leucémie myéloïde chronique	98
3.1.	Historique des traitements de la LMC.....	98
3.2.	L'Imatinib : la première thérapie ciblée et TKI	99
3.3.	L'arrêt de traitements des TKI chez les patients : to be or not to be ?.....	101
4.	Thérapies anticancéreuses et métabolisme des LMC.....	102
4.1.	Les thérapies anti-cancéreuses conventionnelles.....	102
4.2.	Les thérapies ciblées de BCR-Abl.....	102
4.3.	Les mécanismes de résistance aux TKI	103
4.3.1.	Les mécanismes de résistance dépendantes de BCR-Abl.....	104
4.3.1.1.	Les mutations ponctuelles du domaine kinase	104
4.3.1.2.	L'amplification des oncogènes	105
4.3.1.3.	Dérégulation des voies de signalisation	106
La voie STAT.....		106

La voie PI3K/Akt/mTORC1	106
La voie MAPK.....	107
4.3.2. Les mécanismes de résistance indépendants de BCR-Abl	107
4.3.2.1. Modifications des systèmes d'import/export des médicaments anticancéreux	107
4.3.2.2. Les mutations ponctuelles des voies de signalisation.....	107
4.3.3. Rôle des cellules souches leucémiques dans la résistance aux traitements.....	108
Partie 3 – Implication du métabolisme dans l'efficacité et la résistance aux thérapies anticancéreuses : cas du mélanome muté BRAF ^{V600E}	
1. Le mélanome muté BRAF ^{V600E}	110
Epidémiologie.....	110
2. Les stratégies thérapeutiques du mélanome BRAF ^{V600E}	110
2.1. Les thérapies ciblées de BRAF ^{V600E}	110
Effets métaboliques induits par les BRAFi.....	111
2.2. Les mécanismes de résistance aux MAPKi	112
2.2.1. Les mécanismes de résistances intrinsèques aux MAPKi.....	112
2.2.2. Les mécanismes de résistances extrinsèques aux MAPKi	112
2.2.2.1. Dérégulation des voies de signalisation	112
2.2.2.2. Les mutations ponctuelles des voies de signalisation.....	113
2.2.3. Implication des cellules souches cancéreuses de mélanome dans la résistance aux traitements.....	114
3. Le Vemurafenib : un arrêt de traitement envisageable ?	114
PROBLÉMATIQUE	118
RÉSULTATS ARTICLE 1.....	122
RÉSUMÉ ARTICLE 1 :	123
« Metabolic rewiring in cancer cells overexpressing the glucocorticoid-induced leucine zipper protein (GILZ) : activation of mitochondrial oxidative phosphorylation and sensitization to oxidative cell death induced by mitochondrial targeted drugs ».....	123
RÉSULTATS ARTICLE 2.....	134
RÉSUMÉ ARTICLE 2	135
« Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors ».....	135
RÉSULTATS ARTICLE 3.....	150
RÉSUMÉ ARTICLE 3	151
« Antimetabolic cooperativity with the FDA-approved Kidrolase and tyrosine kinase inhibitor to eradicate CML stem cell »	151
Table 1 – List of glycolytic enzymes, anti- and pro-apoptotic proteins antibodies for immunoblotting.	176
ARTICLE 4.....	178

RÉSUMÉ ARTICLE 4	179
Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors	179
DISCUSSION	188
1. Cibler les dysfonctions mitochondriales pour cibler les cellules cancéreuses	190
2. La coopérativité anti-métabolique : combinaison innovante de thérapies ciblées et de molécules ciblant le métabolisme pour éradiquer les cellules persistantes	194
2.1. L'association de thérapies ciblées et d'inhibiteurs du métabolisme	195
2.1.1. Thérapies ciblées et inhibiteurs de la mitochondrie	195
2.1.2. Thérapies ciblées et inhibiteurs du métabolisme des acides gras	196
2.1.3. Thérapies ciblées et inhibiteurs du métabolisme de la glutamine	196
3. La coopérativité métabolique : quels effets sur les cellules saines ?.....	197
Conclusion générale	199
PERSPECTIVES.....	200
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	204

Abréviations

1,3-GP : 1,3-Glucose Phosphate	BH3-only : Bcl-2 Homology 3-only
2-DG : 2-Déoxy-Glucose	BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
2-PG : 2-Phosphoglycérate	Bid : BH3-Interacting Domain death agonist
3-PG : 3-Phosphoglycérate	BNIP3 : Bcl-2 Interacting Protein 3
4E-BP1 : eIF4E-Binding Protein 1	BPTES : Bis-2-5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide
AA : Acide Aminé	BRAFi : Inhibiteurs de BRAF
ABCB1 : ATP-Binding Cassette B1	CHC : α -cyano-4-hydroxycinnamate
Abl : Abelson	Chk : Checkpoint Kinase
ACC : Acetyl-CoA Carboxylase	CLP : Progéniteur de Lignée Lymphoïde
ACF : Acriflavine	CMP : Progéniteur de Lignée Myéloïde
ACLY : ATP Citrate Lyase	CO₂ : Dioxyde de Carbone
ACP : Adénocarcinome Pulmonaire	COL5A1 : Collagen Type V Alpha 1 Chain
ACS : Acyl CoA Synthetase	COX : Cytochrome C Oxydase
ACSL : Acid-CoA Ligase	CPNPC : Cancer Pulmonaire Non A Petites Cellules
ADN : Acide Désoxyribonucléique	CPPC : Cancer Pulmonaire à Petites Cellules
ADP : Adénosine Di-Phosphates	CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
AG : Acide Gras	CSL : Cellule Souche Leucémique
AGPAT : Acyl-Glycerolphosphate Acyl-transférase	CT-CSH : CSH court terme
Akt : protéine kinase B	Cu/ZnSOD : Cu-Zn Superoxyde Dismutase
ALT : Alanine Aminotransférase	CXCL : Chemokine (C-X-C motif) Ligand
AOA : Acide Oxaloacétique	CXCR : CXCL Receptor
APAF1 : Apoptosis Activating Factor 1	DGAT : Diacyl-Glycérol Acyltransférase
ASCT2 : Alanine, Serine, Cysteine Transporter2	DHAP : Dihydroxyacétone Phosphate
AST : Aspartate Aminotransférase	DLAT : Dihydrolipoamide S-Acetyltransférase
ATGL : Adipose Triglyceride Lipase	DLK1 : Delta Like Non-Canonical notch Ligand1
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated	DNA-PK : Protéine Kinase dépendante de l'ADN
ATP : Adénosine Tri-Phosphates	DR : Death Receptor
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3 related	DTC : Cellule Tumorale Disséminée
Bcl-2 : B-Cell Lymphoma-2	E4P : Erythrose-4-Phosphate
Bcl-XL : B-Cell Lymphoma-Extra Large	
BCR : B-Cell Receptor	

EGFR : Epidermal Growth Factor-Receptor
EIM : Espace Inter-Mitochondrial
EMT : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
ETC : Electron Transport Chain
F6P : Fructose 6 Phosphate
FABP4 : Fatty Acid Binding Protein 4
FAC : Fibroblastes Associés aux Cancers
FADD : Fas-Associated Death Domain
FADH2 : Flavine adénine Dinucléotide
FAO : Fatty Acids Oxidation
FASN : Fatty Acid Synthase
FasR : Fas Receptor
FATP : Fatty Acid Transport Protein
FDA : Food and Drug Administration
FH : Fumarate Hydratase
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
FoxO3 : Forkhead O3
G6P : Glucose-6-Phosphate
G6PD : G6P Déshydrogénase
GAB2 : GRB2 Associated Binding Protein 2
GC : Glucocorticoïde
GILZ : Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper
GLS : Glutaminase
GLUT : Glucose Transporter
GMP : Progéniteur Myéломocytique
GPAT : Glycerol-3Phosphate-Acetyltransférase
GPNA : L-γ-Glutamyl-p-nitroanilide
GR : Récepteurs aux Glucocorticoïdes
GRB2 : Growth Factor Receptor-Bound Protein2
GSH : Glutathion réduit
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3
GSSG : Glutathion oxydé
H⁺ : Proton
H₂O : Eau
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HCO₃⁻ : Bicarbonate
HIF : Hypoxia-Induced Factor
IAP : Inhibitors of Apoptosis Proteins
IFN-α : Interferon-α
IGF : Insulin Growth Factor
IL : Interleukine
JAK : Janus Kinase
JARID1B : Jumonji- and AT-rich interaction domain 1B
Keap1 : Kelch ECH Associating Protein 1
LAL : Leucémie Aigüe Lymphoblastique
LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde
LAT1 : L-Amino Acid Transporter 1
LDH : Lactate Déshydrogénase
LIC : Cellule Initiatrice de Leucémie
LLC : Leucémie Lymphocytaire Chronique
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LT-CSH : CSH Long Terme
MAGL : Monoacylglycéról lipase
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP : Mort Cellulaire Programmée
MCT : Monocarboxylate Transporter
Mdm2 : Mouse Double Minute 2 Homolog
MDR1 : Multi-Drug Resistance 1
MEC : Matrice Extra-Cellulaire
MHC I : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de Classe I
MMI : Membrane Mitochondriale Interne
MMO : Microenvironnement de la Moelle Osseuse
MMP : Matrix Metallo-Proteases
MMRI : Maladie Minimale Résiduelle Indétectable

MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MPC : Mitochondrial Pyruvate Carrier
MPP : Progéniteur Multipotent
MRD : Maladie Résiduelle Minimale
mTORC1 : mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1
MTP : Pore de Transition Mitochondriale
MXI1 : MAX-Interacting Protein 1
Na⁺ : Sodium
NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NF- κ B : Nuclear Factor-Kappa B
NOX : NADPH Oxydase
NRF2 : Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2
NSG : NOD Scid Gamma
O₂ : Oxygène
O₂^{•-} : Anion Superoxyde
OCT4 : Octamer-Binding Transcription Factor 4
OH[•] : Radical Hydroxyl
OXPHOS : Oxidative Phosphorylation
p300-CBP : CREB-Binding Protein p300
PAP : Phosphohydrolase
PARP : Poly-ADP-Ribose-Polymérase
PD1 : Programmed Cell Death 1
PDGF-R : Platelet-Derived Growth Factor-Receptor
PDH : Pyruvate Déhydrogénase
PDK : Pyruvate Déhydrogénase Kinase
PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1
PEITC : Phenethyl Isothiocyanate
PEP : Phosphoénol Pyruvate

PGC-1 α : Peroxisome-proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α
PGK : Phosphoglycérate Kinase 1
P-gp : P-Glycoprotéine P
PI3K : Phospho-Inositol-3 Kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP3 : phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PK : Pyruvate Kinase
PKC : Protéine Kinase C
PKM : PK Isoforme M
PPP : Pentose Phosphate Pathway
Pro-B : Pro-Lymphocyte B
Pro-DC : Cellule Pro-Dendritique
Pro-NK : Pro-Natural Kiler
Pro-T : Pro-Lymphocyte T
Prx : Peroxiredoxine
pVHL : Protéine Von Hippel-Lindau
R5P : Ribose-5-Phosphate
RCC : Réponse Cytogénétique Complète
RE : Réticulum Endoplasmique
RHC : Réponse Hématologique Complète
RHEB : RAS Homolog Enriched in Brain
RM : Récurrence Moléculaire
RMC : Réponse Cytogénétique Majeure
RMM : Réponse Moléculaire Majeure
ROS : Reactive Oxygen Species
S6K1/2 : S6 Kinase 1
SCF : Stem Cell Factor
SDH : Succinate Déhydrogénase
SGK1 : Serum and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1
SIRT1 : Sirtuine 1
SLC : Solute Carrier
SOCS1 : Suppressor of Cytokine Signalling 1

SOD : Superoxide Dismutase

SOS : Son of Sevenless

SREBP1 : Sterol Regulator Element Binding 1

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

STATIP1 : STAT3-Interacting Protein 1

TGF : Tumor Growth Factor

TKI : Inhibiteurs de Tyrosine Kinase

TNF = Tumor Necrosif Factor

TRADD : TNF Receptor Associated Death Domain

TrxS2 : Thioredoxine 2

TSC2 : Tuberous Sclerosis Complex 2

TSC-22 : TGF β -stimulated clone-22 domain

ULK1 : Unc 51 like autophagy activating kinase 1

UPR : Unfolded-Protein Response

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

xCT : Transporteur de cystéine

α -KG : Alpha-Kétoglutarate



RÉSUMÉ DES FIGURES

Figures

Figure 1 – Ciblage des caractéristiques spécifiques des cellules cancéreuses

Figure 2 – Mécanistique de la voie des pentoses phosphates

Figure 3 – La chaîne de transport des électrons

Figure 4 – Mécanisme schématique d'un respirasome

Figure 5 – Rôle de HIF-1 dans la tumorigenèse

Figure 6 – Effets d'une diminution de la tension en O₂ sur le métabolisme cellulaire

Figure 7 – Rôle de HIF dans le métabolisme glycolytique et l'angiogenèse des cellules tumorale

Figure 8 – Les différents rôles de la glutamine et du glutamate dans le métabolisme cellulaire

Figure 9 – Transport et voies de signalisation impliquées dans le métabolisme de la glutamine

Figure 10 – Le métabolisme des acides gras et leur ciblage pour limiter la prolifération des cellules cancéreuses

Figure 11 – Les voies de signalisation de l'apoptose extrinsèque

Figure 12 – Déroulement de l'apoptose mitochondriale et mécanismes d'échappement

Figure 13 – Rôle de p53 dans les processus de tumorigenèse

Figure 14 – Les principaux mécanismes de production et de détoxification des ROS

Figure 15 – Implication des ROS dans le cancer

Figure 16 – Implication du facteur NRF2 dans la réponse antioxydante

Figure 17 – Causes et conséquences du stress réticulaire dans les cancers

Figure 18 – Mécanistique de la voie PI3K/Akt/mTOR

Figure 19 – Symbiose entre cellules cancéreuses hypoxiques et cellules cancéreuses oxygénées

Figure 20 – Modèle de la maladie résiduelle minimale dans les LMC traitées à l'Imatinib

Figure 21 – Mise en place d'un modèle de dormance tumorale de LMC

Figure 22 – Sensibilité des cellules leucémiques naïve et issue de dormance tumorale à différentes thérapies anticancéreuses

Figure 23 – L'hématopoïèse

Figure 24 – La contrôle qualité des mitochondries permet un auto-renouveaulement des CSH

Figure 25 – Progression pathologique de la leucémie myéloïde chronique

Figure 26 – L'origine des cellules souches leucémiques

Figure 27 – Implication des voies de signalisation activées par BCR-Abl dans le processus de leucémogénèse

Figure 28 – Structure chimique de l’Imatinib mesylate et mécanisme d’action

Figure 29 – Cinétique des effets métaboliques induits par un traitement à l’Imatinib sur la lignée cellulaire BCR-Abl⁺ K562

Figure 30 – Ensemble des mutations par substitution d’acides aminés du domaine kinase de BCR-Abl identifiés chez des patients résistants à l’Imatinib

Figure 31 – Les thérapies ciblées de seconde et troisième génération pour contrer les mécanismes de résistance aux TKI dans les LMC

Figure 32 – Traitements approuvés pour les patients présentant un mélanome métastatique non opérable

Figure 33 – Les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées dans le mélanome

Figure 34 – Implication des CSCs dans les processus de tumorigenèse

Figure 35 – Représentation de la survie sans progression de l’essai clinique coBRIM

Figure 36 – Modèle résumant le devenir et le phénotype métabolique sous MAPKi dans les cellules cancéreuses

Tableaux

Tableau 1 – Influence des enzymes de la glycolyse et du métabolisme mitochondrial sur l’effet Warburg

Tableau 2 – Ciblage du métabolisme de la glutamine par différents composés

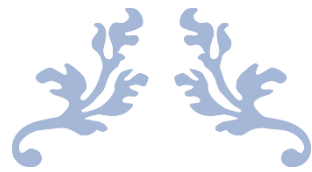
Tableau 3 – Rôle de du transporteur CPT1 dans les cancers

Tableau 4 – Stratégies et thérapies ciblant les CSCs

Tableau 5 – Les principaux mécanismes d’échappement au système immunitaire dans le mélanome

Tableau 6 – Tableau récapitulatif des meilleurs taux de réponses cytogénétique et hématologique observées

Tableau 7 – Exemples de molécules ciblant le métabolisme mitochondrial et leur implication dans différents cancers



INTRODUCTION

Partie 1 – Métabolisme et cancer

Chez l'homme, la tumorigenèse est un processus constitué de plusieurs étapes, où des altérations génétiques, telles que l'activation d'oncogènes et l'inhibition de suppresseurs de tumeur, vont conduire à la transformation de cellules humaines normales en cellules malignes. Il existe plus d'une centaine de types de cancers distincts, avec des sous-types présents au niveau d'organes spécifiques, et nombre d'entre eux sont associés au vieillissement, avec une incidence âge-dépendante. En 2005, Hanahan et Weinberg avaient décrit les caractéristiques communes des cellules cancéreuses issues des altérations génétiques comme étant l'échappement à l'apoptose, l'indépendance aux signaux de prolifération, l'insensibilité envers les signaux antiprolifératifs, une angiogenèse soutenue, un potentiel réplicatif limité et un potentiel invasif et métastatique (Hanahan D et Weinberg RA, 2005). Autrefois, le point de vue dans la recherche sur le cancer était réductionniste, c'est-à-dire qu'elle se concentrait uniquement sur les cellules cancéreuses : sur les gènes responsables de la tumorigenèse et sur les modifications biochimiques et biomoléculaires. De nos jours, il est connu que la biologie des cellules cancéreuses est bien plus complexe et hétérotypique : les tumeurs sont constituées d'un assemblage de types de cellules distinctes, en interaction directe ou indirecte avec la matrice extracellulaire et les différents types cellulaires du microenvironnement et du système immunitaire, qui peuvent alors participer à la progression tumorale et à leur potentiel métastatique.

D'autres caractéristiques furent par la suite ajoutées à celles précédemment citées, tels que l'échappement au système immunitaire, la résistance à la mort cellulaire, ou encore une dérégulation du métabolisme énergétique. Il s'avère que ces différentes caractéristiques peuvent aujourd'hui être ciblées par de nombreuses molécules pharmacologiques (**figure 1**) (Hanahan D et Weinberg RA, 2011). Le métabolisme particulier des cellules cancéreuses peut ainsi être une cible majeure. De plus, de nombreuses thérapies anticancéreuses conventionnelles ou ciblées induisent des effets anti-métaboliques participant aux effets anticancéreux.

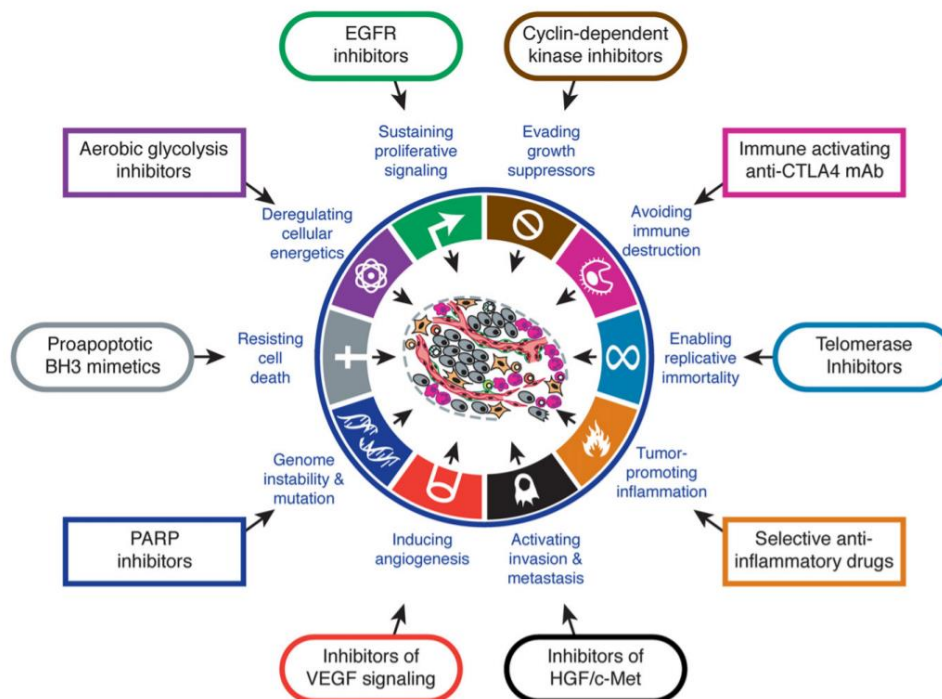


Figure 1 – Ciblage des caractéristiques spécifiques des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses présentent des caractéristiques particulières participant à la tumorigenèse, tels que l'échappement au système immunitaire, les mutations et l'instabilité génomique, la résistance à la mort cellulaire, l'évasion aux suppresseurs de tumeur ou encore la dérégulation du métabolisme cellulaire apparaît comme une nouvelle caractéristique. Ces différentes particularités peuvent être ciblées par des molécules pharmacologiques comme décrites (d'après Hanahan D et Weinberg RA, 2011).

1. Le métabolisme : généralités

Le métabolisme d'une cellule est défini par la somme de deux processus : le catabolisme et l'anabolisme. Durant le catabolisme, la cellule dégrade des composés complexes (glucides, lipides, protéines) en composés de base. A l'inverse, lors de l'anabolisme, la cellule fournit de nouveaux éléments pour produire de l'énergie sous forme d'ATP ou afin de fournir des éléments à la formation de nouveaux composés glucidiques, lipidiques et protéiques qui seront utilisés notamment lors de la prolifération cellulaire.

Dans une cellule, deux voies majeures permettent de produire de l'énergie et des macromolécules : la glycolyse et la phosphorylation oxydative (OXPHOS) mitochondriale. Le glucose est la première et principale source d'énergie pour la respiration cellulaire. Dans des conditions physiologiques, 70% de l'ATP est produit au travers de l'OXPHOS mitochondriale, et le reste est issu de la glycolyse. Cependant, l'utilisation d'une voie métabolique ou d'une autre dépend également du type cellulaire, de la croissance cellulaire et du microenvironnement, telle que la tension en oxygène. Dans les tissus présentant une forte activité mitochondriale tels que les myocytes ou les hépatocytes, il a été montré

qu'une augmentation de la disponibilité en oxygène (O_2) induit une diminution de l'activité glycolytique, alors qu'une diminution de la tension en O_2 , et donc de la quantité d' O_2 disponible pour l'OXPPOS, entraînera davantage une accélération de la glycolyse pour compenser (Chaudhry R et Varacallo M, 2019). Cette flexibilité métabolique a été observée dans des conditions physiologiques dans des cellules musculaires ou des cellules embryonnaires en hypoxie, qui adaptent leur métabolisme lorsque la disponibilité en O_2 est limitée en convertissant le glucose en lactate, mais avec une production d'ATP moins efficace (Smith RL et al., 2018).

1.1. La glycolyse

- ***Le glucose : principal carburant de la glycolyse***

La glycolyse est un processus métabolique ayant lieu au niveau du cytosol des cellules et est caractérisée par deux phases : une phase dite d'« investissement », où deux molécules d'ATP sont consommées, et une phase de « rente », où 4 molécules d'ATP et du NADH sont créés.

La glycolyse est régulée par plusieurs processus, dont la disponibilité en glucose au travers de la captation du glucose ou de la dégradation du glycogène en glucose. Il existe 14 types de transporteurs du glucose (GLUT). Parmi les principaux transporteurs, nous pouvons distinguer GLUT1 présent de manière ubiquitaire, mais surtout au niveau des cellules sanguines, de la barrière hémato-encéphalique et de la barrière hémato-placentaire. GLUT2 est retrouvé au niveau du foie, des cellules β du pancréas, du rein, des intestins. GLUT3 quant à lui est présent au niveau des neurones. GLUT4 est présent au niveau des adipocytes, du cœur et des muscles squelettiques (Wood IS et Trayhurn P, 2003).

Durant la première étape de la glycolyse, l'hexokinase ajoute un phosphate au glucose à partir d'une molécule d'ATP, donnant ainsi du glucose-6-phosphate (G6P) et libérant une molécule d'ADP et un proton H^+ . Cette phosphorylation permet de conserver le G6P au sein de la cellule, puisque celui-ci ne peut plus repasser au travers des membranes. La phosphoglucose isomerase isomérisé ensuite le G6P en fructose-6-phosphate (F6P), puis un phosphate est ajouté par le phosphofructokinase (PFK1) afin de former le fructose-1,6-biphosphate (F1,6P). Cette étape irréversible constitue l'étape limitante de la première étape. Le F1,6P est ensuite lysé par l'aldolase en dihydroxyacetone phosphate (DHAP) et en glyceraldehyde-3-phosphate (G3P). Le DHAP peut alors être catalysé en G3P par la triosephosphate isomerase. Ces 2 composés restent en équilibre l'un avec l'autre. A cette étape, à partir d'une molécule de glucose à 6 carbones sont alors créés 2 sucres à 3 carbones.

Lors de la seconde étape de la glycolyse, l'enzyme glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase métabolise le G3P en 1,3-biphosphoglycerate (1,3-GP) en réduisant une molécule de NAD^+ en NADH.

Le 1,3-GP est à son tour catalysé par la phosphoglycerate kinase en 3-phosphoglycerate (3-PG), produisant ainsi une molécule d'ATP par molécule de sucre à 3 carbones, soit 2 ATP au total. La phosphoglycerate mutase catalyse ensuite le 3-PG en 2-phosphoglycerate (2-PG), puis l'enolase le transforme en phosphoenolpyruvate (PEP). Le PEP sera à son tour catalysé de manière irréversible en pyruvate par la pyruvate kinase, qui phosphoryle également une molécule d'ADP en ATP (Bolaños JP et al., 2009).

Le pyruvate ainsi produit peut alors (1) emprunter la voie de la glycolyse anaérobie, où il sera catalysé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) et sortir de la cellule via les transporteurs monocarboxylates (MCTs) ou (2) rentrer dans la matrice mitochondriale par le mitochondrial pyruvate carrier (MPC), où il servira de substrat pour le cycle de Krebs. Dans les cellules non transformées, le devenir du pyruvate dépend de la teneur en O_2 , i.e l'absence d' O_2 oriente davantage le pyruvate vers la voie de la glycolyse anaérobie, alors que dans la plupart des cellules cancéreuses, le pyruvate est préférentiellement dégradé en lactate quelle que soit la teneur en O_2 , un phénomène appelé « effet Warburg » (Devic S, 2016).

Lors de la glycolyse, 2 molécules d'ATP sont consommées et 4 ATP et 2 NADH sont ensuite produits. Le NADH est recyclé en NAD^+ afin de faire fonctionner la glycolyse, grâce à l'OXPHOS mitochondriale pour les cellules en aérobie et grâce à la fermentation pour les cellules en anaérobie. Le glucose peut également être métabolisé au travers d'une voie branchée de la glycolyse : la voie des pentoses phosphates (PPP), afin de produire du ribose-5-phosphate pour la synthèse des nucléosides et générer du NADPH. Le NADPH peut alors être utilisé pour la synthèse des acides gras ou pour le contrôle redox afin de protéger les cellules du stress oxydant (Stincone A et al., 2015).

- ***La voie des pentoses phosphate***
 - **Mécanistique de la voie des pentoses phosphate**

La voie des pentoses phosphates (PPP), ou également appelée voie du phosphogluconate, est une voie branchée de la glycolyse dont les réactions ont lieu au niveau du cytosol des cellules. Cette voie métabolique ne permet pas la production d'ATP ni de NADH, mais permet de générer du NADPH, un cofacteur indispensable aux réactions réductrices de biosynthèse et pour lutter contre le stress oxydant. En effet, le NADPH est utilisé comme cofacteur de la glutathion réductase, qui réduit le glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH). Le GSH est utilisé par les cellules afin de maintenir l'état redox des cellules et lutter contre le stress oxydatif induits par les espèces réactives à l'oxygène (ROS), puisque qu'il peut être catalysé par la glutathion peroxydase pour éliminer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Outre la formation du NADPH, la voie des pentoses phosphates permet également de produire du ribose-5-phosphate (R5P) qui est un précurseur pour la synthèse des nucléotides, des

acides nucléiques et des coenzymes. Cette voie est formée de deux phases : la phase oxydative et la phase non-oxydative (**figure 2**) (Patra KC et Hay N, 2014).

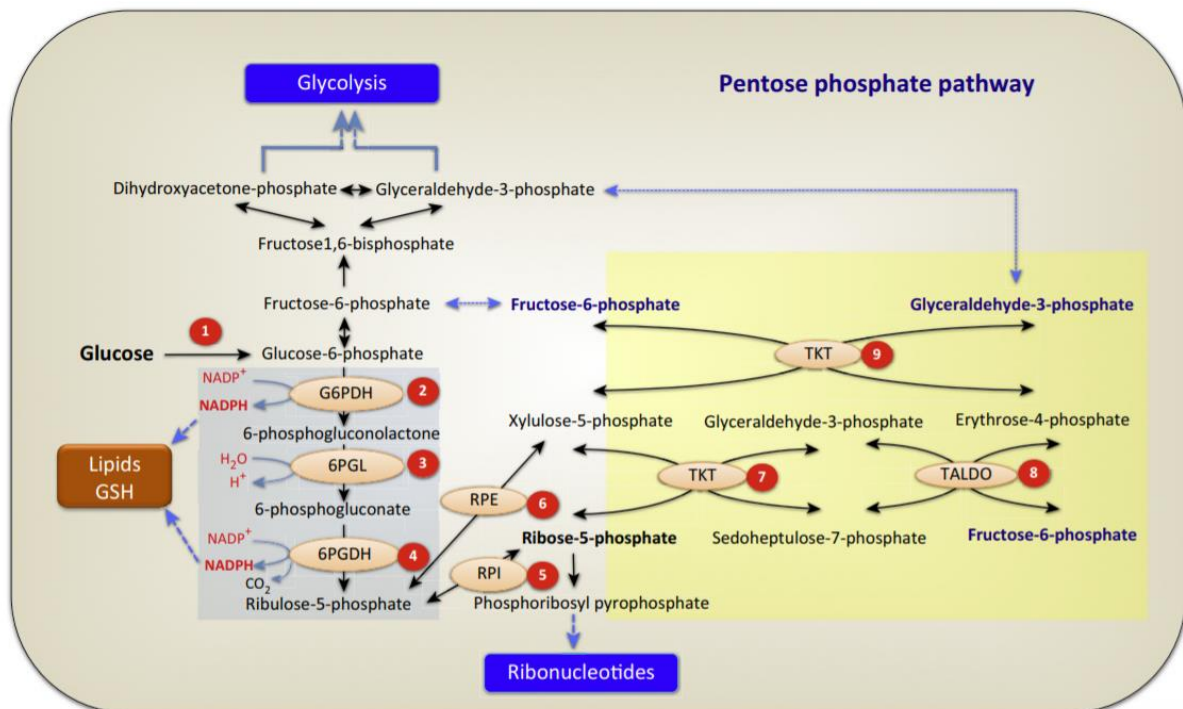


Figure 2 – Mécanistique de la voie des pentoses phosphates. Cette voie branchée de la glycolyse se divise en deux phases : la phase oxydative (en fond bleu) et la phase non oxydative (en fond jaune) (d'après Patra KC et Hay N, 2014).

Dans la phase oxydative, la première étape consiste en une oxydo-réduction du G6P en 6-phosphogluconolactone par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), ce qui génère également une molécule de NADPH. Le 6-phosphogluconolactone est ensuite hydrolysé en 6-phosphogluconate par la gluconolactonase, qui subira une réaction d'oxydo-réduction et une décarboxylation par la 6-phosphogluconate-dehydrogenase pour former du ribulose-5-phosphate et du NADPH. Il est à noter que l'augmentation de la concentration du NADPH permet d'inhiber le la G6P-deshydrogénase, ce qui empêche l'augmentation de la concentration du G6P pour la glycolyse. Lors de la phase non oxydative, le ribulose-5-phosphate peut être catalysé par (1) la ribulose-5-phosphate isomérase afin de donner du R5P ou par (2) la ribulose-5-phosphate-3-épipimérase afin de donner du xylulose-5-phosphate. Ces 2 molécules peuvent alors être transformées en G3P et en sedoheptulose-7-phosphate par la transkétolase, puis en F6P, erythrose-4-phosphate (E4P) et xylulose-5-phosphate par la transaldolase. L'E4P et le xylulose-5-phosphate peuvent être à nouveau catalysé par la transkétolase en G3P et en F6P, qui pourront rejoindre la voie de la glycolyse (**figure 2**). En outre, cette voie permet la formation de différents précurseurs pour diverses voies métaboliques : le ribose pour la synthèse des nucléotides, l'E4P pour la synthèse de précurseurs d'acides aminés aromatiques tels que la

phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Le NADPH ainsi formé quant à lui participe à la synthèse du glutathion et des lipides (Patra KC et Hay N, 2014).

- **Implication de la voie des pentoses phosphate dans les cancers**

Il a été montré que la voie des pentoses phosphates joue un rôle majeur dans la croissance cellulaire et les métastases, en fournissant des précurseurs de nucléotides pour la prolifération, et du NADPH pour la détoxification des ROS intracellulaires et le métabolisme catabolique. L'expression de la G6PD, une enzyme clé de la voie des pentoses phosphates, est fortement exprimée dans des tissus ayant une forte activité métabolique tels que le foie, les tissus adipeux, mais elle est aussi souvent retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers tels que le cancer du poumon non à petites cellules (Wang D et al., 2013), le lymphome B non hodgkinien (Chiche J et al., 2015), le cancer du côlon et ses métastases hépatiques (Liu K et al., 2017) ou le mélanome (Najera L et al., 2019). Cette enzyme est régulée par le ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$: le NADPH régule négativement son activité, alors que le NADP^+ est nécessaire pour avoir une bonne conformation et pour son activité enzymatique. De ce fait, l'activité enzymatique de la G6PD est élevée dans les cellules cancéreuses puisque celles-ci consomment beaucoup de NADPH. De plus, les voies de signalisation oncogéniques telles que les voies PI3K/Akt, Ras et Src, qui sont souvent suractivées dans les cellules cancéreuses, peuvent induire une activation de la G6PD par des mécanismes post-transcriptionnels (Patra KC et Hay N, 2014). Dans un modèle de cancer de la tête et du cou squameux, il a été montré que l'inhibition de la G6PD par la polydatin, un précurseur naturel du resveratrol, permet d'induire *in vitro* une augmentation de la production de ROS, un blocage du cycle cellulaire en phase S, une inhibition de l'invasion et un stress réticulaire conduisant à l'apoptose (Mele L et al., 2018). *In vivo* dans un modèle de métastase orthotopique de cancer de la langue, la polydatin induit une diminution de la croissance tumorale et des métastases au niveau des ganglions lymphatiques (Mele L et al., 2018).

1.2. La phosphorylation oxydative mitochondriale

La mitochondrie est définie comme étant la « centrale énergétique » de la cellule. En effet, son rôle majeur est de produire de l'ATP via la phosphorylation oxydative mitochondriale. Ainsi, le pyruvate produit au niveau de la glycolyse peut être transformé en lactate pour régénérer le NAD^+ , ou rentrer dans la mitochondrie par les transporteurs MPC (*mitochondrial pyruvate carrier*). Le MPC est un complexe oligodimérique constitué de deux protéines, MPC1 et MPC2, situé au niveau de la membrane mitochondriale interne (MMI). Cette étape d'import est nécessaire pour l'oxydation mitochondriale du pyruvate et les réactions de carboxylation permettant de fournir les intermédiaires nécessaires au cycle de Krebs (Bender T et Martinou JC, 2016).

Au niveau de la mitochondrie, le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) joue un rôle majeur puisqu'il contrôle la quantité de carbones dérivés du pyruvate qui sera oxydée via le cycle de Krebs. Ce complexe permet une décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA. Il est constitué par 3 sous unités catalysant 3 réactions successives à l'aide de cofacteurs : (1) la pyruvate déshydrogénase, parfois appelée pyruvate décarboxylase ou E1, (2) la dihydrolipoamide-S-Acétyltransférase (DLAT) ou E2 et (3) la dihydrolipoyl-déshydrogénase qui est une oxydo-réductase. L'activité du complexe de la PDH est contrôlée par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), qui rend la PDH inactive lorsqu'elle la phosphoryle. Une fois le pyruvate catalysé en acétyl-CoA, il rentre alors dans le cycle de Krebs, constitué d'une série de dix réactions enzymatiques. Ces réactions sont catalysées par la citrate synthase, l'isocitrate déshydrogénase, l'aconitase, l' α -KG déshydrogénase, la succinyl-CoA synthétase, la succinate déshydrogénase, le fumarase et le malate déshydrogénase. La fonction première du cycle de Krebs est de générer des équivalents réducteurs, tels que le NADH et le FADH₂, qui serviront alors de transporteurs d'électrons pour la chaîne de transport des électrons (ETC) pour faire fonctionner l'OXPHOS et produire de l'ATP (Roy Chowdhury S et Banerji V, 2018).

1.2.1. La chaîne de transport des électrons (ETC)

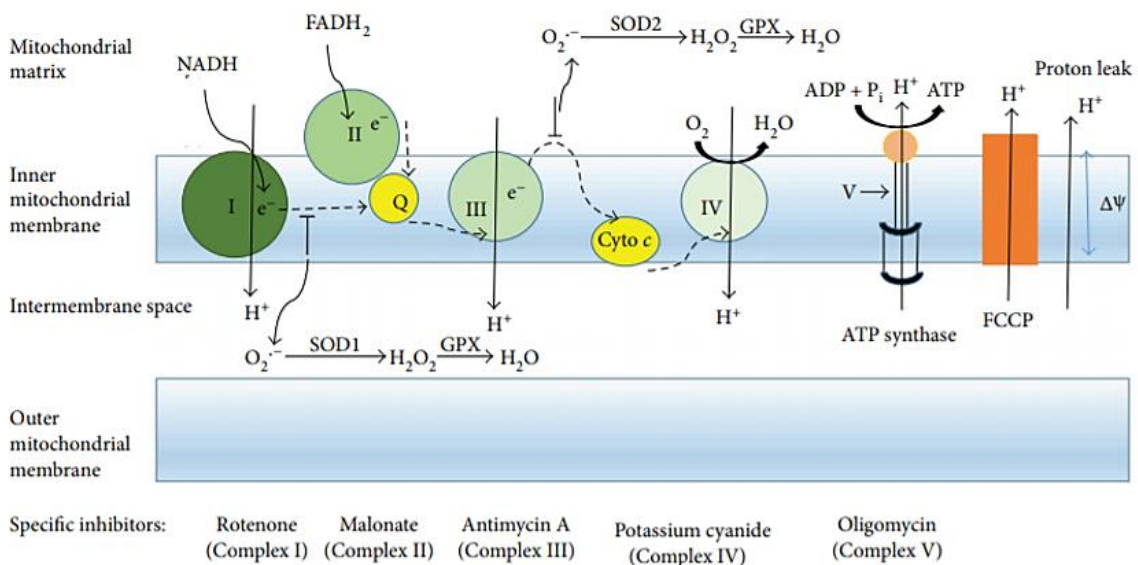


Figure 3 – La chaîne de transport des électrons. Durant la respiration mitochondriale, les électrons (e⁻, représentés par les flèches en pointillées) sont transportés au travers de l'ETC située au niveau de la MMI. Les e⁻ apportés par le NADH et FADH₂ rentrent dans l'ETC au travers des complexes I et II respectivement. De l'énergie est alors libérée par les complexes I, III et IV du fait du potentiel redox lorsque les électrons passent d'un complexe à un autre et transfère les H⁺ de la matrice mitochondriale à l'EIM. Le gradient de potentiel électrochimique généré par le transfert des H⁺ permet de générer une force proto-motrice, qui sera utilisée par l'ATP synthase (complexe V) afin de générer de l'ATP et de restituer les H⁺ à la matrice. Les différents complexes de l'ETC peuvent être inhibés de manière spécifique par différentes molécules (d'après Roy Chowdhury S et Banerji V, 2018).

De manière schématique, l'ETC est composée de 4 complexes : le complexe I ou NADH-coenzyme Q oxydoréductase, le complexe II ou succinate-coenzyme Q oxydoréductase, le complexe III ou coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase et le complexe IV ou cytochrome c oxydase. Le coenzyme Q, ou ubiquinone, et le cytochrome c servent de transporteurs mobiles de la chaîne respiratoire. Pour faire fonctionner l'ETC, le NADH formé dans la matrice mitochondriale cède ses équivalents réducteurs au complexe I, alors que le FADH₂ cède ses équivalents réducteurs au complexe III. Ces e⁻ cheminent alors jusqu'à l'O₂ moléculaire via les coenzyme Q, le complexe III, le cytochrome c et le complexe IV (**figure 3**) (Roy Chowdhury S et Banerji V, 2018).

Le transfert des électrons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire mitochondrial est accompagné d'un efflux d'ions H⁺ via les complexes I, III et IV. Cette force proto-motrice génère alors un gradient de charges (de par le mouvement des ions positifs au travers de la MMI, la face matricielle est chargée négativement) et un gradient de pH (la matrice devient plus basique). L'ATP-synthase, ou complexe V ou FoF₁, est constitué de 2 sous-unités ; le canal Fo transmembranaire laisse passer les protons, et la sous-unité F₁ qui contient le site catalytique permet de générer de l'ATP à partir de l'ADP et d'une molécule de phosphate. La synthèse d'ATP est rendue possible grâce au gradient électrochimique de protons qui fournit l'énergie nécessaire à l'ATP synthase. Il est à noter que 3 protons sont nécessaires pour la synthèse d'une molécule d'ATP. Au niveau de la MMI, des anions superoxydes (O₂^{•-}) peuvent être générés comme produits dérivés de l'ETC et être relargués au niveau de la matrice mitochondriale ou le cytosol via le pore de transition mitochondrial (MPTP) (figure 4) (Roy Chowdhury S et Banerji V, 2018).

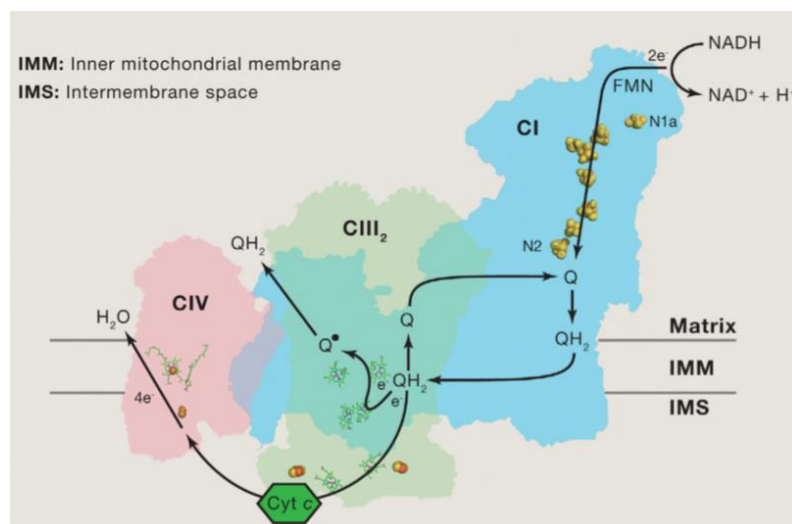


Figure 4 – Mécanisme schématique d'un respirasome. Les complexes I (CI), III dimérique (CIII₂) et IV (CIV) couplent l'oxydation du NADH à la pompe à protons au travers de la MMI afin de générer un gradient pour faire fonctionner l'ATP synthase. Le transfert d'e⁻ entre les 3 complexes est médié par l'ubiquinone et le cytochrome c portant 2 e⁻ (d'après Melber A et Winge DR, 2016).

La formation des complexes mitochondriaux est cependant bien plus complexe *in vivo*. Il a été montré qu'une mutation du complexe III entraînant un défaut de celui-ci pouvait altérer l'activité du complexe I (Lamantea E et al., 2002). D'autres études ont montré que cette observation pouvait être étendue à d'autres complexes, puisque la perte ou la dégradation du complexe IV ou du cytochrome c induit également la dégradation du complexe I (revue par Enríquez JA, 2016), montrant ainsi une association possible de ces complexes entre eux. En 1963, la notion d'« oxysome » fut introduite et définie comme étant une unité fonctionnelle pour le transfert d'électrons et l'OXPPOS (Chance B et al., 1963). Au niveau de la mitochondrie, les complexes du système OXPPOS sont associées à des facteurs de stabilisation (tels que les différentes isoformes de la sous-unité 7A de la cytochrome c oxydase (COX7A) ou la protéine induite par l'hypoxie HIGD1 et 2) afin de former des structures supramoléculaires stables et fonctionnelles comprenant deux ou trois des complexes I, III et IV : les supercomplexes mitochondriaux ou respirasome. Ils consistent en 44 sous-unités du complexe I, 22 sous-unités du complexe III et 14 sous-unités du complexe IV. Le complexe II et le complexe V ou ATP-synthase sont quant à eux souvent observés sous forme libre dans les mitochondries (Melber A et Winge DR, 2016). L'assemblage de ces supercomplexes est dynamique, et les différents complexes peuvent fluctuer entre un état libre dans la MMI ou un état lié sous forme de respirasome, en fonction de la composition de la MMI, et notamment la présence de cardiolipine qui influe sur la fluidité de la membrane lipidique (Zhang M et al., 2002).

2. L'effet Warburg

2.1. Historique

En 1956, Otto Warburg publie un article dans lequel il fait l'observation suivante : les cellules cancéreuses d'ascites de souris consomment $7 \text{ mm}^3 \text{ d'O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ et produisent par fermentation $60 \text{ mm}^3 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ d'acide lactique. En convertissant ces données en équivalents énergétiques, Warburg montre que les cellules cancéreuses produisent autant d'énergie au travers de la fermentation, *i.e.* de la transformation du pyruvate issu de la glycolyse en lactate, qu'au travers de la respiration, alors que les cellules saines produisent davantage d'énergie au travers de la respiration que de la fermentation. Il émet alors l'idée que les cellules cancéreuses présentent une activité glycolytique exacerbée pour répondre à une augmentation de leurs besoins énergétiques, et ce, même en présence d' O_2 , leur permettant ainsi de proliférer de manière intensive (Warburg O, 1956). Cette théorie sera alors connue sous le nom de « glycolyse aérobie » ou « d'effet Warburg ». Selon Warburg, si les cellules cancéreuses produisent aussi peu d'énergie au travers de la respiration mitochondriale, c'est que celle-ci est altérée de manière irréversible en conséquence d'une diminution de la consommation en O_2 des cellules, ou

d'une cassure entre la formation d'ATP et la respiration mitochondriale. Par ailleurs, il cite que l'utilisation de l'arsenic, un poison spécifique de la chaîne respiratoire mitochondriale, est capable d'induire des cancers (Warburg O, 1956). Cependant, dès 1957, l'équipe de Weinhouse démontre que les mitochondries des cellules tumorales restent fonctionnelles. Ils montrent alors que des tumeurs greffées dans des souris sont capables de capter des acides gras marqués au carbone 14 et de les incorporer *in vivo*, et que les cellules cancéreuses peuvent utiliser les acides gras pour leur respiration *in vitro* (Medes G, Paden G et Weinhouse S, 1957). De nombreux travaux ont aujourd'hui montré que, en dépit d'une activité glycolytique intense, et ce même en présence d'O₂, les mitochondries des cellules cancéreuses restent fonctionnelles et peuvent participer activement à la tumorigenèse (revue par Porporato PE et al., 2018). Bien que les mutations des enzymes du cycle de Krebs ne prédisposent pas au cancer, l'isocitrate déhydrogénase (IDH), la succinate déhydrogénase (SDH) ou de la fumarate hydratase (FH) font exception puisque les mutations de ces enzymes sont impliquées dans le développement de leucémies aigües (Rakheja D et al., 2012), de parangliome et de carcinome rénal respectivement (King A et al., 2006).

Dans des cellules non transformées et différenciées ayant un faible niveau de division cellulaire, les cellules métabolisent le glucose en CO₂ et H₂O au travers de la glycolyse et du cycle de Krebs, afin de générer de l'ATP par l'O₂PHOS. Cependant, les cellules saines doivent parfois augmenter leur division cellulaire de manière rapide tels que dans les réponses immunitaires aux antigènes, la régénération tissulaire ou le développement embryonnaire. Les cellules cancéreuses partagent également ces caractéristiques. Afin de suppléer à leurs besoins énergétiques et anaboliques pour proliférer, les cellules cancéreuses doivent synthétiser des lipides pour les membranes, des acides aminés pour former des protéines et des acides nucléiques pour l'ADN. Pour ce faire, les cellules cancéreuses doivent privilégier les voies anaboliques. La métabolisation du glucose par la glycolyse permet la formation des intermédiaires G6P, F6P et G3P, et peut fournir les macromolécules via la voie des pentoses phosphates et de la voie du ribose-5-P. Le 3-PG quant à lui peut produire des AA au travers de la voie de la Sérine et via la transamination du pyruvate en alanine. Le G3P et le 3-PG peuvent également participer à la synthèse des phospholipides pour la fabrication des membranes (Lunt SY et Vander Heiden MG, 2011).

2.2. Les mécanismes moléculaires favorisant l'effet Warburg

Les cellules cancéreuses présentent une captation et une métabolisation accrue du glucose au travers de la glycolyse aérobie, en partie grâce à la surexpression de c-myc (Miller DM et al., 2012) et de HIF-1 α (Courtney R et al., 2015) qui stimulent à leur tour des enzymes glycolytiques tels que l'hexokinase

II, la lactate déshydrogénase, la pyruvate kinase et la pyruvate déshydrogénase kinase. Ces enzymes permettent de diriger le pyruvate vers la formation du lactate et de réduire son entrée au sein de la mitochondrie. L'expression de nombreuses enzymes glycolytiques sont ainsi modifiés et participent à la tumorigénèse (**tableau 1**).

En effet, les cellules cancéreuses vont diminuer l'entrée du pyruvate dans les mitochondries, ce qui diminue la conversion du pyruvate en acetyl-coA et ralentie le cycle de Krebs. Parmi les mécanismes responsables de la diminution de l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie, il a été montré que l'augmentation de l'expression de la LDH-A (Feng Y et al., 2018) et la diminution de l'expression de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase (PKM2) (Dayton TL et al., 2016) sont impliquées dans l'induction de l'effet Warburg. La diminution de l'expression de PKM2 permet de rediriger les intermédiaires glycolytiques vers les voies branchées de la glycolyse, telles que la voie des pentoses phosphates afin de favoriser la production de NADPH, et la voie de la synthèse de la sérine (Dayton TL et al., 2016).

Gene Products	Function	Toward the Warburg Effect
GLUT1	Increase in glucose uptake to promote glycolysis	Positive
LDH-A	Hydrogenation of pyruvate to lactate in lactic acid fermentation	Positive
GAPDH	Catalyzing dehydrogenation of GAP to 1,3-BPG in glycolysis	Positive
MCT4	Efflux of lactate	Positive
PDH	Catalyzing oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-CoA	Negative
PDK1	Phosphorylating PDH for its inhibition	Positive
ISCU 1/2	Facilitating the assembly of aconitase and enzymes of the mitochondrial complex I for their function	Negative
MXI1	Inhibiting c-Myc transcription activity by competing for MAX, a supporting protein to c-Myc	Positive
PGC-1 α	Inducing the expression of transcription regulators for mitochondrial biogenesis	Negative
BNIP3	Interacting with Bcl-2 to dissociate Beclin-1 from Bcl-2 for mitophagy	Positive
PKM2	Regulating glycolytic flux and supply G6P to the PPP	No influence
G6PD	Catalyzing the conversion of G6P to 6-phospho-glucono-1,5-lactone, and functioning as a rate-limiting enzyme for the PPP	No influence

Tableau 1 – Influence des enzymes de la glycolyse et du métabolisme mitochondrial sur l'effet Warburg (d'après Nagao A et al., 2019).

- **Implication du métabolisme du pyruvate dans le phénotype Warburg**

- **La pyruvate kinase**

Bien que de nombreux mécanismes participent aux modifications métaboliques au niveau des cellules cancéreuses, la synthèse et le métabolisme du pyruvate jouent un rôle central dans ces changements.

La 10^{ème} et dernière étape de la glycolyse est catalysée par la pyruvate kinase, qui est une phosphotransférase catalysant la réaction $PEP + ADP \rightarrow \text{pyruvate} + ATP$. Chez les mammifères, cette enzyme est codée par 2 gènes qui peuvent chacun donner 2 isoformes : le gène PKLR code pour les isoformes PKR et PKL, et le gène PKM code pour les isoformes PKM1 et PKM2. L'enzyme PKR est exprimée dans les globules rouges, alors que PKL est exprimée au niveau du foie et certaines cellules du pancréas, des intestins et des reins. L'isoforme PKM1 est une enzyme tétramérique constitutivement active qui est exprimée dans les tissus adultes différenciés nécessitant beaucoup d'ATP, tels que le cœur, les muscles et le cerveau. L'isoforme PKM2 est quant à elle exprimée principalement durant l'embryogenèse, la régénération et au niveau des tissus adultes tels que la rate, les poumons, où son activité est très importante dans les cellules proliférant activement (Tsutsumi H et al., 1988).

A ce jour, la plupart des tumeurs étudiées tels que le cancer de la prostate (Wong N et al., 2014) ou le cancer colorectal (Zhou CF et al., 2012) ont montré une surexpression de PKM2 sous contrôle de l'oncoprotéine c-Myc (Kim JW et al., 2004), suggérant ainsi un avantage sélectif de cette isoforme. En effet, une étude de méta-analyse regroupant 25 publications scientifiques ont montré que l'expression de PKM2 était corrélée à un mauvais pronostic dans et à une survie globale défavorable dans les cancers du sein, le carcinome squameux de l'œsophage, le carcinome hépatocellulaire et le cancer de la vessie, et à une mauvaise survie globale dans les cancers du pancréas et de l'estomac (Zhu H et al., 2017). Des auteurs ont émis l'hypothèse que le niveau d'activité enzymatique de PKM2 pourrait être une réponse adaptative aux différents besoins métaboliques de la cellule : lors de la prolifération cellulaire, l'activité de PKM2 diminue alors que durant les phases d'initiation et de progression tumorale, son activité augmente. Notamment, lorsque la tumeur se forme au niveau d'un site primaire ou d'un site métastatique, elle doit être capable de croître au niveau d'un microenvironnement différent, voire inapproprié, et faire face à une mauvaise vascularisation ou à un stress nutritif qui peuvent limiter sa croissance. Les cellules cancéreuses nécessitent donc un programme métabolique adapté leur permettant de synthétiser de manière efficace de l'ATP au détriment du métabolisme anabolique, et redirigent donc davantage le pyruvate au niveau de l'OXPPOS, ce qui expliquerait qu'elles aient besoin d'une activité de la pyruvate kinase plus importante (Dong G et al., 2016).

Les mutations de PKM2 observées dans les tumeurs humaines sont hétérozygotes : de ce fait, une mutation réduisant l'activité de PKM2 serait favorable à un métabolisme prolifératif, bien que les cellules conservent un allèle fonctionnel de PKM leur permettant une flexibilité métabolique pour s'adapter aux différents stress (Israelsen WJ et al., 2013) (Dayton TL et al., 2016).

PKM2 joue également un rôle majeur dans le maintien du programme métabolique des cellules cancéreuses. Des auteurs ont montré que l'inhibition de l'expression de la PKM2 à l'aide de short hairpin RNA (shRNA) et son remplacement par l'expression de la PKM1 permettait d'inverser l'effet Warburg : les cellules cancéreuses présentaient une augmentation de la consommation en O₂ au détriment d'une réduction de la production de lactate (*i.e* de la glycolyse aérobie), ainsi qu'une diminution de leur capacité à former des tumeurs *in vivo* après xénotransplantation. Ces différents résultats montrent donc le rôle majeur de la PKM2 dans la glycolyse aérobie et dans le phénotype métabolique qui confèrent aux cellules cancéreuses un avantage sélectif de croissance tumorale *in vivo* (Christofk HR et al., 2008). Par ailleurs, l'inhibition de l'expression de la PKM2 favorise la redirection des métabolites de la glycolyse vers les voies branchées en amont telle que la voie des pentoses phosphates (Mullarky E et Cantley LC, 2015).

○ **L'axe PDK/PDH**

Une des conséquences de la conversion du pyruvate en lactate est la détérioration de l'oxydation du pyruvate dérivé du glucose, ce qui induit un découplage de la glycolyse des fonctions du cycle de Krebs (Marchetti P et al., 2014). Ce mécanisme implique les PDK, qui phosphorylent et désactivent la PDH. Dans de nombreux cancers, tels que le cancer du sein, le cancer du côlon, le cancer de l'estomac, le carcinome hépatocellulaire ou encore le mélanome, la surexpression des PDKs est associée à un mauvais pronostic et à une diminution de la survie globale chez les patients (Zhang W et al., 2015). La PDK joue un rôle majeur dans le métabolisme des cellules cancéreuses, puisque l'inhibition des PDKs et donc l'activation de la PDH permet d'augmenter l'O₂PHOS, ce qui pourrait être une stratégie pour inverser l'effet Warburg et limiter la prolifération des cellules cancéreuses (Zhang W et al., 2015). Notre équipe a montré dans un modèle de mélanome métastatique que ces cellules présentaient une diminution de leur activité O₂PHOS en lien avec une expression nucléaire élevée de HIF-1 α (Kluza J et al., 2012). En effet, l'inhibition de ce facteur permet d'induire un switch de la glycolyse vers la respiration mitochondriale grâce à la diminution de l'expression de la kinase PDK3, qui ne peut plus inhiber la PDH (Kluza J et al., 2012). La PDH catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA, et son activité peut être inhibée par phosphorylation par la PDK. Une forte activité de la PDK, une faible activité de la PDH et une dépendance à la glycolyse sont souvent corrélés à une forte tumorigénicité. Dans de nombreux types de cancers tels que le cancer du sein, le cancer du côlon, le mélanome, ou le

myélome, l'expression de la PDK est augmentée et est souvent associée à un mauvais pronostic chez les patients (revue par Zhang W et al., Sci 2015).

Dans le cas du cancer de la prostate, des auteurs ont montré que le resveratrol induit une reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses. En ciblant la PDH, une enzyme clé dans le métabolisme énergétique mitochondrial, le resveratrol augmente l'oxydation du glucose et du pyruvate au sein de la mitochondrie, et diminue la production de lactate, inversant ainsi l'effet Warburg. Ce polyphénol présent de manière naturelle dans certains aliments permettait d'une part d'augmenter les capacités oxydatives des cellules cancéreuses, et d'autre part de diminuer leur activité glycolytique et la voie PP, induisant ainsi une inhibition de la croissance tumorale (Saunier E et al., 2017).

- ***La lactate déhydrogénase***

La lactate déhydrogénase (LDH) est une enzyme permettant de réduire le pyruvate en lactate et de recycler le NAD⁺, qui sera à nouveau recyclé pour maintenir une activité glycolytique soutenue.

Dans les cancers, la LDH-A et les transporteur MCT-1/4, permettant la conversion du pyruvate en lactate et son export respectivement, sont souvent surexprimés, induisant ainsi une diminution de l'oxydation du pyruvate dans les mitochondries (Higashi K et al., 2000) (Park SJ et al., 2018).

- ***HIF-1 α***

HIF (Hypoxia-inducible factor) est un facteur de transcription hétérodimère, composé de deux sous-unités : HIF-1 β et HIF-1 α . HIF-1 β est exprimé de manière constitutive, alors que l'expression de HIF-1 α est régulée en fonction de la teneur en O₂. En normoxie, *i.e.* en présence d'O₂, HIF-1 α est rapidement dégradé par hydroxylation des résidus 402 et 564 par la proline hydroxylase (PHD), qui sont alors reconnus par la protéine Von Hippel-Lindau (pVHL), qui à son tour est reconnu par la protéine ubiquitine-ligase E3 (Sadri N et Zhang P, 2013). A l'inverse, quand la tension en O₂ diminue fortement, *i.e.* en hypoxie, la sous-unité α n'est plus hydroxylée et est donc stabilisée. HIF-1 α peut également être activée par de nombreux facteurs, tels que les facteurs de croissance, la perte de suppresseurs de tumeurs, l'activation oncogénique ou la mutation d'enzymes mitochondriales. Ce facteur de transcription activé est transloqué dans le noyau, où il s'hétéro-dimérise avec HIF-1 β et recrute des protéines co-activatrices (p300-CBP). Ce complexe va ensuite se fixer au niveau de l'élément de réponse à l'hypoxie et induire la transcription de gènes cibles impliqués dans l'angiogenèse (VEGF), la reprogrammation métabolique (GLUT, PDK1), la survie (protéine anti-apoptotique IGF-1 et IGF-2), la résistance aux traitements (ABCB1), les propriétés de souchitude (DLK1) ainsi que l'invasion et la métastase (**figure 5**) (Wigerup C et al., 2016).

Dans le mélanome, l'expression aberrante de HIF-1 α en normoxie conduit à des mécanismes tels que la mutation de MITF, une activation aberrante de la voie de signalisation MEK/ERK notamment dans les mélanomes présentant les mutations BRAF^{V600E} ou Ras ou encore l'activation de la voie PI3K (revue par Marchetti P et al., 2014).

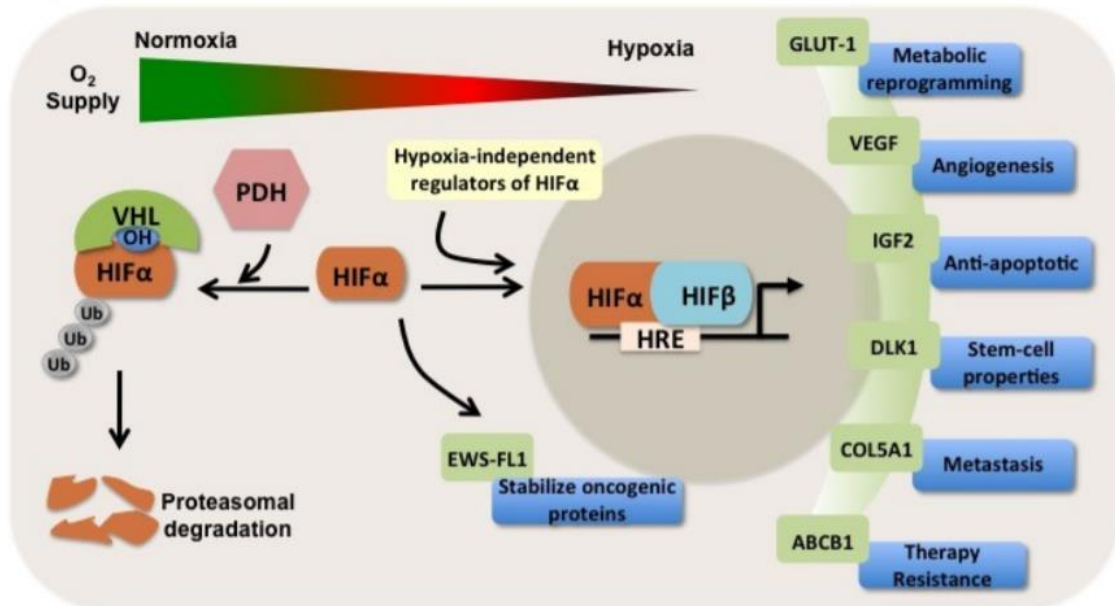


Figure 5 – Rôle de HIF-1 dans la tumorigenèse. Lors d'une diminution de la tension en O₂, HIF-1 α n'est plus hydroxylée et est stabilisée. Ce facteur de transcription est alors transloqué au niveau du noyau, où il s'hétérodimérise avec HIF-1 β et se fixe au niveau de l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE) et active des gènes impliqués dans différents processus tumorigéniques (d'après Sadri N et Zhang P, 2013).

L'hypoxie au travers de HIF est également impliquée dans le changement du métabolisme des cellules cancéreuses. La stabilisation de HIF1, HIF2 et de p53, ainsi que l'expression de Myc, conduisent à des changements métaboliques graduels en réponse à une augmentation de l'hypoxie, telle qu'une activation de gènes impliqués dans le transport du glucose (GLUT1 et GLUT3) et la glycolyse (HK2, MCT4, LDHA, PDK1), favorisant ainsi l'activité glycolytique et inhibant l'O₂PHOS mitochondrial (**figure 6**) (Eales KL et al., 2016).

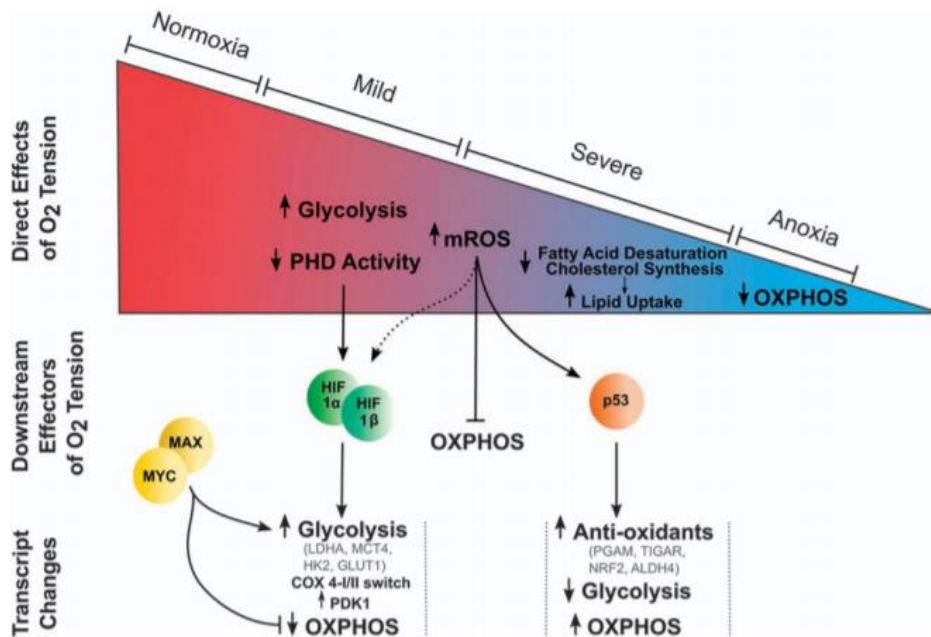


Figure 6 – Effets d’une diminution de la tension en O₂ sur le métabolisme cellulaire. Lors d’une diminution modérée de l’hypoxie, l’activité de la PDH diminue, ce qui permet de stabiliser le facteur HIF1- α . Après hétérodimérisation avec HIF-1 β , le complexe active des gènes favorisant l’activité glycolytique. Une hypoxie sévère conduit alors à une détérioration du métabolisme des lipides, et à une diminution globale de l’OXPHOS lors de l’anoxie (d’après Eales KL et al., 2016).

3. L’acidose : une conséquence de l’effet Warburg

Du fait de leur activité glycolytique importante, et donc de l’effet Warburg, les cellules cancéreuses sécrètent une grande quantité de lactate et de H⁺ qui s’accumulent dans leur microenvironnement, ce qui a pour conséquence une diminution du pH de l’environnement cellulaire et de la matrice extracellulaire (MEC). Cette acidose est également provoquée par l’hypoxie, qui en stabilisant le facteur de transcription HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α), permet l’activation des gènes impliqués dans le transport du glucose tel que GLUT-1 (Chen C et al., 2001) ainsi que les enzymes glycolytiques tels que l’aldolase-A, la PGK-1 et la LDH-A (Semenza GL et al., 1994) (**figure 7**).

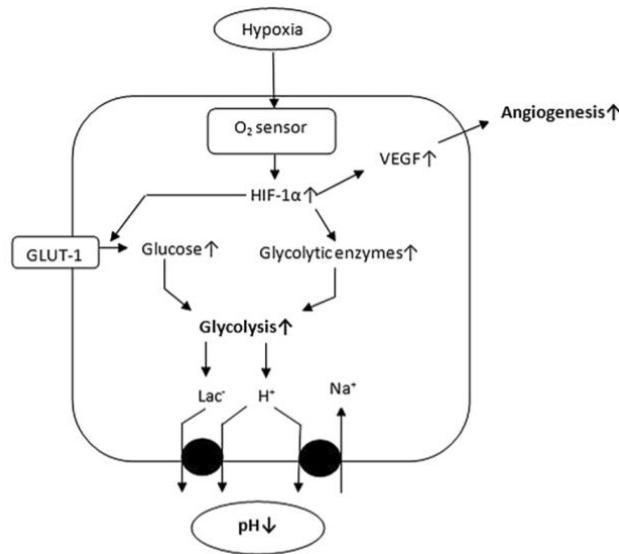


Figure 7 – Rôle de HIF dans le métabolisme glycolytique et l’angiogénèse des cellules tumorales. Le facteur de transcription HIF-1 peut être impliqué dans la tumorigénèse au travers de l’augmentation de l’angiogénèse, de la glycolyse et de la modulation du pH (d’après Singh D et al., 2017).

L’hypoxie au niveau des tumeurs peut également induire un shift métabolique de l’OXPHOS vers la glycolyse, induisant ainsi une acidose. En effet, au niveau des cellules cancéreuses, le facteur HIF leur permet de s’adapter à de faible tension en O₂. L’acidose qui en résulte permet également de stabiliser le facteur HIF-1 α et de réguler les gènes induits par HIF (Chiche J et al., 2010). Ce changement de pH peut induire un remodelage de la matrice extracellulaire et favoriser la migration, l’invasion et la métastase des cellules cancéreuses, mais aussi l’angiogénèse et l’invasion des vaisseaux sanguins en réponse à des facteurs angiogéniques produits au niveau de la tumeur (revue par Thews O et Riemann A, 2019). Des auteurs ont montré que le lactate pouvait stabiliser le facteur HIF-1 α et augmenter l’expression du facteur de croissance VEGF (*vascular endothelial growth factor*) dans des cultures de cellules endothéliales humaines en aérobie, et que l’inhibition de la LDH par de l’oxamate empêche les effets angiogéniques induits par le lactate (Hunt TK et al., 2007). Dans le cas de cellules de mélanome très glycolytiques, il a été montré que l’expression des transporteurs GLUT-1 et MCT-4, permettant l’import du glucose et l’export du lactate respectivement, était augmentée dans des échantillons primaires de métastases de patients (Pinheiro C et al., 2016). Par ailleurs, l’augmentation de la sécrétion du lactate dans le microenvironnement induit par HIF-1 α et Myc, participe à l’altération du microenvironnement tumoral, en favorisant l’angiogénèse, la métastase et la suppression du système immunitaire (revue par Romero-Garcia S et al., 2016).

L’acidose peut également induire une reprogrammation vers d’autres voies métabolique. Dans le cas du cancer du sein, l’acidose permet d’orienter davantage le glucose vers la branche oxydative de la

voie des pentoses phosphate, permettant ainsi d'augmenter la production de NADPH et de recycler le pool de GSH pour lutter contre le stress oxydant induit lorsque le pH est très faible. La diminution du pH peut également reprogrammer le métabolisme cellulaire des cellules cancéreuses et favoriser l'utilisation de la glutaminolyse et de la β -oxydation. Pour cela, sous un faible pH, les gènes G6PD et GLS2 sont induits et permettent de déconnecter la production de ribose de la voie oxydative des pentoses phosphate en redirigeant les métabolites vers la glutaminolyse (LaMonte G et al., 2013).

Contrairement aux cellules normales qui meurent lorsque le pH extracellulaire diminue fortement, les cellules cancéreuses sont équipées pour résister à cette acidose. Pour y faire face, elles augmentent l'expression de transporteurs et d'échangeurs exportant les protons H^+ , tels que les transporteurs de monocarboxylates (MCT) transportant le lactate de manière bidirectionnelle, les échangeurs Na^+/H^+ , les pompes à protons, les transporteurs aux bicarbonates (HCO_3^-) et les échangeurs de H^+ et HCO_3^- (revue par Corbet C et Feron O, 2017). D'autre part, l'acidose participe également à la résistance aux traitements anticancéreux dans certains cancers. Dans le cancer du mélanome muté $BRAF^{V600E}$, des auteurs ont montré que lors d'une exposition aigüe ou chronique à un microenvironnement acide, les cellules cancéreuses présentent une adaptation de type transition épithélio-mésenchymateuse, avec une diminution de la prolifération et une haute résistance à l'apoptose. Contrairement aux cellules cultivées dans un milieu à un pH standard, les cellules exposées à un milieu plus acide sont résistantes au traitement par le Vemurafenib et au Trametinib (Ruzzolini J et al., 2017). Le lactate peut également servir de substrat aux cellules cancéreuses. Dans le cancer du poumon non à petites cellules humain, les cellules peuvent oxyder le glucose au travers du cycle de Krebs. Cependant, les cellules les plus agressives et celles consommant beaucoup de glucose sont aussi capables de capter le lactate par le transporteur MCT-1 et de l'utiliser comme substrat, *in vitro* et *in vivo* (Faubert B et al., 2017).

Les traitements anticancéreux peuvent également être responsables d'une acidose des cellules cancéreuses. Dans la lignée cellulaire de cancer du col de l'utérus HeLa, le traitement par chimiothérapie à la cisplatine induit une acidification du cytoplasme peu de temps après le traitement des cellules. Les auteurs montrent que les cellules cancéreuses sont capables de mettre en place un système leur permettant de maintenir un pH alcalin. Cependant, après des traitements prolongés *in vitro* et *in vivo*, l'acidification du pH intracellulaire induit un shift métabolique des cellules de la glycolyse vers l'OXPPOS, ce qui a pour conséquence une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses (Shirmanova MV et al., 2017).

En conclusion, le ciblage de l'import et de l'export du lactate, en ciblant les transporteurs MCT, pourrait être efficace pour affecter la survie et la croissance des cellules cancéreuses. Des auteurs ont montré dans un modèle de cancer du col de l'utérus squameux que l'inhibition de l'export du lactate en

inhibant le transporteur MCT-1 par l' α -cyano-4-hydroxycinnamate (CHC) était efficace pour réduire la croissance tumorale *in vivo* chez des souris xénotreffées (Sonveaux P et al., 2008).

4. Rôles du métabolisme mitochondrial dans les cellules cancéreuses

En dépit de l'effet Warburg, il a été démontré que le métabolisme mitochondrial est impliqué dans la progression des cancers et à la résistance aux traitements anticancéreux. La mitochondrie représente une source majeure d'ATP et de précurseurs anaboliques nécessaires à la prolifération des cellules cancéreuses. De par la synthèse de ROS mitochondriaux, les mitochondries participent également à la mutagenèse et à la diversification des cellules cancéreuses (Porporato PE et al., 2018).

4.1. Rôle des substrats pour alimenter l'O₂PHOS mitochondriale

4.1.1. Dérégulation du transport mitochondrial du pyruvate dans les cancers

Il a été montré que le MPC participe à l'initiation et à la progression tumorale (Schell RJ et Rutter J, 2013). Par ailleurs, la sous-expression de ce transporteur chez les patients est souvent corrélée à un mauvais pronostic. Dans le cas du cancer de la prostate, l'expression des transporteurs MPC1 et MPC2 est associée à un pronostic favorable chez les patients atteints de cancer de la prostate (Li X et al., 2016) et dans l'adénocarcinome pulmonaire (ACP). Dans un autre modèle de cancer de la prostate hormono-dépendant, l'expression du MPC est contrôlée par les récepteurs aux androgènes. L'inhibition de l'import du pyruvate permet d'inhiber la prolifération cellulaire et les voies métaboliques associées au cycle de Krebs telles que la lipogénèse et l'O₂PHOS. En résumé, l'import du pyruvate dans la mitochondrie pourrait constituer une vulnérabilité métabolique pouvant être thérapeutiquement ciblée afin d'affecter la survie et la prolifération des cellules de cancer de la prostate hormono-dépendante (Badere DA et al., 2019). Outre son rôle dans le métabolisme, le MPC1 possède aussi un rôle dans la suppression de la souche, de l'invasion et de la migration des cellules cancéreuses d'ACP au travers de l'axe MPC1/STAT3 : en interagissant avec mito-STAT3 (mitochondrial signal transducer and activator of transcription 3), le transporteur MPC-1 diminue sa phosphorylation et sa translocation dans le noyau, ce qui induit alors une inhibition des gènes impliqués dans les mécanismes tumorigéniques cités précédemment (Zou H et al., 2019). Dans un modèle de cancer du côlon, des auteurs ont montré que la réexpression des transporteurs MPC1 et MPC2 augmentait l'oxydation du pyruvate dans la mitochondrie, et détériorait la formation des colonies et des sphéroïdes *in vitro*, ainsi que la croissance des xénotreffées *in vivo*. De plus, ils montrent dans ce modèle que le transport du pyruvate est également impliqué dans la maintenance et le devenir des cellules souches cancéreuses du cancer de côlon (Schell JC et al., 2014).

4.1.2. Dérégulation du métabolisme de la glutamine dans les cancers

De nombreux travaux ont aujourd'hui montré l'importance de la glutamine en tant que substrat bioénergétique et anabolique essentiel dans différents types de cancers, tels que la leucémie aigüe myéloïde (Willems L et al., 2013), le mélanome (Hernandez-Davies JE et al., 2015), le cancer du sein (Demas DM et al., 2019) ou encore le cancer de la prostate (Zacharias NM et al., 2017), afin de répondre à leurs demandes en ATP, en précurseurs biosynthétiques et en agents réducteurs. En effet, les cellules cancéreuses sont capables d'utiliser la glutamine comme source de carbones au travers du cycle de Krebs pour alimenter d'autres voies biosynthétiques. La glutamine est également utilisée comme donneur et transporteur de nitrogène, comme échangeur pour l'import d'autres acides aminés (AA), ou encore comme molécule de signalisation. Elle possède également un rôle dans le contrôle du potentiel redox au travers de la synthèse du NADPH (**figure 8**) (Bott A et al., 2019).

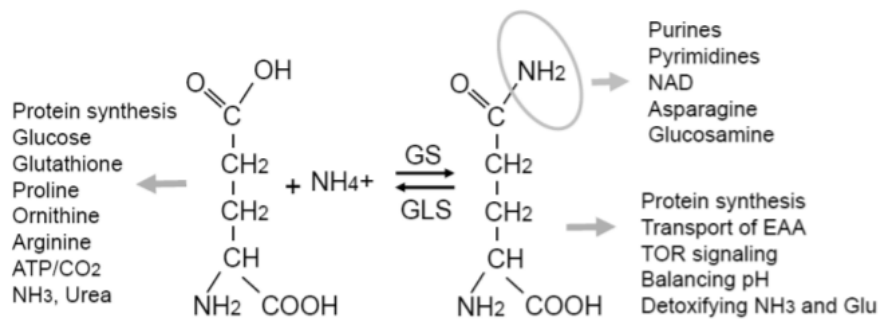


Figure 8 – Les différents rôles de la glutamine et du glutamate dans le métabolisme cellulaire. Le squelette de carbone du glutamate (à gauche) et de la glutamine (à droite), ainsi que la fonction amine de la glutamine sont impliqués dans l'anabolisme au travers de précurseurs glucidiques, protéiques, nucléotidiques, mais également dans le contrôle redox et la régulation du pH (d'après Bott A et al., 2019).

La glutamine participe à l'import de leucine dans les cellules, et celle-ci contribue au contrôle de signalisation associant acides aminés/rag et mTORC1. Des auteurs ont montré que la déplétion en glutamine induite par les L-Asparaginases Kidrolase et Erwinase induit une inhibition de mTORC1 et permet d'augmenter la mort cellulaire dans de nombreuses lignées de LAM (Willems L et al., 2013).

4.1.2.1. Le transport de la glutamine

Afin de répondre à la forte demande en glutamine, les cellules cancéreuses utilisent des transporteurs spécifiques à la glutamine et présentant une haute capacité de transport. La glutamine peut être reconnue par certains membres de la famille des transporteurs SLC (solute carrier) tels que SLC1, SLC6, SLC7 et SLC38 (Pochini L et al., 2014). Cet AA est capté de manière Na⁺-dépendant par le transporteur d'acides aminés via le transporteur Alanine-Serine-Cysteine de type 2 (ASCT2, codé par le gène SLC1A5) situé sur la membrane plasmique, en échange d'autres AA neutres tels que la sérine, l'asparagine ou

la thréonine. D'autres transporteurs Na⁺-dépendant de la famille SLC6, tels que ATB^{0,+} et B⁰AT1, codés respectivement par les gènes SLC6A14 et SLC6A19, présentent également une spécificité pour la glutamine et possèdent de hautes capacités de transport, permettant ainsi d'alimenter les cellules, que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques (**voir figure 9A**) (Pramod AB et al., 2013).

Le transporteur ASCT2 est largement exprimé dans de nombreux tissus, tels que les poumons, le muscle squelettique, les reins, le gros intestin, le cerveau, le tissu adipeux (Kanai Y et al., 2013), mais l'expression de SLC1A5 est aussi souvent augmentée dans de nombreux cancers humains, tels que les cancers de la prostate, du sein, des ovaires, des reins, de l'estomac, dans l'hépatocarcinome, le neuroblastome... (pour revue : Scalise M et al., 2017). Des auteurs ont montré que l'influx de glutamine via ASCT2 induit l'influx d'AA via l'échangeur L-type AA transporter 1 (LAT1), ce qui active la protéine mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) et stimule la croissance cellulaire. Ces 2 transporteurs ont été décrits comme possédant un rôle pro-tumoral, et l'augmentation de leur expression est corrélée à un mauvais pronostic chez des patients dans de nombreux types de cancers, tels que le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer de la prostate, ou encore le cancer colorectal (Hassanein M et al., 2013) (Sakata T et al., 2009) (Huang F et al., 2014). Il a été montré que le knock-out de ASCT2 diminue l'import de glutamine de plus de 60% dans des lignées d'adénocarcinomes de poumon et de côlon, réduisant ainsi la croissance cellulaire sans induire de réponse de stress à une déplétion en AA ni d'altération de l'activité de mTORC1 (Cormerais Y et al., 2017).

4.1.2.2. Réactions anaplérotiques issues de la glutamine

La carboxylation du pyruvate en oxaloacétate et la synthèse de glutamate à partir de la glutamine sont les deux réactions biochimiques anaplérotiques permettant d'alimenter le cycle de Krebs en intermédiaires. La glutamine est un AA constitué de 5 carbones. Après être rentrée dans la cellule, la glutamine est ensuite convertie en glutamate par la glutaminase GLS1 dans la mitochondrie. Le glutamate pourra (1) être transformé en aspartate pour la synthèse de nucléosides ou (2) être converti en α -KG par la glutamate dehydrogenase (GDH) ou par des transaminases à partir d'alanine (ALT) ou d'aspartate (AST) qui transfèrent le groupement amino du glutamate vers un kétoacide, qui rentrera dans le cycle de Krebs au niveau de la mitochondrie. L' α -KG subit des réactions successives afin de produire du malate et de l'ATP par la succinyl-CoA synthétase. Cette voie libère un atome de carbone sous forme de CO₂. Les 4 autres carbones sont utilisés pour la production de malate, qui peut sortir de la mitochondrie, où il sera transformé en pyruvate, générant ainsi du NADPH pour la production d'acides gras ou pour les voies biosynthétiques. Le pyruvate issu de ces réactions peut être

utilisé afin de produire du glucose, un phénomène appelé « glycolyse inverse », afin de rentrer dans la PPP pour augmenter la production de NADPH, ou être transformé en lactate pour régénérer du NAD⁺ qui pourra être utilisé pour la glycolyse anaérobie et la production d'ATP. Le citrate quant à lui est catalysé (1) en isocitrate, puis en α-KG, générant ainsi une autre molécule de NADPH ou (2) en ACoA pour la synthèse d'acides gras et en AOA pour la synthèse d'AA non essentiels (**figure 9B**) (Scalise M et al., 2017).

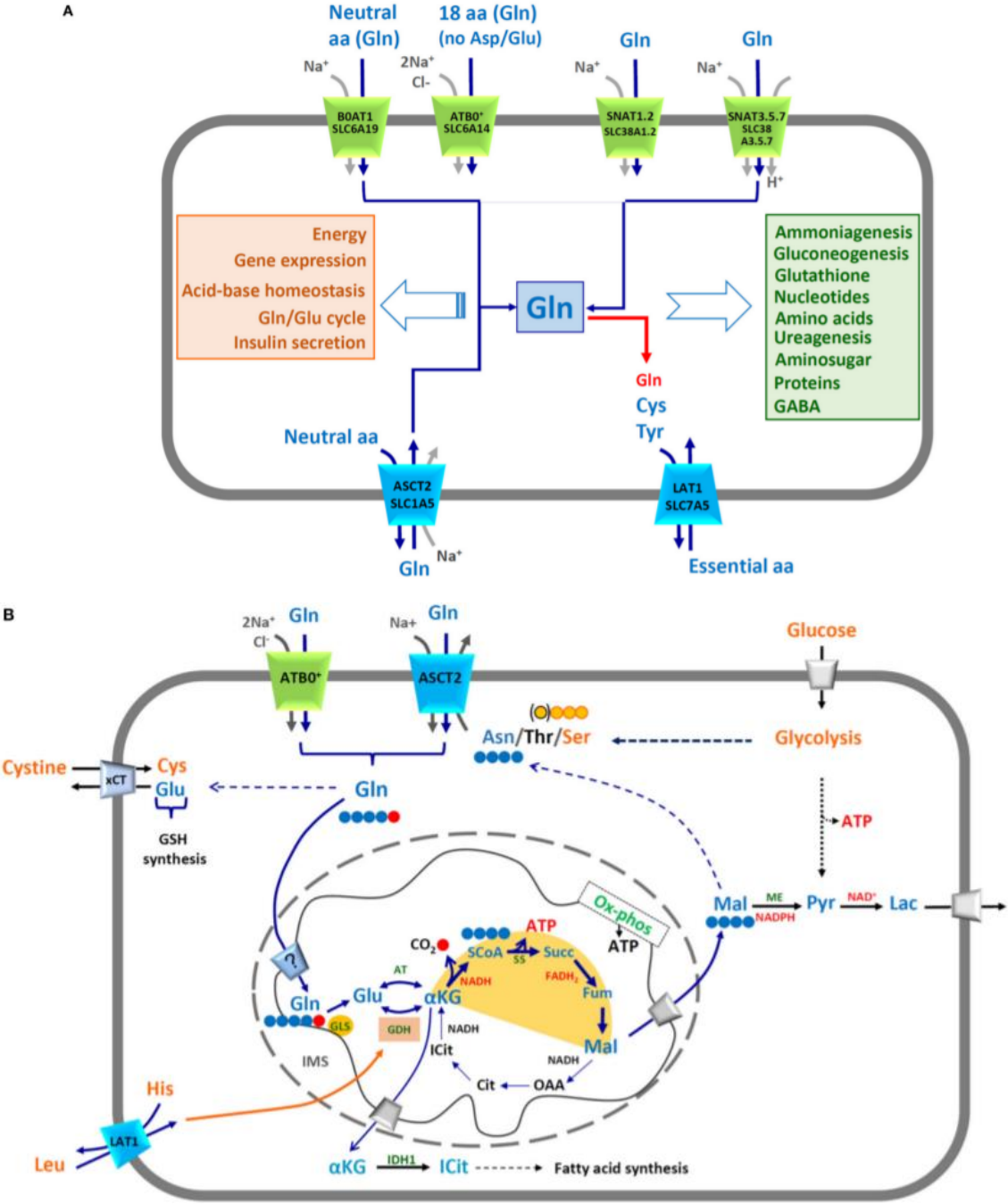


Figure 9 – Transport et voies de signalisation impliquées dans le métabolisme de la glutamine. (A) Le transport de la glutamine dans la cellule. Des antiports (en bleu) et des symports (en vert) permettent le transport de la glutamine au sein de la cellule. La glutamine est impliquée dans différentes voies (encadré orange) et également dans la synthèse d'autres molécules (encadré vert). (B) **Voies de signalisation impliquées dans la production d'énergie à partir de la glutamine.** Après être rentré dans la cellule par les transporteurs membranaires ATB^{0+} ou ASCT2, la glutamine peut rentrer dans la mitochondrie, où ses atomes seront utilisés pour alimenter le cycle de Krebs en intermédiaires et pour produire des équivalents réducteurs. La glutamine est également impliquée dans d'autres processus cellulaires tels que le contrôle de la balance redox par la synthèse du glutathion (GSH), la synthèse des acides gras, la glycolyse et l'O₂PHOS (d'après Scalise M et al., 2017).

L'augmentation de la captation de la glutamine permet aux cellules cancéreuses de synthétiser les macromolécules nécessaires pour leur prolifération, mais ces événements nécessitent une forte consommation d'énergie, qui est fournie au travers de l'augmentation de la captation du glucose et de la glutamine, de l'augmentation de l'expression des enzymes métaboliques et de leur activité enzymatique. La surexpression de la glutaminase induite par c-Myc est souvent observée dans de nombreux types de cancers tels que le gliome (Wise DR et al., 2008), le myélome multiple (Effenbergr M et al., 2017) et le cancer colorectal (Song Z et al., 2017).

L'équipe de Craig B. Thompson a montré que les cellules de glioblastome proliférantes présentaient une glycolyse aérobie et un cycle de Krebs actif caractérisé par un efflux de substrats pour les voies biosynthétiques, grâce au NADPH et à l'anaplérose. Afin de produire des AG, elles utilisent le glucose comme substrat lipogénique. Cependant, la synthèse d'AG nécessite du NADPH et un mécanisme permettant d'alimenter le cycle de Krebs. A cette fin, les cellules de glioblastome augmentent la captation de la glutamine qu'elles convertissent en lactate afin de produire rapidement du NADPH. Elles peuvent aussi utiliser la glutamine qu'elles convertissent en malate puis en AOA pour alimenter le cycle de Krebs. Dans ce modèle, la glutamine ne sert donc pas à fournir du nitrogène pour la synthèse des nucléotides ou la maintenance des AA non essentiels, mais contribue comme source de carbones à des voies biosynthétiques (DeBerardinis RJ et al., 2007). Les cellules peuvent également produire d'autres AA comme l'asparagine, en convertissant la glutamine en malate, puis en aspartate et en asparagine via la malate déshydrogénase et l'aspartate aminotransférase respectivement (**figure 9B**).

4.1.2.3. Ciblage du métabolisme de la glutamine dans les cancers

De nombreux travaux ont à ce jour montré que le métabolisme de la glutamine joue un rôle majeur dans les processus de tumorigenèse des cellules. Du fait du réseau complexe entre enzymes et transporteurs impliqués dans le métabolisme de la glutamine, de nombreuses molécules ont vu le jour et permettent de cibler le transport de la glutamine tels que le tamoxifen ou la L- γ -glutamyl-p-nitroanilide (GPNA) ciblant ASCT, ou de cibler les enzymes de la glutaminolyse tels que le CB-839 et le BPTES ciblant la GLS1. Certaines molécules permettent de cibler directement la glutamine, telle que la

L-Asparaginase permettant de convertir la glutamine en glutamate afin d'empêcher son entrée dans la cellule (**tableau 2**) (Chen L et Cui H, 2015).

Compound	Target
BPTES	GLS1
968	GAC
CB-839	GLS1
Ebselen	GLS1, GLS2
Chelerythrine	GLS1, GLS2
Apomorphine	GLS1, GLS2
DON	Glutamine antagonist
Acivicin	γ -Glutamyl transpeptidase glutamine amidotransférase; Glutamine antagonist
BCH	Glutamine transporter (SLC7A5)
α -Methyl-DL-tryptophan	Glutamine transporter (SLC6A14)
Tamoxifène	Glutamine transporter (ASCT2)
Raloxifène	Glutamine transporter (ASCT2)
GPNA	Glutamine transporter (ASCT2)
EGCG	GDH
L-Asparaginase	Glutamine
Phenylacetate	Glutamine

Tableau 2 – Ciblage du métabolisme de la glutamine par différents composés (d'après Chen L et Cui H, 2015).

L'équipe du Pr. Bouscary a montré dans les leucémies aigues myéloïdes que la glutamine contrôlait l'OXPHOS mitochondrial, et que le ciblage de la glutaminolyse était efficace pour affecter la survie des cellules leucémiques. L'inhibition de la glutaminase GLS1 par *knock-down* ou par le composé CB-839 induit une diminution de l'activité OXPHOS, ce qui a pour conséquence un arrêt de la prolifération cellulaire et une induction de l'apoptose des cellules leucémiques *in vitro*, ainsi qu'une inhibition du développement de la LAM *in vivo* chez des souris NOD-Scid-Gamma (NSG), sans affecter les cellules CD34⁺ saines (Jacque N et al., 2015). Une autre étude a montré que dans les LAM, un sous-type de cellules présentait une augmentation de l'expression de GLS1 codant pour deux isoformes : rénale (KGA) et la glutaminase C (GAC), ainsi qu'une sensibilité accrue à la privation en glutamine induite par le CB-839 (Matre P et al., 2016). Des études cliniques actuellement en cours devraient permettre de déterminer le bénéfice du CB-839 en tant qu'inhibiteur allostérique de la glutaminase oralement biodisponible (Stuani L et al., 2019).

4.1.3. Dérégulation du métabolisme des acides gras dans les cancers

4.1.3.1. Dérégulation de la synthèse des acides gras

Bien que les cellules humaines non transformées préfèrent capter les sources exogènes de lipides, les cellules cancéreuses préfèrent la synthèse de lipides *de novo* (Medes G et al., 1953), afin de soutenir des processus tels que la formation des membranes lipidiques et la signalisation. Le citrate, un intermédiaire essentiel à la formation des acides gras, peut être obtenu à partir du glucose suivi du

cycle de Krebs, ou à partir de la glutamine par glutaminolyse suivie de carboxylation réductive. Les cellules cancéreuses oxydent le glucose et en incorporent les carbones pour la synthèse des acides gras via l'AcCoA, le NADPH et les enzymes lipogéniques tels que l'ATP citrate lyase (ACLY), l'acyl-CoA synthetase/acid-CoA ligase (ACS/ACSL), l'AcCoA carboxylase (ACC), la fatty acid synthase (FASN) et le stearoyl-CoA desaturase (**figure 11**) (Currie E et al., 2013). La glutamine est également une source majeure de carbones pour la synthèse *de novo* des acides gras. Pour cela, il existe deux voies : la glutaminolyse suivi de la voie du cycle de Krebs et de la carboxylation réductive, qui elle suit un chemin inverse au cycle de Krebs en formant du citrate à partir de l' α -KG. Dans des conditions de stress hypoxique, les cellules cancéreuses utilisent la carboxylation réductive de la glutamine pour générer du citrate afin de synthétiser des lipides et soutenir la prolifération des cellules cancéreuses (Sun RC et Denko NC, 2014).

Dans le cas du mélanome muté BRAF^{V600E}, les cellules présentent une augmentation de la synthèse de lipides induite par SREBP-1 (Sterol Regulator Element Binding 1) en comparaison des mélanocytes de l'épiderme humain néonatal (Talebi A et al., 2018).

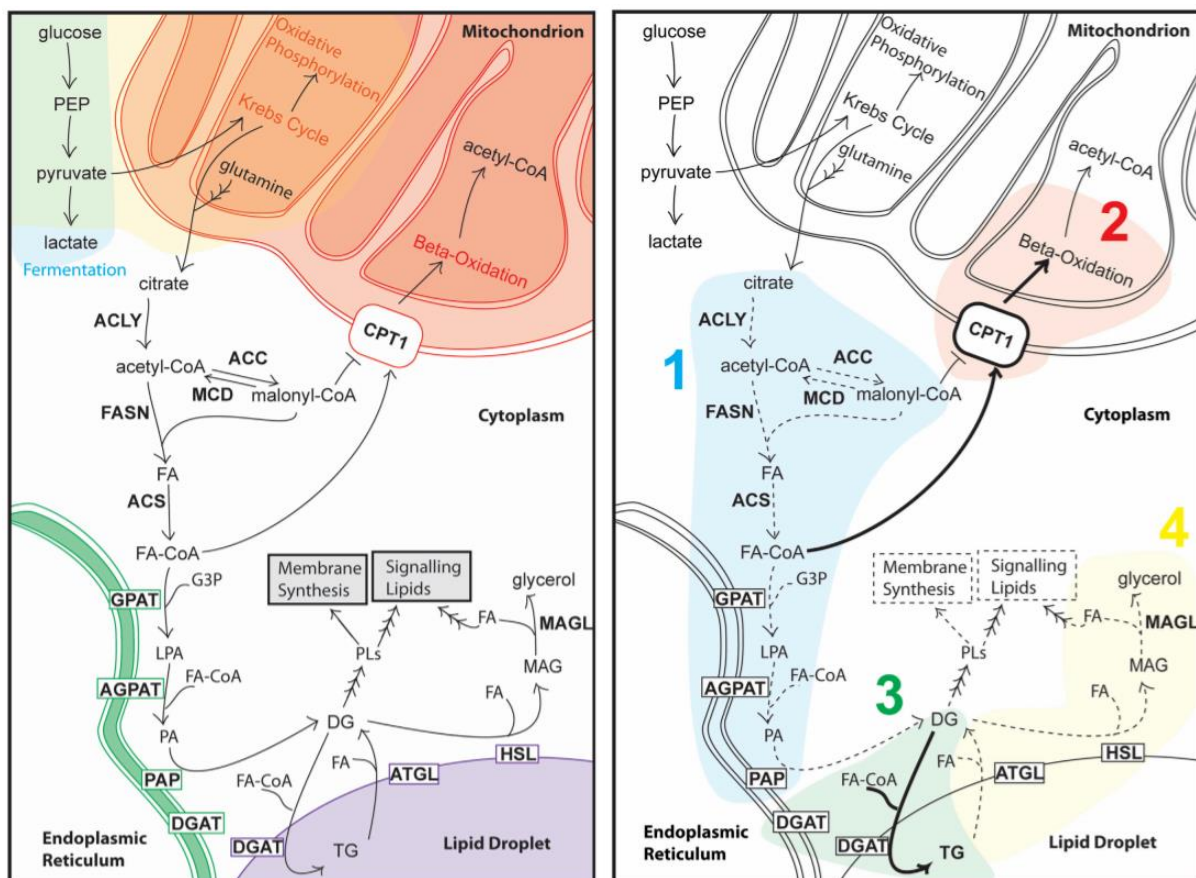


Figure 11 – Le métabolisme des acides gras et leur ciblage pour limiter la prolifération des cellules cancéreuses. (A gauche) Le glucose au travers du cycle de Krebs, ou la glutamine par réactions inverse du cycle de Krebs catalysée par l'IDH et l'acotinase, permettent de produire du citrate, qui pourra être transformé en ACoA puis en AG par l'ACLY et la FASN respectivement. Les AG doivent être activés par

des modifications covalentes par le CoA via l'ACS. A ce stade, l'AG-CoA peut soit rentrer dans la mitochondrie par le transporteur CPT1 et être oxydé, ou être estérifié par le glycérol ou des squelettes stérols pour générer des triglycérides (TG) ou des stérols esters respectivement par les enzymes glycerol-3-phosphate-acyltransférase (GPAT), acyl-glycerolphosphate acyltransférase (AGPAT), phosphohydrolase (PAP), diacyl-glycerol acyltransférase (DGAT). Les TG peuvent ensuite être incorporés dans les membranes, être stockés, servir de molécules de signalisation ou être oxydés comme source d'énergie par l'adipose triglyceride lipase (ATGL), l'hormone sensitive lipase (HSL) et la monoacylglycérol lipase (MAGL). (A droite) Modèle expliquant comment les acides gras peuvent limiter la prolifération des cellules cancéreuses en (1) bloquant la synthèse des AG, (2) en augmentant la dégradation des AG, (3) en augmentant le stockage des AG dans des triglycérides neutres, et ou/ (4) en diminuant le relargage des AG depuis les stocks (d'après Currie E et al., 2013).

4.1.3.2. Dérégulation de la FAO

Dans un modèle de cancer du sein estrogène-positif, la surexpression du transporteur CPT1A permet de réactiver la FAO, conduisant ainsi à la diminution de la prolifération et de la migration des cellules de cancer du sein estrogène-positives (Aiderus A et al., 2018). Des auteurs ont montré que dans le cas de CPNPC, l'inhibition de l'ACoA carboxylase (ACC) permettait de supprimer la synthèse des acides gras et d'inhiber la croissance tumorale *in vivo*. Ils émettent l'hypothèse que l'inhibition de la synthèse des acides gras induirait la FAO (Svensson RU et al., 2016).

4.1.3.3. Dérégulation du transport des acides gras

Les acides gras peuvent rentrer dans la mitochondrie afin d'être oxydé. Le transporteur CPT1 (carnitine palmitoyltransferase I ou carnitine acyltransferase I) est une enzyme présente sur la MME permettant de convertir des acyl-CoA à longue chaîne en des acyl-carnitines à longue chaîne afin de les transporter au sein de la mitochondrie. CPT1 est présente sous différentes isoformes : CPT1A est exprimé au niveau du foie et des reins, CPT1B au niveau des muscles cardiaque et squelettique et CPT1C dans le cerveau (Calderon-Dominguez M et al., 2016).

Dans de nombreux types de cancers, l'expression du transporteur CPT1 est souvent dérégulé (**tableau 3**).

CPT1 isoform	Cancer type	Significance
CPT1A	Prostate cancer	Upregulated expression; its inhibition has antitumor actions
	Burkitt's lymphoma	Upregulated expression
	Glioblastoma	Upregulated expression
	Lymphocytic leukemia	Its inhibition has antitumor actions; contributes to cancer chemoresistance
	Breast cancer	Upregulated expression; its inhibition has antitumor actions; acts as a new role in the histone acetylation level of tumor
	Gastric cancer	Oleic acid activates its expression
	Ovarian cancer	Upregulated expression
CPT1C	Alveolar rhabdomyosarcoma	Contributes to cancer cell motility
	Teratocarcinoma	Transcriptional regulation of it by RXR-NR4A receptor
	Endothelial cells	Upregulated expression; contributes to tumor neovascularization
	Lung cancer	Upregulated expression contributes to cancer chemoresistance
CPT1 (unspecified isoform)	Colon	Its inhibition has antitumor actions
	Breast	Upregulated expression
	Glioblastoma	Upregulated expression
	Hepatoma	Upregulated expression
	Acute myeloid leukemia	Its inhibition has antitumor actions
	Diffuse large B-cell lymphoma	Upregulated expression
	Myeloma	Its inhibition has antitumor actions
	Lung cancer	Contributes to cancer chemoresistance

Tableau 3 – Rôle de du transporteur CPT1 dans les cancers. Dans de nombreux types de cancers, CPT1 est souvent surexprimé et participe aux caractéristiques pro-tumorigéniques des cellules cancéreuses, tels que la résistance aux traitements anticancéreux, l'angiogenèse, la croissance tumorale (d'après Qu Q et al., 2016).

5. Les autres rôles de la mitochondrie dans les cancers

5.1. Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose

5.2.1. L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée (MCP), est un phénomène physiologique et contrôlé caractérisé par des événements morphologiques et des mécanismes biochimiques énergie-dépendante distincts. Ce processus est impliqué dans le turnover normal des tissus, dans le développement correct et fonctionnel du système immunitaire et du système nerveux. Durant le développement embryogénique, l'apoptose a un rôle prépondérant dans le façonnement de l'organisme (Suzanne M et Steller H, 2013). Ce mécanisme de MCP joue également un rôle majeur dans l'élimination des cellules potentiellement dangereuses pour les différents organes. Cependant, dans certaines pathologies telles que les maladies auto-immunes, neurodégénératives, ou encore dans de nombreux types de cancers, les processus apoptotiques peuvent être dérégulés.

5.2.2. Les modifications morphologiques lors de l'apoptose

Lors de l'apoptose, des événements morphologiques caractéristiques observables en microscopie ont lieu, tels qu'un bourgeonnement des membranes cellulaires, une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP), une caryorrhexie, une pyknosis, une fragmentation de l'ADN qui sera transformée en vésicules par le réticulum et relarguée sous forme de corps apoptotiques dans l'espace extracellulaire. L'un des événements caractéristiques de l'apoptose est l'externalisation des phosphatidylsérines du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane cellulaire. Ces phosphatidylsérines externalisés sont alors reconnus, phagocytés et dégradés par les phagocytes. En biologie moléculaire, le taux d'apoptose peut être quantifié par cytométrie en flux par exemple grâce à l'annexine V, une protéine recombinante se liant aux phosphatidylsérines.

La MCP implique l'activation de protéases à cystéines : les caspases. En plus de jouer un rôle essentiel dans l'apoptose, ces enzymes participent également à des phénomènes physiologiques, tel que le remodelage cellulaire non-apoptotique, la différenciation des macrophages, l'érythropoïèse, la différenciation des cellules de la rétine et la cornification (pour revue : Suzanne M et Steller H, 2013). Lors d'absence de stimuli apoptotiques, les caspases se présentent sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes. Il existe des caspases dites initiatrices telles que les caspases 2, 8, 9 et 10 activées par

auto-clivage, et des caspases dites effectrices telles que les caspases 3, 6 et 7 activées par les caspases initiatrices.

5.2.3. Les évènements moléculaires de l'apoptose

Plusieurs voies de signalisation permettent d'aboutir à l'apoptose. Il existe deux voies caspases-dépendantes : (1) la voie intrinsèque ou voie mitochondriale et (2) la voie extrinsèque initiée à la surface des cellules par les récepteurs de mort membranaires. La troisième voie caspase-indépendante a été décrite plus récemment et implique le facteur AIF.

5.2.4. La voie intrinsèque de l'apoptose

La voie intrinsèque est activée par de nombreux stimuli (positifs ou négatifs), non médiés par les récepteurs et qui génèrent des signaux intracellulaires agissant sur des cibles présentes au sein de la cellule. Ces stimuli sont initiés au niveau mitochondrial. Les stimuli négatifs regroupent le retrait ou la suppression de certains facteurs de croissance, d'hormones et de cytokines. L'apoptose peut également être activée par des stimuli positifs tels que les toxines, les radiations, les chimiothérapies, l'hyperthermie, les infections virales et les radicaux libres. Ces différents stimuli induisent des changements au niveau de la MMI conduisant à l'ouverture du pore de transition mitochondrial (MPT), à la perte du potentiel de membrane mitochondrial et au relargage de protéines pro-apoptotiques. L'apoptose mitochondriale est régulée par (1) des facteurs solubles tels que les facteurs Smac/DIABLO et la sérine protéase HtrA2/Omi et XIAP relargués suite à la MOMP et qui induisent l'apoptose en inhibant les protéines IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*) et par (2) les protéines de la famille Bcl-2 (revue par Elmore S, 2007).

La voie intrinsèque peut activer l'apoptose directement en activant la caspase-3, ou en livant la protéine bid (BH3 interacting domain death agonist), ce qui dérégule alors la membrane mitochondriale et induit le relargage du cytochrome c, ainsi que l'activation subséquente des caspases 9 et 3. L'activation de la caspase 3 conduit alors à la fragmentation de l'ADN et à l'apoptose. En conséquence de la signalisation pro-apoptotique, la MMI peut être perturbée et la mitochondrie relargue alors le cytochrome c dans le cytoplasme, où il forme un complexe, l'apoptosome, avec la protéine APAF-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) et la pro-caspase-9 inactive. Ce complexe utilise alors l'énergie de l'ATP pour cliver et activer la caspase-9. La caspase 9, ou caspase initiatrice, clive à son tour les caspases exécutrices 3, 6 et 7, aboutissant ainsi à l'apoptose.

Le point de non-retour de la cascade apoptotique est la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP), qui une fois activée, induit la formation de l'apoptosome et la cascade

d'activation des caspases. La décision cellulaire d'initier ou non la MOMP est contrôlée par une balance entre les protéines pro- et anti- apoptotiques de la famille Bcl-2 (revue par Elmore S, 2007).

5.2.5. La voie extrinsèque de l'apoptose

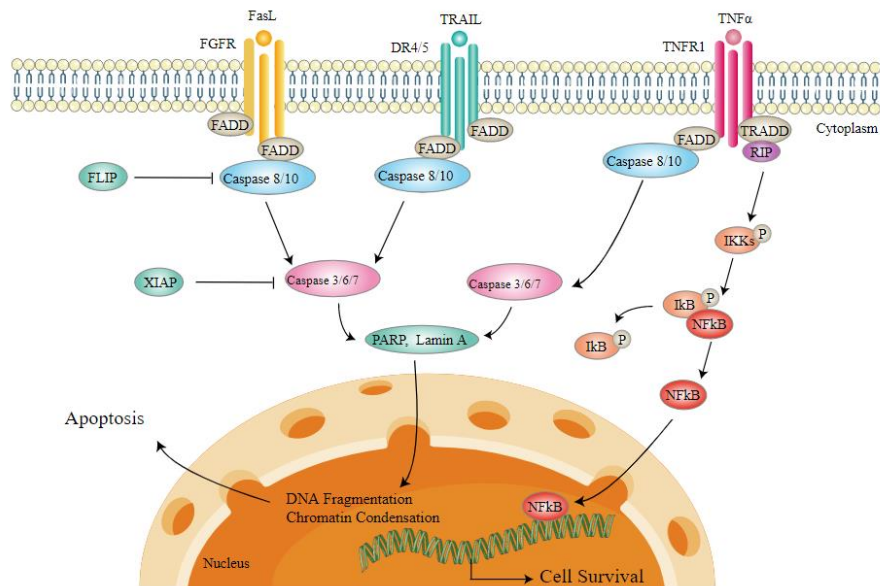


Figure tirée du lien suivant : <https://www.creative-diagnostics.com/extrinsic-apoptosis-pathway.htm>

Figure 11 – Les voies de signalisation de l'apoptose extrinsèque. Lors de la liaison des ligands sur leur récepteur de mort, des protéines adaptatrices cytoplasmiques présentant des domaines de mort correspondants, tels que FADD (Fas-associated DD) et TRADD (TNF receptor-associated DD) sont alors recrutées et recrutent à leur tour des enzymes, qui activeront des cascades de signalisation intracellulaire. FADD contrôle l'apoptose en recrutant les caspases initiatrices 8 et 10, alors que TRADD recrute le récepteur kinase RIP1 (receptor-interacting protein-1), l'E3 ubiquitine-ligase TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) et les protéines cIAPs (cellular inhibitor of apoptosis proteins). La liaison du TNF- α sur son récepteur TNF-R1 induit une cascade de phosphorylation impliquant la kinase IKK, qui phosphoryle I κ B et qui est un inhibiteur du facteur nucléaire NF- κ B. La voie NF- κ B peut favoriser la survie ou l'apoptose en fonction du type cellulaire et du contexte biologique. Les récepteurs FasR et DR4/DR5, en liant les ligands FasL et TRAIL respectivement, peuvent recruter les protéines adaptatrices FADD et TRADD et induire une cascade des caspases, conduisant *in fine* à l'apoptose.

La voie extrinsèque de l'apoptose est initiée par l'interaction de ligands avec les récepteurs de mort de la superfamille des récepteurs TNF (tumor necrosis factor). Ces récepteurs partagent des domaines extracellulaires riches en cystéines et un domaine cytoplasmique de 80 AA, le « domaine de mort », permettant de transmettre les signaux de mort depuis la surface cellulaire aux voies de signalisation intracellulaires. A ce jour, les interactions ligands et récepteurs de mort les mieux décrits sont FasL/FasR, TNF- α /TNF-R1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 et Apo2L/DR5 (Elmore S, 2007).

5.2.6. La dérégulation du processus apoptotique dans les pathologies : exemple des cancers

La plupart des thérapies anticancéreuses tuent les cellules cancéreuses en activant des signaux qui initient la voie apoptotique intrinsèque. Les cellules cancéreuses sont capables de prévenir la perméabilité de la membrane externe mitochondriale (MOMP) via plusieurs processus, tels que la sous-régulation des protéines de la famille BH3-only, la perte ou le silencing de l'expression de Bax/Bak et d'APAF-1, la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, la dégradation protéosomale du cytochrome c et la perte des caspases afin d'empêcher la formation de l'apoptosome (figure 12) (Lopez J et Tait SWG, 2015).

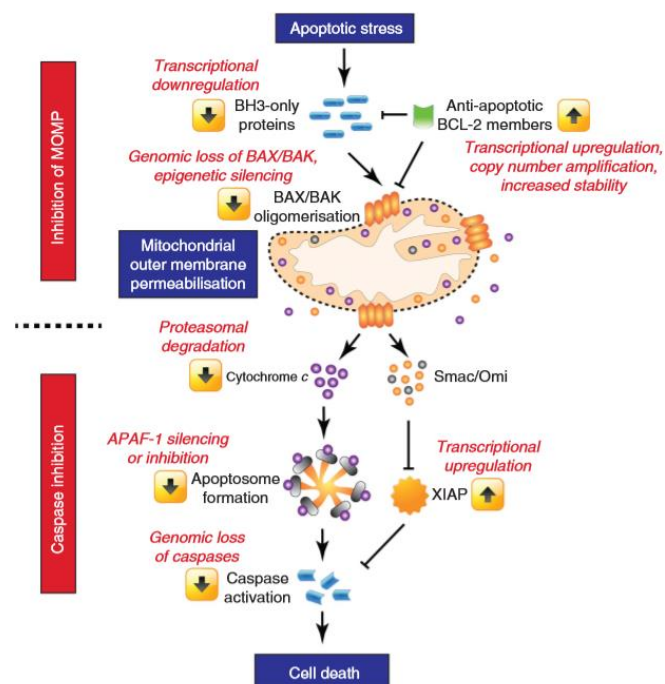


Figure 12 – Déroulement de l'apoptose mitochondriale et mécanismes d'échappement. Le stress apoptotique induit l'activation des protéines BH3-only et l'oligomérisation du pore Bax/Bak, la MOMP et le relargage de cytochrome c et de protéines Smac/Omi dans l'EIM. Le cytochrome c participe à la formation de l'apoptosome avec Apaf-1 et la caspase 9. Plusieurs mécanismes permettent d'inhiber la MOMP ou l'activation des caspases (en rouge) (d'après Lopez J et Tait SWG, 2015).

L'évasion à l'apoptose constitue l'une des caractéristiques des cancers. L'un des mécanismes responsables de la suppression de l'apoptose est la perte du suppresseur de tumeur p53. p53 est un facteur de transcription suppresseur de tumeur, dont l'expression est hautement régulée par des processus de phosphorylation pouvant être réalisées par des kinases telles que ATM/ATR/DNA-PK et Chk1/Chk2, suite à des dommages de l'ADN par exemple. Une fois activée et stabilisée, p53 va se fixer au niveau de ses promoteurs et activer ses gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose ou la sénescence (Kruse JP et Gu W, 2009). Dans de nombreux types de cancers, p53 peut être muté et perdre son rôle de suppresseur de tumeur : p53 muté participe alors

favoriser la survie des cellules cancéreuses et est impliqué dans des processus tumorigéniques tels que l'invasion, la métastase et la chimiorésistance (**figure 13**).

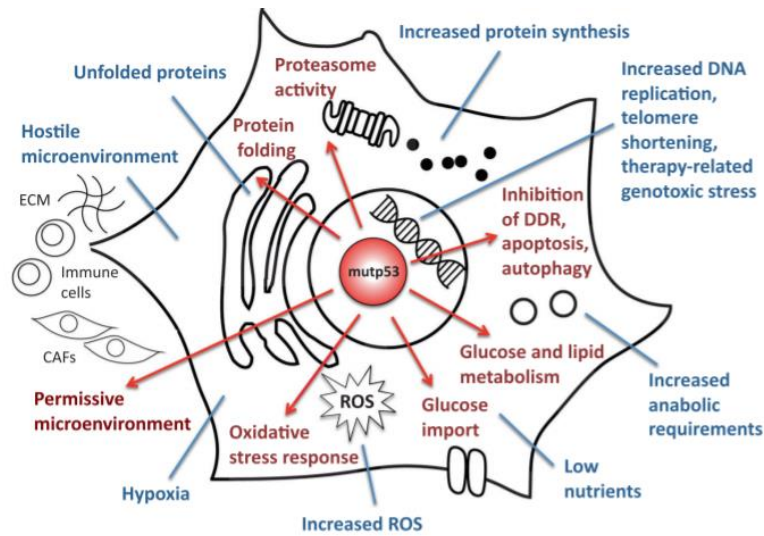


Figure 13 – Rôle de p53 dans les processus de tumorigénèse. p53 muté (mutp53) peut ressentir les signaux de stress induits par les cellules cancéreuses (en bleu) et activer des processus d'adaptation au stress permettant de favoriser la survie, la prolifération, les besoins énergétiques et anaboliques des cellules cancéreuses (d'après Mantovani et al., 2019).

p53 participe à l'apoptose intrinsèque en interagissant avec les protéines de la famille Bcl-2 pour activer la formation du pore par Bax/Bak et induire la MOMP. Dans les cancers, la transduction des signaux conduisant à la MOMP peut être interrompue ce qui permet alors aux cellules cancéreuses d'inhiber l'apoptose et de survivre. p53 muté peut également inhiber l'apoptose dans les cellules cancéreuses en bloquant directement l'activité de la caspase 9, ainsi que l'activation de la caspase 9 médiée par la caspase 3. De nombreux auteurs ont montré que la réintroduction de p53 WT dans les cellules cancéreuses présentant p53 muté ou le traitement avec des composés interagissant avec p53 mutant pour réinduire une bonne conformation permet de rétablir la fonction suppresseur de tumeur de p53 (Galluzzi L et al., 2008). La perte de fonction de p53 dans les cancers présentant TP53 WT est souvent due à un dysfonctionnement des protéines régulant p53 tels que la surexpression de Mdm2/MdmX, une protéine ubiquitine-ligase dégradant p53, et à des altérations d'ATM (Peterson LF et al., 2011).

Dans le cas de la LMC, il a été montré que 20% des patients en phase de crise blastique présentent une mutation de p53 (Di Bacco A, 2000). Parmi ces cellules présentant ou non la mutation T315I, des auteurs ont montré que l'utilisation du MI-219, un inhibiteur de la protéine ubiquitine-ligase HDM2 (homologue de Mdm2), permet d'induire la stabilisation de p53 et d'activer les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. En effet, p53 stabilisé active ses cibles pro-apoptotiques PUMA, Noxa et Bax, ainsi que le récepteur CD95/FAS, et diminue l'activité de la protéine anti-apoptotique Mcl-1

(Peterson LF et al., 2011). Dans les LAM, la présence du mutant TP53 est associée à un caryotype complexe et une instabilité génomique, souvent associée à un mauvais pronostic chez les patients (Cassier PA et al., 2011). Des auteurs ont montré dans des cellules de LAM résistantes à l'apoptose que l'activation de p53 et l'inhibition de Bcl-2 permettaient de contrer la résistance à l'un et l'autre. En effet, l'activation de p53 régule négativement la voie MAPK et active GSK3 qui phosphoryle Mcl-1 et induit sa dégradation. De manière réciproque, l'inhibition de Bcl-2 permet de contrer la résistance à l'apoptose induite par l'activation de p53 (Pan R et al., 2017).

De nombreux articles ont montré que les mitochondries sont impliquées dans la résistance des cellules cancéreuses à la mort cellulaire. Dans un modèle de cellules de cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC), les cellules présentent des résistances intrinsèques à l'apoptose induite par des stimuli apoptotiques par chimio- et radio-thérapies, en comparaison des cellules de cancer pulmonaire à petites cellules (CPPC). Bien que ces 2 cancers ne présentent aucune différence au niveau de l'activation des caspases activatrices et effectrices et au niveau du relargage du cytochrome c, les CPNPC présentent des dysfonctions mitochondriales et n'activent pas les événements nucléaires tels que le clivage de la protéine PARP ou la fragmentation nucléaire. Cependant, l'utilisation de la staurosporine, un antibiotique aussi connu pour induire l'apoptose dans de nombreux types de cellules cancéreuses, est efficace dans les CPPC et CPNPC. Ce médicament induit l'apoptose de manière caspase-indépendante, en activant le relargage mitochondrial de manière potentiel mitochondrial-dépendant et la relocalisation au niveau nucléaire du facteur induisant l'apoptose (AIF), ainsi que le relargage du cytochrome c, l'activation des caspases, la condensation nucléaire, la fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire (Joseph B et al., 2002) (Gallego MA et al., 2004).

5.2.7. Cross-talk entre métabolisme mitochondrial et mort cellulaire

Bien que le lien ne soit pas clairement établi, l'apoptose et le métabolisme oxydatif mitochondrial seraient étroitement liés, puisque l'utilisation d'inhibiteurs de protéines de la famille Bcl-2 tel que l'ABT-263 (Navitoclax) ou l'ABT-199 (Venetoclax) induisent des effets sur l'OXPPOS mitochondrial. Dans un modèle de LAM, Lagadinou et collègues ont montré que les cellules leucémiques capables d'auto-renouvellement et celles résistantes aux chimiothérapies sont quiescentes et présentent de très faibles niveaux de ROS (« ROS low »). D'autre part, ils montrent que ces CSL ROS low surexpriment la protéine Bcl-2, et que son inhibition par l'ABT-263 permet de diminuer l'OXPPOS et d'éradiquer les CSL quiescentes (Lagadinou ED et al., 2013).

En conclusion, la mitochondrie a un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires tels que la production d'ATP au travers de l'OXPPOS et la synthèse de métabolites pour répondre aux besoins bioénergétiques et biosynthétiques des cellules dans des conditions physiologiques. Cependant, cet

organite peut également jouer un rôle clé dans les processus de tumorigenèse, au travers de la production d'énergie, de ROS et de l'apoptose.

5.2. La production de ROS et les mécanismes de détoxification

Au niveau des cellules saines, une production exacerbée de ROS peut entraîner des dommages structurels au niveau des lipides, des membranes et de l'ADN.

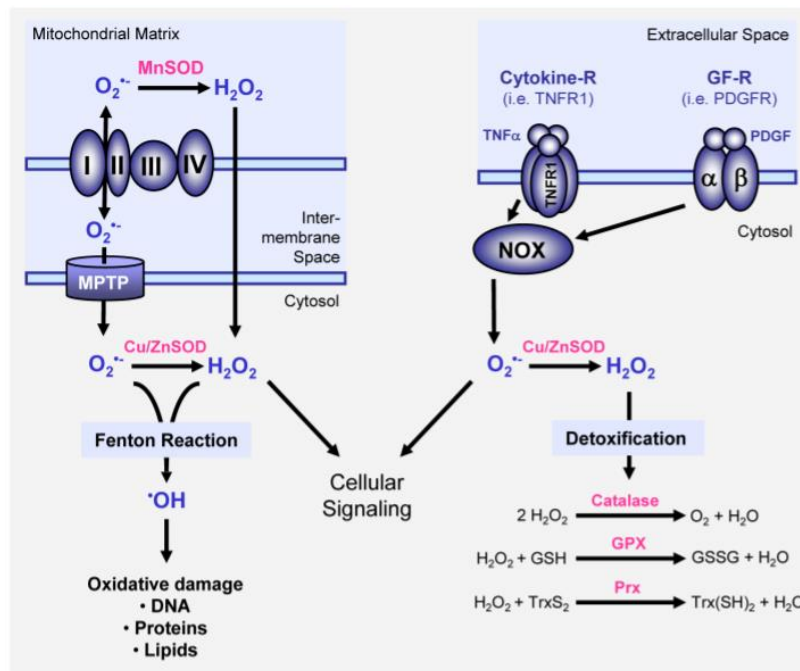


Figure 14 – Les principaux mécanismes de production et de détoxification des ROS. Les radicaux libres sont principalement générés au niveau des complexes I et III de la MMI, et par l'activation d'enzymes telle que la NADPH oxydase (NOX) en réponse à des récepteurs à cytokine (cytokine-R) ou à facteur de croissance (GF-R). Au niveau de la MMI, l' O_2 peut être partiellement réduit et former des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), qui seront rapidement catalysés en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les enzymes superoxydes dismutases (SOD). Il existe deux types de SOD : SOD1 qui est une Cu-Zn superoxyde dismutase (Cu/ZnSOD) située au niveau de l'EIM et SOD2 qui est une Mn-superoxyde dismutase localisée au niveau de la matrice mitochondriale. Plusieurs mécanismes permettent cependant de détoxifier la cellule en réduisant le H_2O_2 en H_2O au travers d'enzymes anti-oxydantes : (1) la glutathion peroxydase (GPX) peut catalyser le glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) afin de convertir le H_2O_2 en H_2O , (2) la catalase peut convertir 2 molécules de H_2O_2 en H_2O + O_2 , (3) la peroxiredoxine (Prx) quant à elle permet de réduire la thioredoxine ($TrxS_2$) en $Trx(SH)_2$ afin de former de l' H_2O . La détoxification du H_2O_2 peut également être réalisée par la réaction de Fenton, qui permet de générer des espèces radicalaires à l'aide de sels métalliques. Le mélange de fer ferreux (Fe^{2+}) et de H_2O_2 permet de donner, après réaction d'oxydo-réduction, des ions ferriques (Fe^{3+}), des radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et des ions hydroxyles (OH^-) (d'après Liou GY et Storz P, 2010).

Deux types de mécanismes permettent la production de ROS : la chaîne de transport de électrons située au niveau de la MMI, et les oxydases telle que la NOX. Afin d'éviter les dommages oxydatifs, les

cellules mettent en place des mécanismes de détoxification par des enzymes telles que les superoxydes dismutases, la catalase, la glutathion peroxydase et la peroxidase, mais également la réaction de Fenton (**figure 14**) (Liou GY et Storz P, 2010). Toute cette chaîne de réaction nécessite le recyclage du glutathion et du NADPH, qui est produit principalement au niveau de la voie des pentoses phosphates.

De par leur métabolisme accéléré, les cellules cancéreuses produisent une quantité élevée de ROS et doivent pouvoir y faire face pour survivre. Cette forte quantité de ROS est à double-tranchant, puisqu'elle peut augmenter le niveau de mutations pro-oncogéniques et activer des voies de signalisation pro-tumorigéniques, mais les ROS peuvent également rendre les cellules cancéreuses davantage sensibles au stress oxydatif et énergétique, et donc à la mort cellulaire. Dans la plupart des cancers, les ROS peuvent aussi être utilisées comme molécule de signalisation dans des processus cellulaires telles que la croissance et la survie des cellules cancéreuses (**figure 15**) (Liou GY et Storz P, 2010).

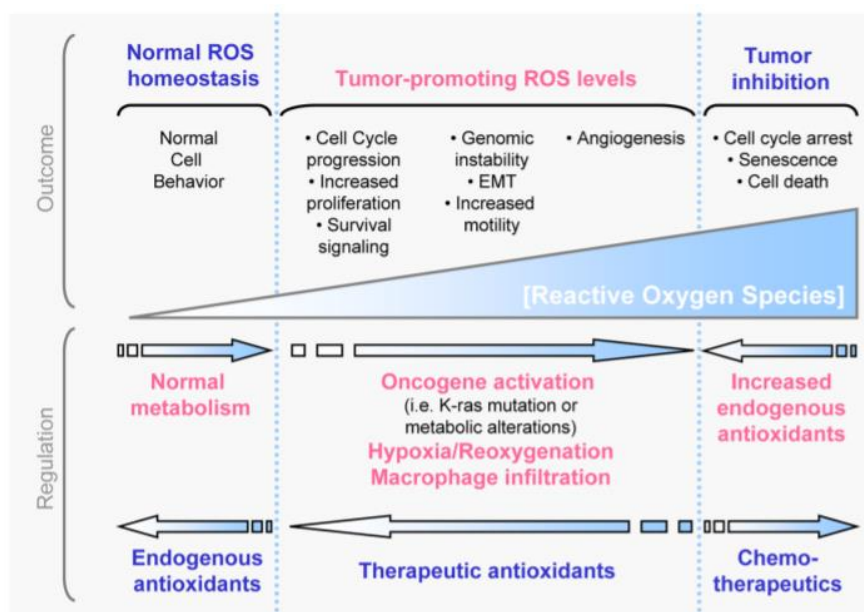


Figure 15 – ROS et cancer. Dans les cellules cancéreuses, des événements tumorigéniques tels que l'activation d'oncogène, les altérations métaboliques, l'hypoxie ou l'infiltration par des macrophages peuvent augmenter la production de ROS intracellulaire. Jusqu'à un certain seuil, l'augmentation de la production de ROS participe à la tumorigénèse, en augmentant la prolifération, la survie, l'EMT. L'augmentation excessive de la production de ROS au-delà d'un certain seuil, par les chimiothérapies par exemple, peut induire un arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et la mort cellulaire (d'après Liou GY et Storz P, 2010).

Par ailleurs, de hauts niveaux de ROS affectent également le métabolisme des cellules. Les cellules cancéreuses, en produisant une grande quantité de ROS, induisent l'oxydation de PKM2 sur le résidu cystéine 358 et le transforment en une forme moins active. Il a été montré que cette oxydation permet

une accumulation des intermédiaires de la glycolyse qui convergent vers la voie PPP, générant ainsi du NADPH + H⁺, ce qui permet alors de générer du GSH, de détoxifier les ROS et de minimiser les dommages cellulaires (Prakasam G et al., 2018).

Dans le cas de la LMC, notre laboratoire a montré *in vitro* et *ex vivo* que les cellules leucémiques résistantes à l'Imatinib présentent une accumulation des intermédiaires du cycle de Krebs au sein de leurs mitochondries, ainsi qu'une augmentation du niveau de NADH et une faible consommation en O₂. Ces dysfonctions mitochondriales ont pour conséquence une augmentation de la production de ROS, comparées aux cellules leucémiques sensibles à l'Imatinib. En conséquence, l'utilisation de médicaments pro-oxydants tels que le PEITC et le Trisenox, permettent d'augmenter la mort cellulaire *in vitro* et d'augmenter la survie *in vivo* dans des modèles de souris syngéniques (Kluza J et al., 2011).

Dans le cas de mélanome muté BRAF^{V600E} et résistants aux inhibiteurs de BRAF (BRAFi), les cellules de mélanome redirigent leur phénotype Warburg vers un métabolisme OXPHOS, conduisant à une augmentation de la production de ROS mitochondriaux. Notre équipe a montré que ces cellules sont davantage sensibles au traitement aux agents pro-oxydants (Corazao-Rozas P et al., 2013). L'oncogène BRAF est capable d'activer le programme de réponse antioxydante dépendante de NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2). Sous BRAFi, les cellules de mélanome résistantes accumulent le facteur NRF2 afin de les protéger contre le stress oxydatif, ce qui pourrait influencer le phénotype métabolique de ces cellules (Trinh A et al., 2018). Dans plusieurs types de cancers, l'expression de NRF2 est augmentée et il a été montré que ce facteur est également impliqué dans le métabolisme mitochondrial, puisque l'inhibition de son expression conduit à la diminution de la respiration mitochondriale dans des modèles de cancer du côlon (Jung KA et al., 2017). Par ailleurs, NRF2 permet également de contrôler la disponibilité des différents substrats pour l'OXPHOS mitochondrial (Holmström KM et al., 2013).

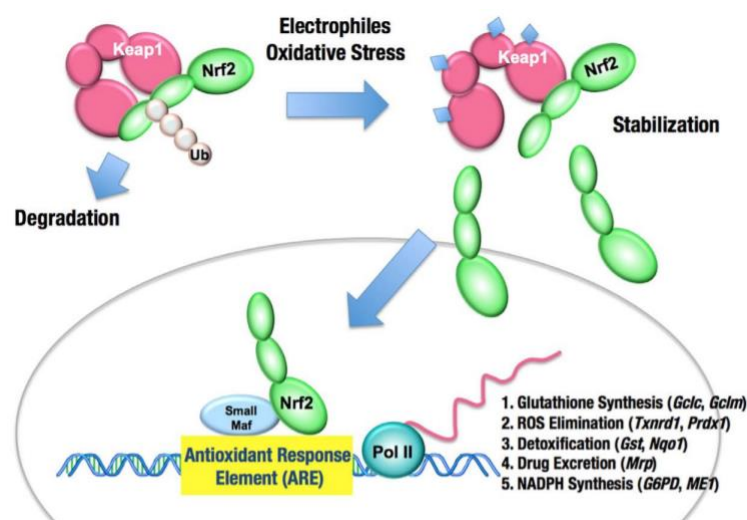


Figure 16 – Implication du facteur NRF2 dans la réponse antioxydante. Lors de l'induction de stress oxydatif, NRF2 se dissocie de Keap1 et est stabilisée. Il s'hétérodimérise avec Maf et se fixe au niveau de l'ARE afin d'activer ses gènes cibles (d'après Mitsuishi Y et al., 2012).

Dans des conditions physiologiques, NRF2 se lie à son répresseur Keap1 (Kelch ECH associating protein) et subit une dégradation protéosomale ubiquitine-dépendante. Dans des conditions de stress oxydatif, la conformation de Keap1 est modifiée et permet de relarguer NRF2, qui est alors transloqué dans le noyau, s'hétérodimérise avec la protéine Maf et se lie aux éléments de réponse aux antioxydant de ses gènes cibles (**figure 16**) (Habib E et al., 2015). En activant ses gènes cibles, NRF2 participe à différentes caractéristiques tumorigéniques tels que la prolifération soutenue, la résistance à l'apoptose, l'angiogenèse, l'invasion et la métastase, l'instabilité génomique ou encore la reprogrammation métabolique (revue par Rojo de la Vega M et al., 2018). Dans le cas du métabolisme, il a été montré que des cellules de cancer pulmonaire mutées Kras et présentant des mutations de Keap1 ou de NRF2 présentent une dépendance à la glutaminolyse et sont davantage sensibles à l'inhibition de la glutaminase par le CB-839 (Romero R et al., 2017). Il a été montré que NRF2 et ses gènes cibles sont aussi impliqués dans la régulation de la respiration mitochondriale au travers de substrats tels que le NADH ou le FADH₂, mais également en régulant l'expression protéique des 5 complexes de l'ETC. Par ailleurs, NRF2 participe également à la biogenèse mitochondriale en activant la transcription de PPAR γ et son co-activateur PGC-1 β (Rojo de la Vega M et al., 2018).

Nous avons montré que le knock-out de NRF2 affectait l'expression protéique de ses gènes cibles, tel que le transporteur xCT codé par le gène SLC7A11 (Trinh A et al., 2018). Il a été montré que l'antiport cystine/glutamate xCT participe à la progression tumorale et que sa surexpression est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients. Au travers de ce transporteur, la cystine captée est convertie en cystéine, qui est une étape importante pour la biosynthèse de glutathion. Par conséquent, en partie au travers de xCT, NRF2 participe ainsi à la protection contre le stress oxydant, mais également contre la mort induite par ferroptose. Par ailleurs, il a été montré que ce transporteur participait à la régulation du métabolisme durant la progression tumorale, notamment en augmentant la dépendance à la glutamine (Koppula P et al., 2018).

Nous avons montré dans un modèle de mélanome BRAF^{V600E} que l'inhibition de xCT par la sulfasalazine permettait de retarder la croissance tumorale *in vitro* (Trinh A et al., 2018). Ce médicament approuvé par la FDA et utilisé dans les maladies inflammatoires de l'intestin s'est également avéré efficace dans un modèle de cancer pulmonaire non à petites cellules, où l'inhibition de xCT permet de diminuer la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses (Ji X et al., 2018). En outre, il a été montré que ce médicament permettait d'augmenter la chimiosensibilité à de nombreux traitements (Huang Y et al., 2005).

5.3. Mitochondries et stress réticulaire

La réponse de stress du réticulum endoplasmique (stress RE) est un processus cellulaire, physiologique ou pathologique, pouvant être induits par de nombreux stimuli, tels que l'hypoxie, à l'accumulation de protéines mal conformées ou la privation en glucose pouvant induire des dommages au sein des cellules (**figure 17**). Notamment, l'accumulation de protéines mal conformées, insolubles ou endommagées peuvent endommager les fonctions cellulaires. De ce fait, la cellule met en place la réponse UPR (Unfolded-Protein Response) afin de lutter contre les défauts de conformation des protéines. Les protéines mal conformées et irréparables sont éliminées par le protéasome via un processus de dégradation associée au RE, ou par la formation d'agregome regroupant les protéines endommagées afin de les recycler par autophagie. L'un des mécanismes impliqués dans ce recyclage protéique est le stress du RE, qui peut induire l'activation de l'autophagie (Schöntal AH et al., 2012).

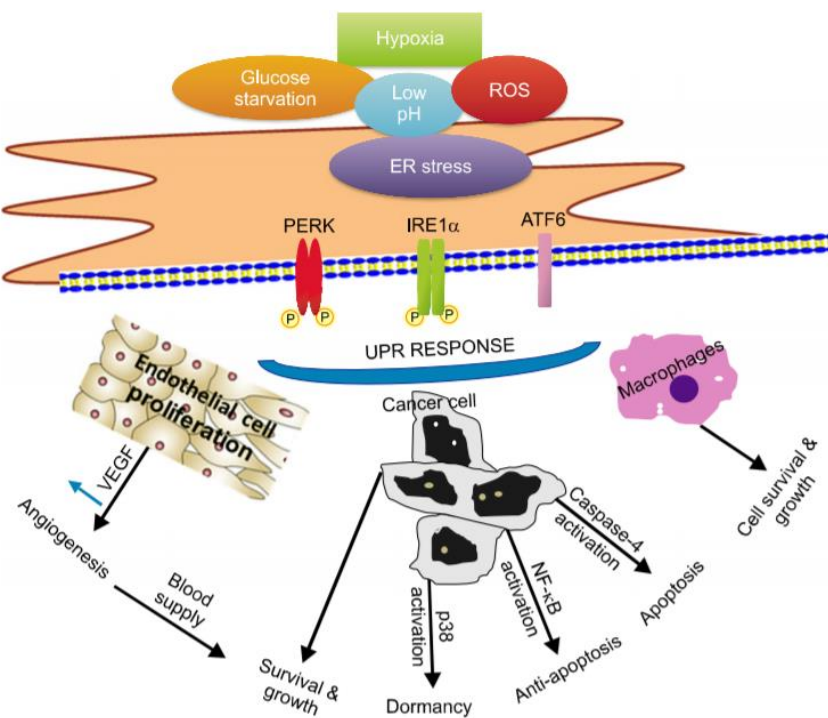


Figure 17 – Causes et conséquences du stress réticulaire dans les cancers. Différents stimuli, tels que l'hypoxie, la privation en glucose, un niveau de ROS élevé ou un pH faible peuvent induire un stress réticulaire. Cette activation du stress du RE induit l'activation de la réponse UPR, qui induit des réponses pro-survie ou pro-apoptotique au niveau des cellules cancéreuses. Ce phénomène participe également à l'angiogenèse des cellules endothéliales afin de favoriser la vascularisation des cellules cancéreuses, mais aussi à la croissance cellulaire et à la dormance tumorale (d'après Yadav RK et al., 2014).

Dans le cas du mélanome muté BRAF^{V600E}, il a été montré que sous BRAFi, ces cellules induisent un remodelage important de leur réseau mitochondrial autour du réticulum endoplasmique (Corzaio-Rozas P et al., 2016). Cette position stratégique permet aux cellules de mélanome de limiter

l'augmentation du calcium cytosolique, puisqu'un excès de cet ion est impliqué dans l'initiation et le déroulement de la mort cellulaire. La mitochondrie joue un rôle majeur dans la protection contre le stress du RE, en captant le calcium relargué par le réticulum endoplasmique de manière dépendante au potentiel de membrane mitochondrial au travers d'un uniport calcique (Orrenius s et al., 2015).

Ce phénomène a été décrit dans de nombreux types de cancers, tels que le cancer du sein, le cancer de la prostate, le lymphome, ou encore le cancer ovarien qui présentent une augmentation des marqueurs liés au stress du RE (Yadav RK et al., 2014).

6. La régulation du métabolisme par les mitochondries dans les cancers

6.1. Les voies de signalisation

6.1.1. La voie MAPK

Dans le contexte de mélanome muté BRAF, l'activation constitutive de la voie MAPK conduit à l'activation de la glycolyse et à l'inhibition de l'OXPPOS mitochondrial. Notre équipe et d'autres ont montré que l'utilisation de BRAFi permet d'inverser le phénotype Warburg en diminuant l'activité glycolytique et en augmentant l'OXPPOS mitochondrial (Corazao-Rozas P et al., 2016). Par ailleurs, les cellules de mélanome résistantes aux BRAFi favorisent et soutiennent la respiration mitochondriale et la production d'ATP en alimentant le cycle de Krebs au travers de la glutaminolyse (Baenke F et al., 2016).

6.1.2. La voie PI3K/Akt/mTOR

La voie PI3K/Akt/mTOR (**figure 18**) joue un rôle clé dans plusieurs types de processus cellulaires physiologiques et pathologiques, telle que la prolifération, la survie, mais également dans la pluripotence et la détermination du devenir des cellules souches (revue par Yu JSL et Cui W, 2016).

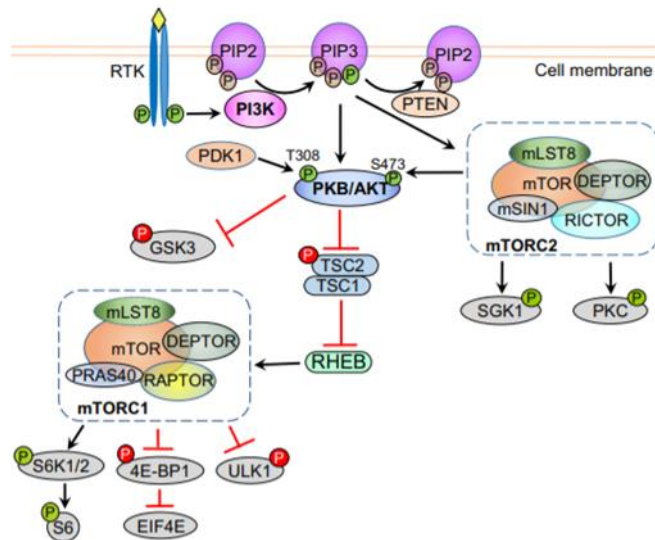


Figure 18 – Mécanistique de la voie PI3K/Akt/mTOR. L’activation de récepteur tyrosine kinase (RTK) active la phosphorylation du PIP₂ en PIP₃, ce qui permet le recrutement d’Akt et la phosphorylation de T308 et S473 par PDK1 et mTORC2 respectivement. Akt, ou protéine kinase B, est alors activée et induit des phosphorylations inhibitrices de GSK3 et TSC2 qui ne peut plus inhiber RHEB et lève l’inhibition sur mTORC1. En phosphorylant ses cibles, mTORC1 active des protéines en aval telles que S6K1/2 et inhibe 4E-BP1 et ULK1. mTORC2 quant à lui peut phosphoryler et activer SGK1 et PKC (d’après Yu JSL et Cui W, 2016).

Dans le cas de cancer du côlon, du cancer du sein et du glioblastome, des auteurs ont montré qu’un traitement anticancéreux par radiation induit une relocalisation de mTOR dans la mitochondrie et une « inversion » de l’effet Warburg, *i.e* une diminution de la glycolyse et une reprogrammation métabolique vers le métabolisme OXPHOS mitochondrial (Lu CL et tal., 2015). Des essais cliniques impliquant des inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR, soit des doubles inhibiteurs PI3K/mTOR, soit des inhibiteurs pan-PI3K ou soit des inhibiteurs spécifiques d’isoformes de PI3K, ont été réalisés (Yang J et al., 2019), mais leur efficacité reste limitée de par le développement de mécanismes de résistance. Une étude a montré que certains inhibiteurs de PI3K induisent une reprogrammation métabolique au niveau des tumeurs. Pour pallier à l’inhibition de PI3K, les cellules cancéreuses peuvent activer des récepteurs aux facteurs de croissance, rephosphoryler Akt et mTOR et augmenter la motilité et l’invasion des cellules tumorales. Dans un modèle de glioblastome, des auteurs ont montré que l’utilisation d’inhibiteurs de PI3K induit un remodelage du réseau mitochondrial au sein de ces cellules afin d’en exploiter les fonctions bioénergétiques pour l’invasion et la survie cellulaire (Ghosh JC et al., 2015). Par conséquent, l’association d’inhibiteurs de PI3K avec un ciblage mitochondrial est une stratégie thérapeutique intéressante afin d’éviter le risque de métastase (Caino MC et al., 2015).

Ces résultats montrent l’importance de la voie PI3K/Akt/mTOR dans le maintien du phénotype Warburg des cellules cancéreuses, puisqu’une inhibition de cette voie conduit à un remodelage métabolique vers l’OXPHOS mitochondrial.

6.2. Autres régulateurs : les glucocorticoïdes et GILZ

6.2.1. Rôle et mode d'action des glucocorticoïdes

Les corticoïdes naturels sont constitués d'une part par l'aldostérone, issue de la voie des minéralocorticoïdes et produite au niveau de la zone glomérulée de la corticosurrénale et d'autre part par le cortisol, issu de la voie des glucocorticoïdes et synthétisé au niveau de la zone fasciculée de la corticosurrénale. Les glucocorticoïdes (GCs), tels que le cortisone et l'hydrocortisone (ou cortisol), sont des hormones stéroïdiennes naturelles de la famille des anti-inflammatoires stéroïdiens. Outre leur rôle anti-inflammatoire, ils possèdent également un rôle comme antiallergiques, immunosuppresseurs et adjuvants anticancéreux. Les GCs peuvent également agir sur le métabolisme énergétique. L'utilisation de la dexaméthasone, un GC de synthèse, permet d'augmenter le métabolisme énergétique hépatique et la néoglucogenèse en agissant sur la fonction mitochondriale (Kuo T et al., 2015).

Les GCs agissent sur des récepteurs nucléaires tel que le récepteur aux GCs (GR). Lorsque les GCs se fixent à leur GR, le dimère GC-GR migre dans le noyau et se fixe sur l'ADN au niveau de gènes présentant une séquence GRE (glucocorticoid response element) afin de transactiver ou de réprimer leurs gènes cibles. Ils peuvent également interagir avec des protéines cytoplasmiques ou membranaires (Kuo T et al., 2015).

6.2.2. Implication des glucocorticoïdes dans les cancers

Les GCs sont efficaces pour induire un arrêt de croissance et induire l'apoptose dans les lymphocytes. Ils ont un intérêt dans certains cancers tels que les tumeurs lymphoïdes ou les leucémies lymphoïdes où ils induisent une réduction de la croissance tumorale, mais sont sans effets sur les carcinomes et les leucémies myéloïdes. Ils sont ainsi préconisés dans tous les cancers lymphoïdes, malgré leurs effets secondaires pouvant persister après arrêt des traitements tels que la faiblesse musculaire, l'ostéoporose et les effets neuropsychiatriques. Dans le cas des leucémies aigües lymphoblastiques chez l'enfant, les GCs permettent une rémission complète mais temporaire (pour revue : Pufall MA et al., 2015).

Les GCs peuvent également avoir un effet sur le métabolisme. Dans un modèle d'hépatome, le traitement à la dexaméthasone permet d'augmenter la fonction mitochondriale, ce qui induit une augmentation de la consommation d'O₂ et de la production de ROS (Hernández-Alvarez MI et al., 2013).

Les GCs ont un rôle dans la tumorigénicité de certains cancers. Dans le cas du cancer du sein, l'activation des GR par les GCs augmente l'hétérogénéité, la colonisation des métastases, et diminue

la survie des souris xénotransplantées *in vivo* (Obradović MMS et al., 2019). Les GCs sont connus pour activer l'expression de gènes codant pour des protéines telle que la protéine GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper) de la famille TSC-22 (TGFβ-stimulated clone-22 domain). De nombreux types cellulaires, dont les cellules hématopoïétiques normales et transformées, surexpriment la protéine intracellulaire GILZ, qui peut être activée par de nombreux stimuli, tels que la dexaméthasone (D'Adamio F et al., 1997), l'estradiol (Tynan SH et al., 2004), l'interleukin-10 (Ronchetti S et al., 2015) ou encore l'hypoxie (Wang Y et al., 2012). Elle possède un rôle majeur en tant que médiateur dans les réponses anti-inflammatoires et immunosuppressives des glucocorticoïdes (Ronchetti S et al., 2015) (Bereshchenko O et al., 2019) et peut interagir directement avec des facteurs de transcription et des protéines de signalisation tel que mTORC2 (Ayroldi E et al., 2007) (Joha S et al., 2012). Cependant, GILZ peut également interférer avec des voies de signalisation intracellulaire contrôlant la prolifération, la différenciation et la survie dans des cellules normales et cancéreuses. En effet, GILZ est capable d'interagir avec les protéines Ras et Raf de la voie MAPK (Ayroldi E et al., 2002) (Ayroldi E et al., 2007), avec les facteurs de transcription FoxO3 (Latré de Laté P et al., 2010) et mTORC2 (Joha S et al., 2012) de la voie PI3K/Akt, ce qui induit alors une inhibition de ces voies de signalisation et a pour conséquence une inhibition de la prolifération cellulaire et une induction de l'apoptose. GILZ est également capable de lier le facteur de transcription p53 et l'E3-ubiquitine-ligase Mdm2 (mouse double minute 2 homolog) qui régule négativement p53. Dans des conditions physiologiques, Mdm2 inhibe l'activation de p53 et régule les réponses au stress médiées par p53. Cependant, dans un modèle de xénotransplante de cancer colorectal p53^{+/+} surexprimant GILZ, des auteurs ont montré que GILZ peut se lier à Mdm2, interférer avec le complexe p53/Mdm2 et stabiliser p53, ce qui induit alors une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses (Ayroldi E et al., 2015). Dans un autre modèle, l'équipe de Riccardi a montré que la surexpression de la forme longue de GILZ (L-GILZ) dans une lignée cellulaire de cancer de la thyroïde déficiente en GILZ (8505C) induisait une inhibition de la prolifération cellulaire *in vitro* et une réduction de la croissance tumorale *in vivo*. La lignée 8505C arborant également la mutation BRAF^{V600E}, les auteurs ont montré que l'inhibition de BRAF par le Vemurafenib, ou de Mek par l'U0126, permettait d'induire une inhibition de la voie MAPK et une réduction de la prolifération cellulaire, ainsi qu'une surexpression de L-GILZ. Ces résultats montrent le rôle de GILZ dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses au travers de la voie MAPK (Ayroldi E et al., 2018).

6.2.3. Implication des glucocorticoïdes dans le métabolisme des cellules cancéreuses

La protéine GILZ est également capable d'influencer le métabolisme des cellules cancéreuses. Notamment, dans le cas des leucémies myéloïdes, la surexpression de cette protéine induit des effets métaboliques en favorisant le métabolisme OXPHOS mitochondrial, leur conférant ainsi un avantage prolifératif. Par ailleurs, la surexpression de GILZ permet également de protéger les cellules

leucémiques de l'apoptose induite par le stress du RE sous traitement par la tunicamycine, un inhibiteur de l'enzyme DGPAT1 impliqué dans la synthèse protéique, induisant alors une accumulation de protéines mal conformées et un stress du RE (André F et al., 2016). Nos travaux ont montré que les cellules leucémiques surexprimant GILZ métabolisent davantage les substrats au sein de leurs mitochondries, puisque l'inhibition de l'entrée du pyruvate, de la glutamine et des acides par l'UK5099, le BPTES et l'etomoxir respectivement, permet de diminuer leur activité d'OXPPOS au même niveau que les cellules de leucémie myéloïde ne surexprimant pas GILZ (André F et al., 2017).

7. Hétérogénéité tumorale et métabolisme

L'hétérogénéité tumorale est l'une des raisons contribuant à l'échec thérapeutique des traitements anticancéreux et la progression de la maladie.

Dans le cas du mélanome muté BRAF^{V600E}, l'équipe de Herlyn a mis en évidence la présence d'une sous-population cyclant lentement et caractérisée par une forte expression de la H3K4 demethylase JARID1B. Cette enzyme serait importante pour induire une croissance tumorale continue et une maintenance de la tumeur, puisque l'inhibition de l'expression de JARID1B conduit à une croissance rapide suivie d'un « épuisement » tumoral (Roesch A et al., 2010). De nombreux traitements anticancéreux, dont le Vemurafenib et la Cisplatine, induisent un enrichissement de cette sous-population, qui serait par ailleurs l'une des causes de résistance intrinsèque à de multiples thérapies dans le mélanome. Les auteurs montrent que les cellules JARID1B^{high} présente une surexpression d'enzymes impliquées dans la synthèse d'ATP OXPPOS. Ainsi, l'inhibition des complexes I, IV ou V de l'OXPPOS par la phenformin, la roténone et l'oligomycine respectivement, en combinaison avec des agents anticancéreux, permet d'inhiber la croissance et l'enrichissement des cellules JARID^{high}, de surmonter la multi-résistance aux thérapies et d'induire des effets sur le long terme contre les cellules de mélanome (Roesch A et al., 2013).

Au sein d'une tumeur solide, il existe une hétérogénéité métabolique : les cellules cancéreuses au centre des tumeurs auront moins accès aux vaisseaux sanguins et seront davantage hypoxiques, alors que les cellules plus en périphérie ont accès à l'O₂ et aux substrats apportés par la circulation sanguine. Il existe cependant une symbiose : puisque la disponibilité du glucose est plus limitée au centre des tumeurs, les cellules cancéreuses « oxygénées » laissent passer le glucose qui sera alors diffusé en plus grande quantité aux cellules plus hypoxiques. Ces dernières utiliseront préférentiellement la glycolyse pour leur métabolisme et leur survie, excréant alors du lactate et créant ainsi un gradient de lactate qui reflète le gradient d'O₂ au sein de la tumeur. Par ailleurs, les cellules cancéreuses oxygénées

peuvent utiliser le lactate pour alimenter leur respiration mitochondriale. Cette symbiose entre les cellules cancéreuses oxydatives et glycolytiques permet ainsi d'optimiser la croissance tumorale (figure 19) (Sonveaux P et al., 2008).

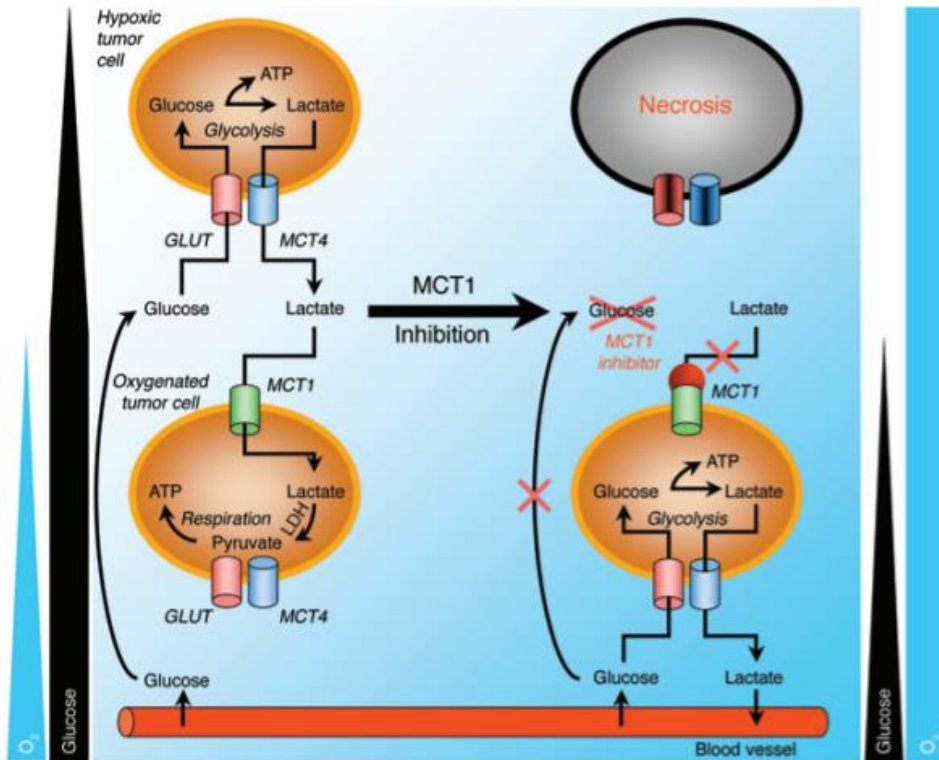


Figure 19 – Symbiose entre cellules cancéreuses hypoxiques et cellules cancéreuses oxygénées. Au sein d'une même tumeur solide, les cellules cancéreuses à proximité des vaisseaux sanguins ont davantage accès à l'O₂ et aux substrats tel que le glucose, en comparaison des cellules cancéreuses à distance qui sont plus hypoxiques. Les cellules oxygénées laissent diffuser le glucose aux cellules hypoxiques, et captent le lactate par le transporteur MCT-1 qu'ils utilisent pour leur respiration mitochondriale. L'inhibition de MCT-1 annule cette symbiose et oblige les cellules oxygénées à utiliser le glucose, affamant ainsi les cellules hypoxiques qui mourront (d'après Sonveaux P et al., 2008).

Dans des lignées de cancer du col de l'utérus squameux et dans des modèles *in vivo* de xélogreffe de cellules d'adénocarcinome colorectal et de cancer du poumon, l'inhibition de l'import du lactate par siRNA ou par le CHC induit un switch de la respiration lactate-dépendante vers la glycolyse dans les cellules cancéreuses oxygénées. Ce switch métabolique induit un ralentissement de la croissance tumorale et la mort des cellules hypoxiques, qui n'ont alors plus accès au glucose puisque ce substrat est utilisé par les cellules oxygénées. Les auteurs montrent que les cellules restantes sont davantage sensibles aux irradiations (Sonveaux P et al., 2008). Dans un modèle de cancer de la prostate, le contact de cellules cancéreuses et de fibroblastes associés aux cancers (FACs) induit une reprogrammation métabolique mutuelle, redirigeant ainsi le métabolisme des FACs vers la glycolyse aérobie, et celui des cellules cancéreuses vers un métabolisme indépendant du glucose grâce à une augmentation de la consommation de lactate pour leur croissance cellulaire. Ainsi, l'inhibition pharmacologique de MCT-

1 permet d'affecter la survie et la croissance des cellules cancéreuses de prostate (Fiaschi T et al., 2013).

8. Implications de mécanismes non métaboliques dans la résistance aux traitements anticancéreux

8.1. Les cellules souches cancéreuses

8.1.1. Les caractéristiques particulières des cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses (CSCs) représentent une sous-population de cellules avec des caractéristiques particulières d'auto-renouveaulement, de différenciation, de dédifférenciation et d'initiation tumorale lorsqu'elles sont transplantées chez des animaux hôtes. Par ailleurs, ces CSCs sont également capables de reprogrammation métabolique, immunologique, épithélio-mésenchymal et épigénétique afin de s'adapter au microenvironnement cellulaire et de survivre au système immunitaire de l'hôte et aux thérapies anticancéreuses. La première mise en évidence des CSCs date du 19^{ème} siècle, où Cohnheim avait postulé que les cancers étaient la conséquence d'une prolifération expansive de restes de cellules embryogéniques (Sell S et al., 2004).

8.1.2. Les marqueurs des cellules souches cancéreuses

Il existe plusieurs types de marqueurs permettant de distinguer les CSCs dans les cancers : (1) les facteurs de transcription, (2) les voies de signalisation dérégulées ou encore (3) le métabolisme spécifique des CSCs.

8.1.2.1. Les facteurs de transcription

Dans la littérature, plus d'une vingtaine ont été décrits comme étant exprimés dans les CSCs et participent aux caractéristiques de souchitude tel que la maintenance du pool de CSCs et l'auto-renouveaulement. Nous pouvons distinguer entre-autres les facteurs OCT4, SOX2 et Nanog, dont l'expression est souvent associée à un mauvais pronostic dans les cancers tels que le cancer de l'œsophage squameux (Li C et al., 2012), le mélanome (Zimmerer RM et al., 2013), le cancer rénal (Rasti A et al., 2018).

Le facteur Nanog est impliqué dans la régulation du métabolisme mitochondrial et joue un rôle clé dans la tumorigenèse. Dans un modèle d'oncogenèse hépatique, des auteurs ont montré que l'expression de Nanog induit une répression des gènes OXPHOS et de la synthèse des ROS, mais active la FAO pour soutenir l'auto-renouveaulement des CS initiatrices de tumeur (CIT) et induire une résistance au Sorafenib, un inhibiteur multi-kinase. Dans ce contexte, l'inhibition de Nanog, ou de la FAO par

l'Etomoxir, induit une augmentation de la respiration mitochondriale et restaure la sensibilité au Sorafenib (Chen CL et al., 2016).

Dans le cas du mélanome muté BRAF^{V600E}, SOX2 est surexprimé lors d'une acidose extracellulaire importante. Une étude a montré une corrélation étroite entre l'expression de SOX2 et la modulation du métabolisme OXPHOS. En effet, l'inhibition de SOX2 conduit à l'inhibition du facteur de biogenèse mitochondrial PGC1 α et à l'induction du métabolisme glycolytique. Dans ce modèle, SOX2, en favorisant le métabolisme oxydatif, participe à la résistance aux traitements anticancéreux ainsi qu'au potentiel métastatique des cellules cancéreuses (Andreucci E et al., 2018).

8.1.2.2. Les cascades de signalisation

Des auteurs montrent que des voies de signalisation impliquant Akt et Foxo3a sont impliquées dans la suppression de l'apoptose des cellules initiatrices de leucémie (LICs) *in vitro* and *in vivo*, ainsi que le TGF- β 1 dans la capacité de formation des colonies des LICs. En outre, l'inhibition du TGF- β 1 en combinaison avec l'Imatinib semble être une stratégie efficace pour dépler les cellules de LMC *in vivo* (Naka K et al., 2010).

8.1.2.3. Le métabolisme des cellules souches cancéreuses

L'une des causes pouvant expliquer l'échec thérapeutique des TKI dans les LMC est que les cellules les plus immatures se reposent davantage sur la respiration mitochondriale pour leur métabolisme que sur l'activité glycolytique. Dans un modèle de LAM, les auteurs montrent que lors de l'inhibition de la respiration mitochondriale par l'ABT-263 ou par l'oligomycine et l'antimycine A, les CSL sont incapables d'utiliser la glycolyse pour compenser, contrairement aux cellules CD34⁺ issues de donneurs sains. Par conséquent, le métabolisme mitochondrial joue un rôle clé dans la survie des CSL de LAM (Lagadinou ED et al., 2013). L'équipe de JE Sarry a montré que sous traitement à la chimiothérapie Ara-C, les cellules leucémiques sont enrichies en CSLs immatures et quiescentes. Ils montrent que ces cellules présentent une augmentation de la production de ROS, de la masse mitochondriale et de mitochondries polarisées actives, montrant que les CSLs nécessitent le métabolisme OXPHOS pour survivre. Par ailleurs, ces cellules présentent une augmentation de la FAO (Farge T et al., 2017). Dans des échantillons primaires de patients LMC, Kuntz et collègues ont montré que les cellules immatures CD34⁺ présentent une activité OXPHOS significativement plus importante que les cellules différenciées CD34⁻ ou les cellules saines CD34⁺. Des analyses de métabolomique montrent notamment un enrichissement des intermédiaires du cycle de Krebs tels que l'aspartate, le glutamate, l' α -KG et le malate dans les CSL (Kuntz EM et al., 2017).

Plusieurs études ont montré que la surexpression de la sirtuin 1 (SIRT1) déacétylase contribue également à la maintenance des CSL. SIRT1 participe à la leucémogénèse en inhibant le suppresseur de tumeur p53 et en augmentant l'expression du facteur PGC-1 α (peroxisome-proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α) qui est impliqué dans la biogénèse mitochondriale et l'augmentation de l'OXPPOS mitochondrial. Des auteurs ont récemment montré l'importance de SIRT1 dans le développement leucémique, puisque la délétion de SIRT1 dans des souris transgéniques BCR-Abl⁺ permet de retarder le développement de la leucémogénèse, de la neutrophilie, de la splénomégalie et de la mort. L'inhibition de l'expression de SIRT1 permet également de réduire la quiescence des CSL de LMC, en diminuant les cellules en phase G₀ et en augmentant les cellules en phase G₁. Ils montrent que l'association d'une inhibition de SIRT1 et de BCR-Abl par des TKI permet d'augmenter l'apoptose et l'inhibition de la prolifération des cellules leucémiques, en comparaison au traitement au TKI seul (Abraham A et al., 2019).

Le métabolisme des acides gras est souvent dérégulé dans les cellules cancéreuses et présente un rôle majeur dans la régulation de la souchitude des cellules cancéreuses. Dans les CSCs, l'expression de FASN et la synthèse des acides gras est souvent augmentée dans des cancers tels que le gliome, le cancer du pancréas et le cancer du sein, et l'expression d'ACLY dans le cancer du sein ou le cancer du poumon où il participe à la transition épithélio-mésenchymateuse (revue par Kuo CY et Ann DK, 2018).

Dans le gliome, il a été montré que les carbones issus du glucose étaient utilisés pour la synthèse *de novo* des acides gras, montrant que la glycolyse, en contribuant au pool d'acides gras, pourrait soutenir la FAO (Yasumoto Y et al., 2016). L'inhibition du métabolisme de la β -oxydation des acides gras pourrait donc être efficace pour cibler les cellules souches cancéreuses. Dans le cas de LAM, l'inhibition de la FAO par l'etomoxir permet de réduire la sous-population de cellules leucémiques progénitrices quiescentes d'environ 50% (Samudio I et al., 2010).

8.1.3. Ciblage des CSCs

Différentes stratégies ont été développées afin de cibler spécifiquement les CSCs. Elles peuvent consister en un ciblage des marqueurs de surface des CSCs (CD33, CD90) ou des cascades de signalisation spécifiques aux CSCs (Notch, Hedgehog), mais également le microenvironnement des CSCs (VEGF, pH extracellulaire). D'autres travaux ont montré que les CSCs pouvaient également être ciblées en inhibant le métabolisme (Metformin) ou en induisant l'apoptose (Bcl-2) (**tableau 4**) (Dawood S et al., 2014).

Targeting Strategy	Target or Agent
Surface markers (targeting markers on the surface of the CSC using specific agents)	CD44 CD90 CD133 CD33
Signal cascades (targeting aberrant pathways, which can suppress certain characteristics of the CSC)	Notch Hedgehog Wnt/beta-catenin NF-κB PTEN JAK/STAT PI3K/AKT CXCR1/CXR2
Microenvironment (interfering with the function of CSCs by disrupting the microenvironment that enriches CSCs)	CXCL12/CXCR4 VEGF/VEGF-R Weakly acidic pH
Epigenetic mechanisms (targeting DNA methylation, histone modification, and RNA-mediated targeting—all of which are thought to be important regulators of CSCs)	Histone deacetylases MicroRNAs
Other strategies	•Metformin
•Metabolism (disrupting CSC metabolism)	
•Quiescence (disrupting the nondividing state of CSCs)	•G-CSF
•Apoptosis (disrupting the process by which CSCs evade cell death)	•Bcl-2

Bcl-2 = beta-cell lymphoma 2; CSC = cancer stem cell; CXCR = CXC chemokine receptor; CXCL = CXC chemokine ligand; G-CSF = granulocyte colony-stimulating factor; JAK/STAT = Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription; NF-κB = nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells; PI3K/AKT = phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B (also known as AKT); PTEN = phosphatase and tensin homolog; VEGF = vascular endothelial growth factor; VEGF-R = VEGF receptor.

Tableau 4 – Stratégies et thérapies ciblant les CSCs. Les caractéristiques particulières des CSCs ont permis de développer des stratégies permettant un ciblage spécifique de ces cellules, en ciblant les marqueurs de surface, les cascades de signalisation, le microenvironnement, les mécanismes épigénétiques, ou le métabolisme et la quiescence (d’après Dawood S et al., 2014).

8.2. La dormance tumorale et la maladie résiduelle minimale

8.2.1. La maladie résiduelle minimale

La maladie résiduelle minimale (MRD pour *minimal residual disease*) est mesurée de manière post-thérapeutique lorsque le patient est en rémission, sans symptômes et sans signes apparents de la leucémie. Elle représente la quantité de cellules leucémiques résiduelles indétectables par les techniques de détection conventionnelles, telle que la qPCR. Du fait de la MRD, il est donc difficile de déterminer si les traitements ont permis d’éradiquer le cancer, ou si des cellules persistent encore dans l’organisme. La présence de ces cellules résiduelles est d’ailleurs souvent à l’origine de rechute chez les patients.

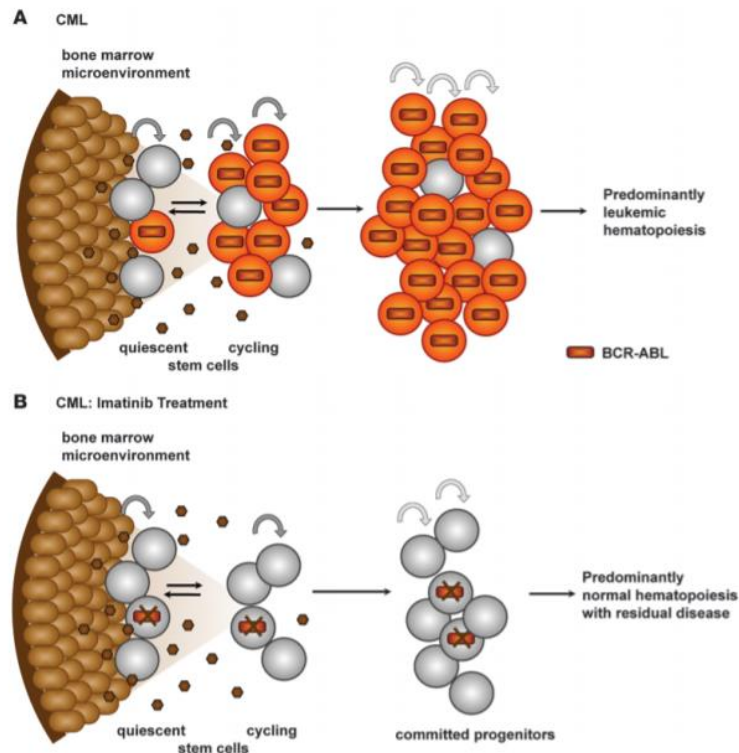


Figure 20 – Modèle de la maladie résiduelle minimale dans les LMC traitées à l’Imatinib. (A) Chez les patients atteints de LMC, la moelle osseuse est constituée par des cellules hématopoïétiques saines (en gris) et des cellules leucémiques présentant BCR-Abl sous forme active (en orange). La présence de cet oncogène permet aux cellules leucémiques de proliférer de manière intensive et d’envahir la moelle osseuse. (B) Sous traitement à l’Imatinib, l’activité BCR-Abl est supprimée dans les CSL, qui peu à peu survivent de manière indépendante à cet oncogène. De par la diminution de la survie des cellules leucémiques proliférantes, une homéostasie est rétablie au niveau de la moelle osseuse. Cependant, le microenvironnement de la moelle osseuse est capable de soutenir la survie des cellules leucémiques BCR-Abl-indépendante et participe à la maladie minimale résiduelle (d’après Corbin AS et al., 2011).

Dans le cas de cellules de LMC, la présence de BCR-Abl permet aux cellules leucémiques de proliférer de manière anarchique en activant des voies de signalisation. Cependant, bien que l’Imatinib affecte la survie des cellules leucémiques proliférantes, la pression de traitement peut conduire à la suppression de BCR-Abl dans les cellules leucémiques persistantes ou à la sélection d’une population de CSL indépendante de BCR-Abl, contribuant ainsi à la MRD (**figure 20**) (Corbin AS et al., 2011). Chez des patients LMC en phase chronique, traités par l’Imatinib et présentant une MRD indétectable, l’étude TWISTER a cherché à déterminer si le traitement pouvait être interrompu sans rechute. Pendant 24 mois, les patients ont été contrôlés fréquemment afin de détecter une éventuelle perte de la réponse moléculaire majeure (RMM). Les résultats ont montré que 47.1% des patients étaient en rémission stable sans traitement, et que chez les patients ayant rechuté, les rechutes se sont produites environ 4 mois après avoir arrêté l’Imatinib. Une technique hautement sensible de PCR spécifique du transcrit BCR-Abl a permis de montrer que le clone original de la LMC était toujours présent chez les

patients, même lors d'une MRD indétectable et après plusieurs années d'arrêt de l'Imatinib (Ross DM et al., 2013).

La MRD a été décrite dans d'autres types de cancer, tels que le cancer du sein, le cancer de l'estomac, le lymphome, le mélanome (pour revue : Aguirre-Ghiso JA, 2007) où elle a été détectée principalement au niveau de la moelle osseuse et des ganglions lymphatiques, mais également d'autres organes tels que le foie ou les poumons.

8.2.2. La dormance tumorale

La dormance est un phénomène physiologique se produisant au niveau des CSH. Des auteurs ont montré qu'il existe une hiérarchie parmi les CSH, avec à son sommet la population de CSH dormantes définie par des marqueurs spécifiques ($CD34^- CD48^- CD150^+ CD135^-$) et capable de donner une population de CSH $CD34^+$ s'auto-renouvelant activement. La dormance tumorale est un phénomène rare, puisque qu'elle représenterait 0.000125% des cellules de la moelle osseuse, soit 12 cellules/million (Wilson A et al., 2007). Ces CSH dormantes seraient localisées au niveau de « niches dormantes » (faible tension en O_2 et matrice extracellulaire dense) au niveau de l'endosteum permettant la maintenance sur le long-terme de ces cellules dormantes, alors que les CSH actives seraient présentes au niveau des capillaires sinusoides de la zone périvasculaire de la moelle osseuse. Les CSH dormantes seraient activées en réponse à des signaux de blessure (Wilson A et Trumpp A, 2006). Il a été montré que dans de nombreux types de cancer, la moelle osseuse représente une niche privilégiée par les cellules tumorales disséminées (DTCs) car elle permet de procurer un microenvironnement permettant de maintenir la quiescence des cellules tumorales. Elle représenterait ainsi un réservoir de DTCs (Sai B et Xiang J, 2018).

La dormance tumorale est un état d'arrêt mitotique temporaire (Hadfield G, 1954). Dans les cancers, ce phénomène a été décrit dans de nombreux types de cancers, tels que le cancer de la prostate, le mélanome, le lymphome B (Wang S et Lin SY, 2013), le cancer du sein (Meng S et al., 2004) ou encore la LMC (Saudemont A et Quesnel B, 2004). La dormance peut se produire à des stades précoces du développement tumoral, ou même après échappement aux traitements anticancéreux. Elle serait causée par la présence de DTCs pouvant être présentes de manière asymptomatique et indétectable durant une période temps plus ou moins longue (Wilson A et al., 2007). Sous traitements anticancéreux, certaines cellules tumorales résiduelles sont maintenues dans le microenvironnement tumoral de souris immunocompétentes grâce à un équilibre avec le système immunitaire. Ce dernier permettrait d'empêcher l'expansion des cellules tumorales proliférantes et de favoriser le maintien des cellules tumorales dormantes. Des études dans des modèles de lymphome et de leucémie ont montré que la sortie de l'état de dormance tumorale pourrait être due à un échappement au système

immunitaire (Teng MWL et al., 2008). Par ailleurs, de nombreux acteurs semblent intervenir dans la mise en place de la dormance tumorale. Afin de limiter la vascularisation de la niche dormante, des cellules T CD4⁺ relarguent des chimiokines CXCL9 et CXCL10 ayant des effets anti-angiogéniques et anti-tumoral. Les cellules natural killer (NK) sécrètent de la perforine permettant d'inhiber la croissance métastatique. Les cellules Tregs peuvent sécréter des cytokines tels que le TGF- β ou l'IL10 pour diminuer l'activité des cellules T (Wang H et Lin SY, 2019). Dans un modèle de LAM, notre équipe a montré que des cellules leucémiques issues de dormance tumorale présentent une augmentation de l'expression de B7-H1/PD-L1 (programmed death-ligand 1), le ligand du récepteur PD-1 et de B7-1/CD80, le ligand du récepteur CTLA-4, leur permettant ainsi de résister à la lyse médiée par les cellules T CD8⁺ (Saudemont A et Quesnel B, 2004). Par conséquent, le ciblage du système immunitaire médié par la dormance tumorale pourrait être un moyen de cibler les cellules tumorales dormantes.

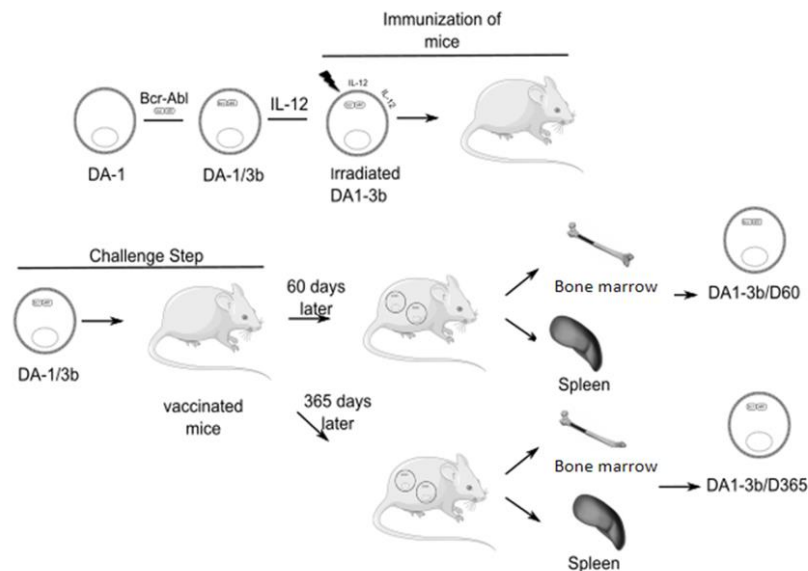


Figure 21 – Mise en place d'un modèle de dormance tumorale de LMC. Des cellules DA1-3b (BCR-Abl⁺) ont été traitées par de l'IL-12 et irradiées à 100Gy et injectées à des souris (n=30). Chaque souris a reçu 3 injections de cellules leucémiques irradiées à une semaine d'intervalle. Afin d'activer l'immunité, les souris ont reçu une injection intrapéritonéale de 10⁴ cellules DA1-3b sept jours après. Deux souris ont été sacrifiées à t=60 et t=365 jours, et les cellules leucémiques ont été isolées de la rate et de la moelle osseuse. Elles constituent alors les cellules leucémiques issues de dormance tumorale J60/D60 et J365/D365 (d'après Saudemont A et Quesnel B, 2004).

Notre équipe a mis en place un modèle de dormance tumorale de LMC à partir d'un modèle syngénique. Puisque le système immunitaire semble jouer un rôle dans la dormance tumorale, les souris ont été injectées avec des cellules leucémiques traitées avec de l'IL-12 et irradiées. Après plusieurs « vaccinations », les souris ont été injectées avec des cellules leucémiques DA1-3b 7 jours après la dernière vaccination. Les cellules leucémiques sont restées présentes de manière

asymptomatique dans les souris. Après 60 et 365 jours, des souris ont été sacrifiées et les cellules leucémiques ont été isolées de la moelle osseuse et de la rate, formant ainsi les cellules issues de dormance tumorale J60 et J365 (**figure 21**) (Saudemont A et Quesnel B, 2004). De manière intéressante, bien que n'ayant jamais été en contact avec des thérapies anticancéreuses, les cellules issues de dormance tumorale sont plus résistantes à des chimiothérapies telle que l'AraC, aux irradiations mais également aux thérapies ciblées telle que l'Imatinib. Le développement de la résistance à l'Imatinib serait médié par la méthylation de SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) et une dérégulation subséquente des médiateurs et activateurs de la voie JAK/Stat, permettant d'induire une surproduction et une boucle autocrine d'IL-3 (**figure 22**). Par conséquent, l'inhibition de JAK2 par l'AG490 permet de diminuer la résistance des cellules dormantes aux lymphocytes T cytotoxiques (Saudemont A et al., 2007).

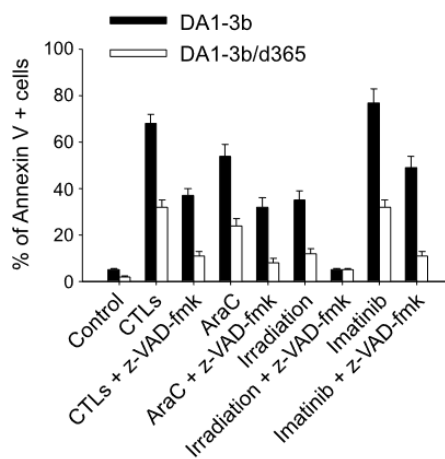


Figure 22 – Sensibilité des cellules leucémiques naïve et issue de dormance tumorale à différentes thérapies anticancéreuses. Les cellules leucémiques BCR-Abl⁺ naïves (DA1-3b) et issues de dormance tumorale (DA1-3b/d365) ont été traitées à différentes thérapies anticancéreuses et la viabilité a été déterminée (d'après Saudemont A et al., 2007).

De par leur faible nombre, leur détection, leur localisation et leur dispersion au sein de l'organisme, le ciblage des cellules tumorales responsables de la MRD est rendue difficile. Certains patients traités par des thérapies anticancéreuses et en rémission sans progression présentent des DTC plusieurs dizaines d'années après traitements (Sai B et Xiang J, 2018) (Meng S et al., 2004). En conclusion, cibler les DTCs et la dormance tumorale représente une implication clinique majeure afin d'éradiquer la MRD et d'empêcher les rechutes chez les patients.

8.3. Rôle du microenvironnement dans la réponse et la résistance des cellules cancéreuses aux thérapies anticancéreuses

Il est aujourd'hui connu que le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans la tumorigenèse des cellules cancéreuses et la résistance aux traitements anticancéreux.

8.3.1. Les cellules mésenchymateuses

8.3.1.1. Les cellules stromales

Des auteurs ont montré que sous cytarabine, les cellules leucémiques adhérentes aux cellules mésenchymales de la moelle osseuse sont plus résistantes que les cellules non adhérentes. En effet, les cellules mésenchymales stromales de la moelle osseuse sont capables de protéger les CSL et les cellules progénitrices en leur transférant leurs mitochondries fonctionnelles, leur permettant ainsi de survivre aux traitements (Moschoi R et al., 2016).

8.3.1.2. Les fibroblastes

Dans le cas du cancer de la prostate, il existe une reprogrammation métabolique mutuelle entre les cellules cancéreuses associées aux fibroblastes et les fibroblastes associés aux cancers (FACs), sous contrôle de HIF-1. Au contact des cellules cancéreuses, les fibroblastes acquièrent un phénotype de type « Warburg » et un stress oxydatif mitochondrial, augmentent l'expression du transporteur au glucose GLUT1, ainsi que la production et l'export de lactate par le transporteur MCT-4. Les cellules cancéreuses quant à elles deviennent peu à peu indépendante au métabolisme du glucose : elles diminuent l'expression de GLUT-1 et augmentent l'import du lactate au travers du transporteur MCT-1. Ces cellules peuvent alors utiliser le lactate pour alimenter les voies anaboliques et donc la croissance cellulaire (Fiaschi T et al., 2012). Dans le CPNPC, des auteurs ont montré que les FACs augmentent l'expression de la PDH et en réduisant celle de la PDK1, ce qui signifie que les cellules du stroma utilisent le lactate produit par les cellules tumorales afin d'empêcher une acidose trop importante au niveau du microenvironnement tumoral (Koukourakis MI et al., 2005). Outre leur implication dans le métabolisme glycolytique des cellules tumorales, les FACs sont aussi impliqués dans la progression tumorale en favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), l'induction de caractéristiques de souchitude et la dissémination métastatique (LaMonte G et al., 2013).

8.3.1.3. Les adipocytes

De nombreuses études ont montré que l'obésité est associée à une augmentation de l'incidence et de la mortalité dans des cancers, qui pourrait être médiée par une inflammation chronique augmentant le risque de cancer. L'augmentation de l'expression de FASN, et donc de la synthèse des acides gras,

est corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers de la prostate, du côlon, du sein, gastrointestinal et ovarien (revue par Stone TW et al., 2018).

Dans de nombreux types de cancers, il a été montré que la présence des adipocytes dans le microenvironnement tumoral permettait de fournir de l'énergie pour une croissance rapide et d'augmenter le potentiel invasif des cellules cancéreuses adjacentes. La présence d'adipocytes permettrait de réguler le métabolisme des cellules cancéreuses par des modifications génétiques et épigénétiques, mais également par la disponibilité des lipides dans le microenvironnement. A l'inverse, les cellules cancéreuses sont également capables de moduler le métabolisme des adipocytes.

Dans le cas du cancer ovarien, les adipocytes induisent dans un premier temps la métastase et le *homing* des cellules cancéreuses au niveau de l'omentum au travers de la sécrétion d'adipokines et d'IL-8. Dans un second temps, le contact des cellules de cancer ovarien avec les adipocytes induit une lipolyse dans cette dernière : les adipocytes sécrètent des lipides, qui seront captés par les cellules cancéreuses et métabolisés au travers de la FAO pour produire de l'énergie afin de permettre une prolifération tumorale rapide (Nieman KM et al., 2011). Dans un modèle de co-culture d'adipocytes différenciées et de cellules de mélanome muté BRAF^{V600E}, les adipocytes sont capables de moduler le métabolisme des cellules cancéreuses en leur transférant des acides gras à longue chaîne, que les cellules de mélanome captent grâce à l'augmentation de l'expression du transporteur membranaire de lipides FATP/SLC27A1. Ces acides gras sont ensuite captés dans la mitochondrie par le transporteur aux lipides CPT1 et permettent d'augmenter leur respiration mitochondriale. L'Etomoxir, un inhibiteur de CPT1, permet ainsi de diminuer significativement l'OXPPOS des cellules de mélanome et l'inhibition du transporteur FATP par la Lipofermata permet d'inhiber le transport membranaire de lipides, conduisant ainsi à une diminution de la croissance tumorale et du potentiel invasif *in vivo* (Zhang M et al., 2018).

Chez les humains adultes, la moelle osseuse est constituée par 50 à 70% de tissu adipeux. En co-culture avec des adipocytes, les blastes de leucémie présentent une augmentation de la prolifération, de la survie et de l'OXPPOS, alors que la co-culture d'adipocytes avec des cellules CD34⁺ de donneurs sains n'induit aucun effet au niveau de ces dernières. Au contact des adipocytes, les blastes provoquent la surexpression de la protéine chaperonne FABP4 (fatty acid binding protein 4) et la lipolyse au niveau des adipocytes. Les AG ainsi libérés sont ensuite captés par les blastes pour leur β -oxydation. L'inhibition de FABP4 ou le traitement à l'Etomoxir permet de diminuer significativement l'OXPPOS et la survie des cellules de LAM (Shafat MS et al., 2017).

8.3.1.4. Les ostéoblastes

Au niveau de la moelle osseuse, les cellules leucémiques sont capables de remodeler la niche de la moelle osseuse afin de créer une niche leucémique permettant de renforcer la fonction des CSLs et de détériorer l'expansion des CSH. Pour cela, les cellules de LMC stimulent la production de cytokines tels que le TPO et le CCL3, et induisent des interactions cellulaires directes altérant le TGF- β , NOTCH et la signalisation pro-inflammatoire afin de remodeler les ostéoblastes au niveau du microenvironnement de la moelle osseuse. Ces derniers diminuent la production de facteurs impliqués dans le maintien normal des CSH et à la place supportent les CSLs (Schepers K et al., 2013). L'effet protecteur de la niche ostéoblastique a également été démontrée dans le cas du mélanome. En effet, les cellules de mélanome sont capables d'induire la différenciation des ostéoblastes et d'augmenter la production de ligands tel que RANKL, qui à son tour active la transcription du facteur MITF permettant ainsi de soutenir la prolifération et la survie des cellules de mélanome, et ce même en présence d'inhibiteurs de BRAF (BRAFi) (Ferguson J et al., 2019).

8.3.2. L'échappement au système immunitaire

La raison pour laquelle les cellules cancéreuses échappent au système immunitaire n'est à ce jour pas totalement élucidée. L'une des raisons connue est la dérégulation des points de contrôle immuns qui conduit à la dérégulation des voies de signalisation inhibitrices des cellules T (Pardoll DM et al., 2012).

Dans la LMC, des auteurs ont montré qu'en présence de cellules leucémiques en phase chronique ou en crise blastique exprimant un antigène spécifique des cellules leucémiques, la glycoprotéine du virus lymphocytaire choriomeningitis, les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) spécifiques de leucémie présentent un épuisement et une diminution de leur activité cytotoxique. Même après stimulation, ces CTLs ne sont plus capables de produire du TNF ou des IFN- γ . Les CTLs et les cellules leucémiques présentent une surexpression de la protéine de surface PD-1 de du ligand PD-L1 respectivement. Les auteurs ont montré que le blocage de l'interaction PD-1/PD-L1 était efficace pour prolonger la survie de souris (Mumprecht S et al., 2009). Par ailleurs, il a été montré que la sécrétion d'IFN- γ par les CTLs permet dans un premier temps d'induire l'expression de PD-L1 au niveau de différents cancers dont les leucémies, et que les CSLs présentent une augmentation de l'expression du récepteur à l'IFN- γ (IFN γ R) (Riether C et al., 2015).

L'échappement au système immunitaire dans les mélanomes serait en partie due à une machinerie reconnaissant les antigènes devenue inefficace, conduisant progressivement à l'inhibition de la capacité des cellules T CD8⁺ à reconnaître les antigènes cibles au niveau des cellules cancéreuses (Maeurer MJ et al., 1996). D'autres mécanismes ont été décrits, telle qu'une inefficacité de reconnaissance des cellules de mélanome due à une diminution des complexes majeurs

d'histocompatibilité de classe I (MHC I) conduisant à la diminution de lymphocytes infiltrant le mélanome, ou l'augmentation du relargage de molécules pro-apoptotiques tels que FasL, TRAIL, conduisant à la mort des cellules du système immunitaire (**tableau 5**) (revue par Passarelli A et al., 2017). Dans des tumeurs primaires de mélanome réséquées, des auteurs ont montré que les cellules de mélanome présentaient une signature spécifique d'une activation de cellule immune et une augmentation de l'expression de PD-L1 (Kakavand H et al., 2017).

<i>Mechanism</i>	<i>Population(s)/Pathway(s)</i>	<i>Effect(s) on TME</i>
Defective recognition of melanoma cells	Downregulation, mutation or loss of MHC class I Melanoma antigens Defective antigen presentation	Suboptimal activation of melanoma infiltrating lymphocytes
Negative feedback (up-regulation of the immune checkpoints)	CTLA4 PD1 LAG3 TIM3 VISTA	Inhibition of T cell function
Up-regulation of immune checkpoint ligands	PD-L1 PD-L2	Inhibition of T cell function
Up-regulation of immune suppressive populations	MDSCs Tregs	Inhibition of T cell function Direct pro-tumorigenic effect (VEGF, TGF-beta)
Release of pro-apoptotic molecules by melanoma cells	FasL TRAIL	T cells death by apoptosis
Release of pro-tumorigenic and pro-angiogenic factors by TME	TGF-beta VEGF iNOS IDO IL-10 IL-6	Inhibition of T cell function Tumour angiogenesis and stroma remodeling

Tableau 5 – Les principaux mécanismes d'échappement au système immunitaire dans le mélanome. Plusieurs effecteurs et voies de signalisation sont impliqués dans l'échappement des cellules de mélanome au système immunitaire, en inhibant la fonction des cellules T ou en sécrétant des molécules par exemple (d'après Passarelli A et al., 2017).

Partie 2 – Implication du métabolisme dans l’efficacité et la résistance aux thérapies anticancéreuses : cas de la leucémie myéloïde chronique (LMC)

1. L’hématopoïèse

1.1. L’hématopoïèse normale

Chez les sujets sains, l’hématopoïèse est réalisée grâce aux cellules souches hématopoïétiques (CSH) dites de long terme (LT-CSH) et court terme (ST-CSH) qui après division et maturation des progéniteurs multipotents (MPP), permettent de donner les différentes lignées cellulaires du sang (**figure 23**).

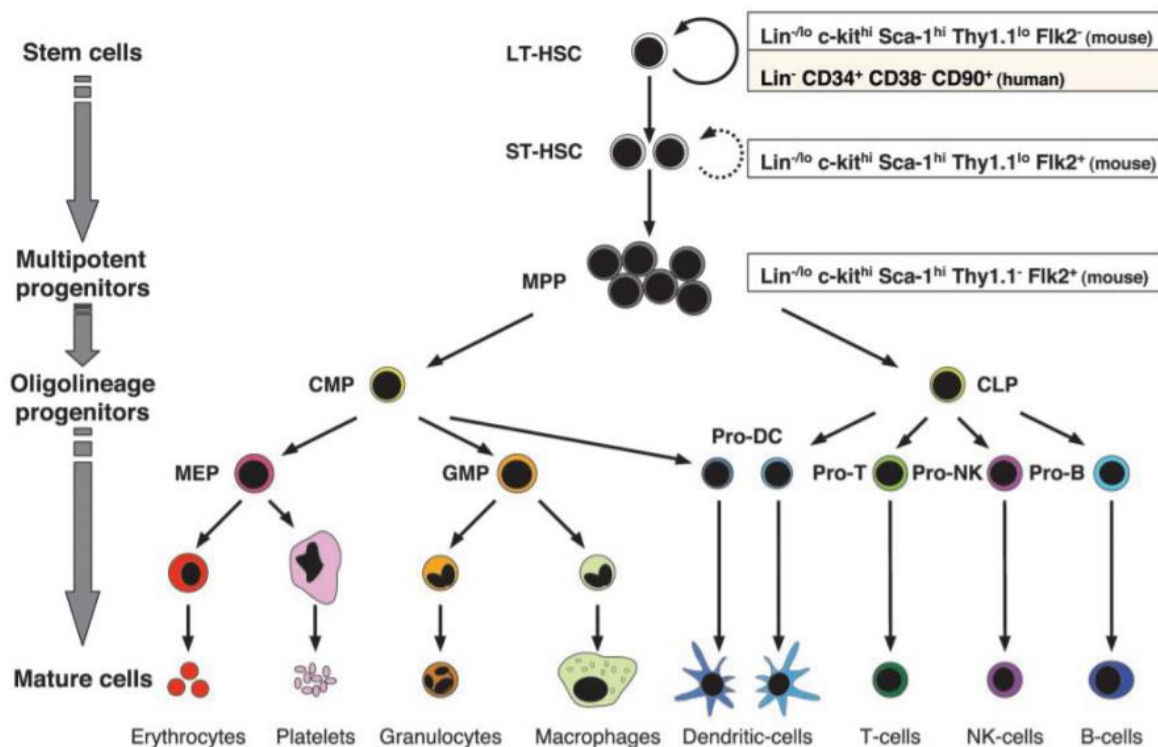


Figure 23 – L’hématopoïèse. Les cellules souches hématopoïétiques sont constituées par les CSH long-terme (LT-HSC) et les CSH court-terme (ST-HSC), qui donneront après maturation des progéniteurs multipotents (MPP). Ces différents types de cellules hématopoïétiques peuvent être caractérisés à l’aide de marqueurs de surfaces spécifiques (voir encadrés). Ces MPP donneront d’une part des progéniteurs de lignée myéloïde (CMP) qui donneront des progéniteurs érythroïdes/mégakaryocytaire (MEP) et des progéniteurs myélomonocytiques (GMP), et d’autre part des progéniteurs de lignée lymphoïde (CLP), qui à leur tour engendreront des cellules pro-dendritique (Pro-DC), des pro-lymphocytes T (Pro-T), des pro-natural killer (Pro-NK) et des pro-lymphocytes B (Pro-B). Ces différents progéniteurs se différencieront par la suite en cellules matures qui composeront le système sanguin et le système immunitaire (d’après Passegue A et al., 2003).

1.2. Les cellules souches hématopoïétiques

Chez des sujets sains, la moelle osseuse permet de produire de manière contrôlée des CSH. Ces cellules immatures et indifférenciées sont capables de donner naissance à tous les progéniteurs des différentes

lignées de cellules sanguines, ainsi que les cellules myéloïdes matures et les lymphocytes, exceptés les cellules B-1a et les macrophages des tissus (Sawai CM et al., 2016). Il existe une hétérogénéité au sein des CSH, notamment au niveau de leur capacité d'auto-renouvellement. L'identification de combinaisons de marqueurs de surface a permis de définir des cellules multipotentes avec des capacités d'auto-renouvellement longue, intermédiaire et courte, et ont été catégorisées comme étant des CSH à long-terme, des CSH à court-terme et des progéniteurs multipotents respectivement (Haas S et al., 2018).

Les CSH doivent à la fois maintenir un pool de cellules souches et produire les nouvelles lignées de cellules sanguines tout au long de la vie de l'individu. Plusieurs modèles, impliquant des signaux intrinsèques et extrinsèques, ont été proposés (pour revue : Schroeder T et al., 2007).

Au niveau de la moelle osseuse, où sont hébergées et produites les CSH, l'hypoxie « physiologique » permet de favoriser la maintenance des CSH (Cipolleschi MG et al. Blood 1993), qui néanmoins conservent leur capacité d'expansion clonale sans blocage de leur cycle cellulaire (Ivanovic Z et al., 2002), permettant ainsi de maintenir le système sanguin grâce à leur capacité d'auto-renouvellement et de production de progéniteurs multipotents. Lors d'une diminution de la pression en O₂, la consommation d'O₂ et la production d'ATP par les mitochondries sont fortement réduites. Des auteurs ont montré que la modulation du métabolisme énergétique mitochondrial pouvait impacter le potentiel de renouvellement des CSH. Dans des conditions de culture induisant normalement une différenciation rapide, la diminution de l'activité mitochondriale des CSH induit préférentiellement un auto-renouvellement des cellules souches due à une diminution de la masse mitochondriale par autophagie (Vannini N et al., 2016). Le métabolisme joue donc un rôle de régulateur majeur dans la décision de la destinée de la cellule, mais des éléments tels que le contrôle de la population et de la qualité des mitochondries permet de maintenir un équilibre au sein des populations de CSH. Il existe un contrôle au niveau mitochondrial au travers d'un processus de mitophagie médié par la voie Pink1/Parkin afin d'éliminer les mitochondries défectueuses. Dans des mitochondries normales, Pink1 est dégradée de manière constitutive. Lorsque les mitochondries sont dépolarisées, Pink1 est stabilisée au niveau de la MME et recrute Parkin au niveau cytosolique. Parkin activée induit l'ubiquitination de substrats protéiques reconnus par des récepteurs spécifiques de mitophagie. Les mitochondries abîmées seront alors emmenées par un phagophore au niveau du lysosome pour être éliminées. Le contrôle peut également se faire au niveau cellulaire, où l'accumulation de mitochondries endommagées au niveau des CSH peut induire un contrôle qualité des mitochondries. Lorsque la cellule arrive à éliminer les mitochondries endommagées par mitophagie, elle peut s'auto-renouveler. Si elle échoue à les éliminer, cela induit un épuisement de la CSH et une perte du caractère souche (**figure 24**) (Ito K et al., 2019).

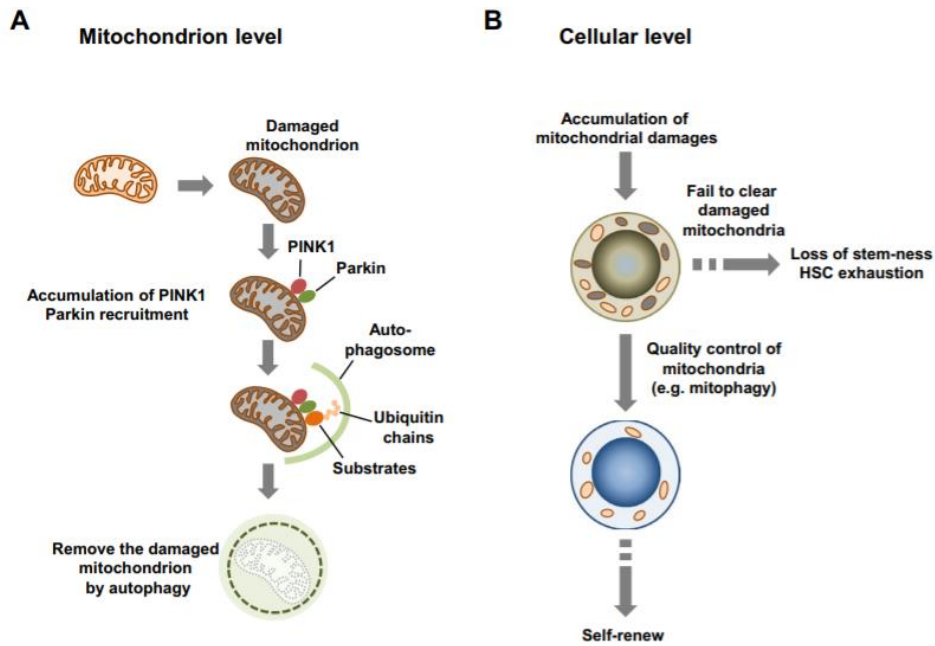


Figure 24 – Le contrôle qualité des mitochondries permet un auto-renouveau des CSH. Le contrôle qualité des mitochondries implique d'une part (A) un contrôle au niveau mitochondrial passant par Pink1/Parkin et la formation d'autophagosome, et d'autre part (B) un contrôle cellulaire, qui lors de l'accumulation de dommages mitochondriaux, induit l'activation de la mitophagie. L'échec du contrôle qualité peut alors conduire à l'accumulation de dommages et à l'épuisement de la « souche » des CSH (Ito K et al., 2019).

Ainsi, un mauvais contrôle de la qualité des CSH ou une mauvaise élimination des CSH ou des progéniteurs défectueux peuvent conduire à l'accumulation de dommages au sein des cellules et induire le développement de pathologie, tel que le cancer. Il existe plusieurs types de cancers issus d'un développement anormal des cellules du sang ou de la moelle osseuse, parmi lesquels on distingue le myélome, les lymphomes et les leucémies.

2. La leucémie myéloïde chronique

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif affectant les cellules souches et induisant une augmentation des globules blancs au niveau du sang. Cette pathologie est dite « chronique », car son évolution est plus lente que les formes aiguës de la leucémie myéloïde. L'évolution de la LMC se fait en 3 phases cliniques distinctes : la phase chronique, la phase accélérée et la phase de crise blastique. La majorité des patients sont asymptomatiques et diagnostiqués en phase chronique, qui peut durer plusieurs années et est caractérisée par l'accumulation de précurseurs leucémiques myéloïdes et de cellules matures au niveau de la moelle osseuse, du sang périphérique et des organes médullaires telle que la rate. La phase accélérée dure de 6 à 9 mois, et le patient présente une augmentation exponentielle de la fréquence des progéniteurs et précurseurs leucémiques par rapport aux cellules différenciées. La phase de crise blastique dure quelques semaines

à quelques mois, et est caractérisée par une expansion rapide de cellules blastiques myéloïdes et immatures (**figure 25**) (Clarke CJ et Holyoake TL, 2017).

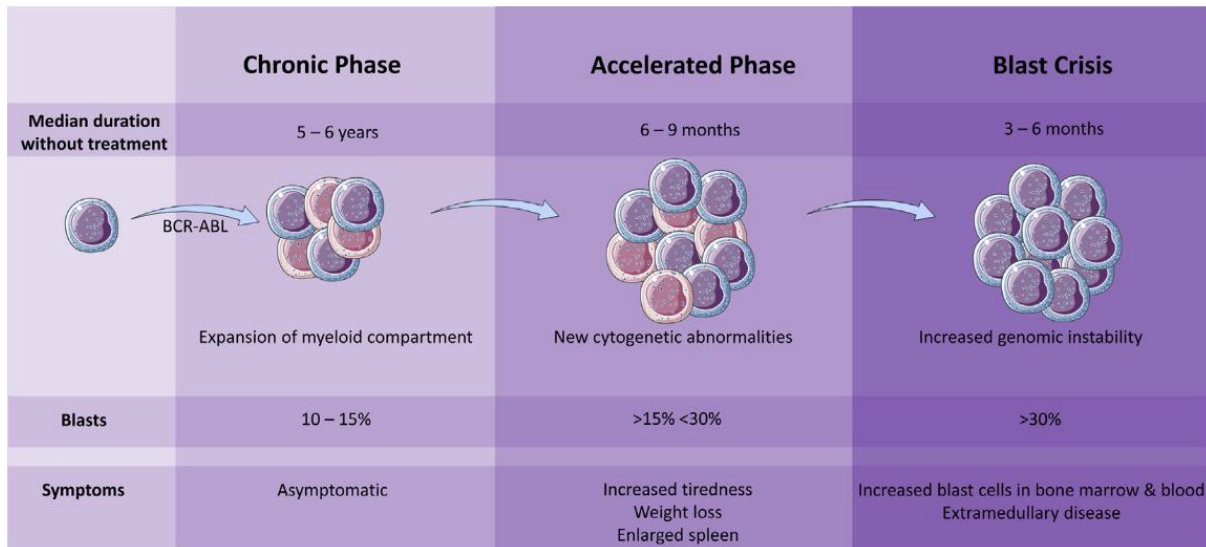


Figure 25 – Progression pathologique de la leucémie myéloïde chronique. La majorité des patients atteints de LMC sont diagnostiqués en phase chronique. Sans traitements, la maladie peut rapidement évoluer en phase accélérée, puis en phase de crise blastique où le patient présente alors un envahissement de blastes au niveau de la moelle osseuse (d’après Clarke CJ et Holyoake TL, 2017).

2.1. Épidémiologie et caractéristiques cliniques

La LMC est une pathologie associée au vieillissement. Elle constitue 15 à 20% de tous les cas de leucémie, avec une prévalence de 1 à 9 pour 100 000 habitants. Une étude de prévalence de la LMC en France a montré que cette maladie était en constante augmentation, avec 17 cas pour 100 000 habitants en 2016, et une estimation de 30 cas pour 100 000 habitants en 2040 (Delord M, 2016).

Environ 50% des patients diagnostiqués sont asymptomatiques et diagnostiqués lors d’examens de routine ou de bilans sanguins, et 90-95% des patients sont en phase chronique de la LMC au moment du diagnostic. Les symptômes cliniques résultent souvent d’une anémie et d’une splénomégalie. Les patients peuvent alors ressentir une douleur osseuse, une perte d’appétit et de poids, une fatigue, une douleur au niveau du flanc gauche sous les côtes. Le diagnostic clinique consiste à évaluer une hyperleucocytose par analyse sanguine, la présence du chromosome de Philadelphie par des techniques de cytogénétique et/ou de génétique moléculaire, par technique de FISH (fluorescence *in situ* hybridization) ou par des études moléculaires (Jabbour E et Kantarjian H, 2017).

2.2. Origine des cellules leucémiques

La leucémie myéloïde chronique est un cancer des cellules souches du sang. Dans les années 1970, le concept de cellules souches leucémiques (CSL) est apparu. Plusieurs études avaient montré qu'une faible fraction de cellules leucémiques étaient capables de proliférer de manière intensive dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Des auteurs ont montré que cette fraction, de 1/10 000 à 1/100 cellules, était capable de reformer des colonies *in vitro* dans des expériences de culture d'initiation cellulaire sur le long terme (Holyoake TL et Vetrie D, 2017).

Deux modèles permettraient d'expliquer l'origine des CSL et l'initiation de la leucémie. Dans le premier modèle, la leucémie peut être initiée par une hématopoïèse anormale où quelques CSH auraient acquis des altérations génétiques et épigénétiques et présenteraient un processus d'auto-renouveaulement peu régulé et aberrant. Dans le second modèle, la CSL serait une CSH qui aurait accumulé des mutations ou des progéniteurs, voire des cellules différenciées matures, qui auraient réacquis la capacité d'auto-renouveaulement des cellules souches avant de devenir tumorigéniques et d'accumuler des mutations additionnelles (**figure 26**) (Passegue E et al., 2003).

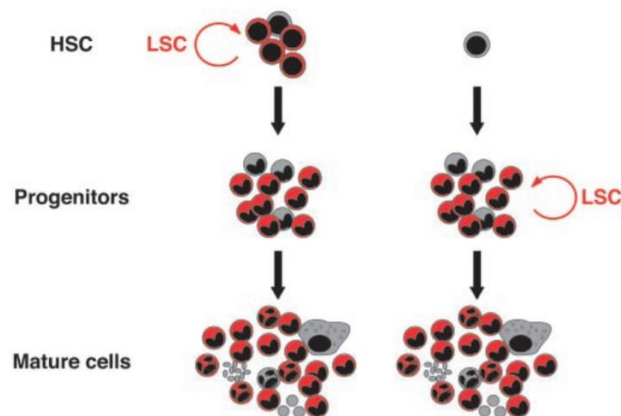


Figure 26 – L'origine des cellules souches leucémiques (d'après Passegue E et al., 2003).

2.2.1. A l'origine de la LMC : le chromosome de Philadelphie et la protéine de fusion BCR-Abl

La translocation entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 ($t(9 ; 22)(q34.1 ; q11.2)$) conduit à la formation d'un chromosome surnuméraire : le chromosome de Philadelphie, découvert en 1960 et appelé d'après la ville où il fut découvert. Ce chromosome est présent au niveau des cellules sanguines de 90% des patients atteints de LMC. Cette translocation a pour conséquence le rapprochement de deux gènes : le Breakpoint Cluster Region (BCR) au niveau du chromosome 22 et la kinase Abelson (Abl) au niveau du chromosome 9, qui permet alors la production d'une protéine chimérique BCR-Abl.

Il existe 3 variants de BCR-Abl pouvant être générés : la forme p210^{BCR-Abl} (également appelée M-BCR) est présente chez la majorité des patients atteints de LMC, alors que les formes p190 et p230 ne sont que peu détectées dans les LMC (Melo JV et al., 1996).

Chez les sujets sains, il a été montré par immunofluorescence que la localisation du produit du gène BCR est cytoplasmique, mais peut aussi se lier à l'ADN condensé. La kinase Abl quant à elle se situe également au niveau cytosolique dans les cellules hématopoïétiques normales et leucémiques. La fusion des gènes BCR et Abl donne une protéine tyrosine kinase chimérique BCR-Abl cytoplasmique constitutivement active, qui peut alors interagir avec les cibles en aval de la kinase Abl (Wetzler M et al., 1993).

Bien que 90% des patients atteints de LMC présentent la protéine BCR-Abl, cet oncogène peut également être retrouvé dans d'autres leucémies tels que la leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) et la leucémie aigüe myéloïde (LAM) pour les formes p210 et p190, ou la LMC neutrophilic pour la forme p230 (Laurent E et al., 2001).

2.3. Les voies de signalisation activées par BCR-Abl

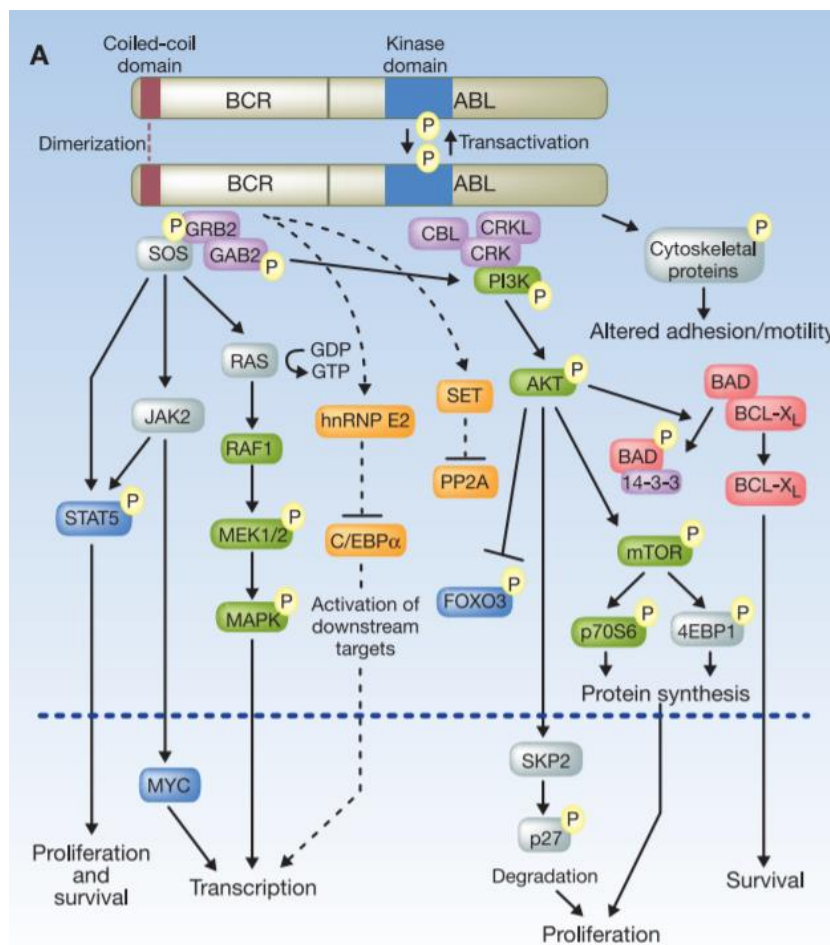


Figure 27 – Implication des voies de signalisation activées par BCR-Abl dans le processus de leucémogénèse. La fusion de BCR avec Abl induit des évènements d'autophosphorylation activant la kinase et générant ainsi des sites de fixation pour des protéines adaptatrices tel que GRB2. Les différentes voies de signalisation activées par BCR-Abl permet de favoriser la prolifération, la survie, l'inhibition de l'apoptose et la perturbation de la motilité et de l'adhésion cellulaire (d'après O'Hare T et al., 2011).

Le domaine d'oligomérisation coiled-coil en N-terminal de BCR-Abl facilite la dimérisation et la trans-autophosphorylation, ce qui permet de recruter la protéine adaptatrice GRB2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2), sa protéine associée GAB2 (GRB2 Associated Binding Protein 2) et le facteur d'échange SOS (Son Of Sevenless) (O'Hare T et al., 2011). Les recrutements de ces protéines permettent d'activer différentes voies de signalisation (**figure 27**), telles que :

- **La voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)** qui participe à la prolifération.
- **La voie PI3K (Phospho-Inositol 3 Kinase) / Akt (ou protéine kinase B)** impliquée dans la survie en inhibant l'activité du facteur de transcription FOXO (Forkhead O) ; la prolifération en activant la dégradation protéosomale de la protéine p27 ; la traduction protéique et la prolifération en activant la protéine mTOR.
- **La voie STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)** est importante dans la pathogénèse de la LMC. *In vivo*, l'inhibition de cette voie permet de prolonger la survie des souris puisque des souris greffées avec des cellules de moelle osseuse déficientes en STAT5A sont incapables de générer et de maintenir une pathologie relative à la LMC (Ye D et al., 2006).

3. Les traitements de la leucémie myéloïde chronique

3.1. Historique des traitements de la LMC

Au 19^{ème} siècle, la LMC était traitée de façon rudimentaire par de l'arsenic malgré la toxicité de cette molécule. Par la suite, au début du 20^{ème} siècle, la radiothérapie puis les chimiothérapies, tels que le busulfan et l'hydroxyurée (Hydrea®) sont apparus et sont alors devenus les principaux traitements pour traiter la LMC. Dans un premier temps au début des années 1980, l'interferon- α (IFN- α) s'est révélé efficace par rapport aux traitements précédents, puisqu'il permettait d'augmenter la survie des patients avec une médiane de 20 mois, bien que les patients finissaient par rechuter après un certain temps. Il s'est ensuite avéré que la transplantation allogénique de cellules souches de moelle osseuse représentait la meilleure alternative pour les patients pouvant être transplantés, puisqu'au moins la moitié des patients étaient vivants 5 à 10 ans après transplantation. Par ailleurs, les patients ayant été transplantés moins de 2 ans après le diagnostic présentaient une meilleure survie (Silver RT et al.,

1999). Au début des années 2000, l'apparition de l'Imatinib, un TKI ciblant BCR-Abl a permis de changer drastiquement le devenir des patients atteints de LMC, en changeant une maladie autrefois mortelle en une maladie chronique. Cependant, sans traitements appropriés, la LMC peut rapidement évoluer en phase de crise blastique et être fatale.

Afin d'évaluer l'efficacité des traitements, plusieurs paramètres sont pris en compte : la réponse hématologique complète (RHC) traduisant une normalisation du nombre de cellules sanguines, la réponse cytogénétique majeure (RCM) représentant une diminution du pourcentage de cellules Ph⁺ dans la moelle osseuse, la réponse cytogénétique complète (RCC) reflétant une absence de détection de cellules Ph⁺ et la réponse moléculaire majeure (RMM) correspondant à une diminution du transcrit BCR-Abl de 3 log par rapport aux niveaux de base standardisés (Mahon FX et Etienne G, 2014).

3.2. L'Imatinib : la première thérapie ciblée et TKI

L'Imatinib mesylate, ou Glivec/Gleevec (Novartis) ou STI571, fut la première thérapie ciblée à avoir été découverte, et ayant reçu une autorisation de mise sur le marché européen en 2001. Ce médicament est préconisé dans plusieurs pathologies, dont la LMC ou encore la tumeur stromale gastro-intestinale. Dans le cas de la LMC, l'Imatinib se fixe au niveau de la poche ATP de la kinase Abl et inhibe son activité kinase, ainsi que les voies de signalisation en aval (**figure 28**) (Mauro MJ, 2001).

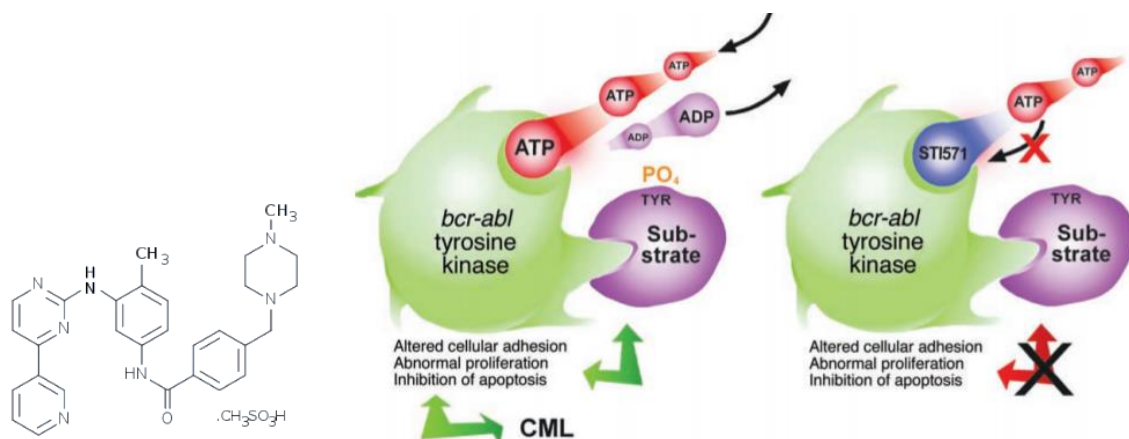


Figure 28 – Structure chimique de l'Imatinib mesylate et mécanisme d'action. La fusion de BCR avec Abl permet de rendre l'activité kinase d'Abl constitutive, qui fonctionne en liant les molécules d'ATP et transfère les phosphates aux différents substrats, activant ainsi différentes voies de signalisation qui vont permettre d'augmenter excessivement la prolifération des cellules et d'inhiber l'apoptose. En se fixant au niveau de la poche ATP d'Abl, l'Imatinib va inhiber l'activité kinase et inhiber les voies de signalisation en aval (d'après Mauro MJ, 2001).

Plusieurs essais cliniques ont permis d'établir l'efficacité de l'Imatinib dans le cas de la LMC. En 2000, un essai clinique de phase II visait à estimer l'innocuité et l'efficacité de l'Imatinib chez des patients LMC en phase chronique réfractaires ou intolérants à l'IFN- α (ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT00006053). Dans l'essai clinique IRIS (International Randomized Study of Interferon and STI571)

débutée en 2000, l'objectif de cette étude randomisée en phase III était de déterminer l'efficacité de l'Imatinib chez des patients au diagnostic en comparaison au traitement IFN- α + Cytarabine (ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT00006343). Après 18 mois de traitements, le groupe traité à l'Imatinib présentait de meilleures réponses cytogénétique et hématologique (**voir tableau 6**), ainsi qu'une meilleure rémission sans progression en phase accélérée ou en phase de crise blastique. Par ailleurs, l'Imatinib fut mieux tolérée par les patients traités, puisque le traitement IFN- α + Cytarabine nécessitait une injection sous-cutanée des deux médicaments et les effets secondaires, tels que les nausées, la fatigue, l'anorexie, étaient fréquents et gênants (O'Brien SG, 2003). Les résultats de cette étude, après un suivi médian de 11 ans, ont montré que les patients ayant reçu l'Imatinib présentaient une survie globale de 83.3% et une réponse cytogénétique complète de 82.8%. Ces résultats montrent ainsi l'efficacité de l'Imatinib sur un traitement à long terme (Hochhaus A et al., 2017). Un autre essai clinique a été mené au Japon sur 3 ans afin de déterminer l'efficacité et l'innocuité du traitement parmi la population japonaise. Les résultats obtenus furent similaires à ceux obtenus par l'étude IRIS, et montrent une meilleure réponse cytogénétique, une meilleure survie globale et une meilleure survie sans progression de la leucémie (Nagai T et al., 2010).

Response	Initial Treatment		Crossover Treatment	
	Imatinib (N=553)	Interferon Alfa plus Cytarabine (N=553)	From Imatinib to Interferon Alfa plus Cytarabine (N=11)	From Interferon Alfa plus Cytarabine to Imatinib (N=318)
	percent (95% CI)			
Complete hematologic	95.3 (93.2–96.9)	55.5 (51.3–59.7)†	27.3 (6.0–61.0)	82.4 (77.7–86.4)
Major cytogenetic	85.2 (81.9–88.0)	22.1 (18.7–25.8)†	0 (0–28.5)	55.7 (50.0–61.2)
Complete cytogenetic	73.8 (69.9–77.4)	8.5 (6.3–11.1)†	0 (0–28.5)	39.6 (34.2–45.2)
Partial cytogenetic	11.4 (8.9–14.3)	13.6 (10.8–16.7)	0 (0–28.5)	16.0 (12.2–20.5)

Tableau 6 – Tableau récapitulatif des meilleurs taux de réponses cytogénétique et hématologique observés. La réponse cytogénétique représente le pourcentage de cellules en métaphase Phi-positives, avec 0% = réponse complète, 1-35% = réponse partielle. Une réponse cytogénétique majeure représente une réponse partielle ou complète (d'après O'Brien SG, 2003).

Contrairement aux thérapies anticancéreuses conventionnelles qui ciblent les cellules se divisant rapidement, l'Imatinib est capable d'inhiber spécifiquement l'oncogène BCR-Abl, bien que d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase tels que PDGF-R (Platelet-Derived Growth Factor-Receptor) et c-Kit peuvent également être ciblés (Iqbal N et Iqbal N, 2014). La spécificité des thérapies ciblées permet ainsi de diminuer les effets secondaires tels que ceux observés lors des chimiothérapies ou des radiothérapies.

3.3. L'arrêt de traitements des TKI chez les patients : *to be or not to be* ?

L'une des questions majeures dans le cas des traitements aux thérapies ciblées est la durée optimale de ces traitements. En effet, du fait des effets secondaires et de la possibilité d'apparition de résistances secondaires à un traitement prolongé par thérapies ciblées, il est important d'évaluer si l'arrêt des thérapies ciblées peut être envisagée et sous quelles conditions.

Plusieurs études ont cherché à déterminer la possibilité d'une discontinuation du traitement à l'Imatinib. Dans l'essai clinique STIM1 (Stop Imatinib 1) débutée en 2007, l'objectif était de déterminer si les patients LMC traités par l'Imatinib pendant 2 années, et présentant une réponse moléculaire complète (RMC) durant cette période, pouvaient arrêter le traitement sur le long terme sans récurrence moléculaire. Sur un suivi médian de 17 mois, 69% des patients avaient au moins un suivi de 12 mois avec une médiane à 24 mois. Parmi ces patients, l'étude a montré que, suite à l'arrêt du traitement à l'Imatinib, 61% des patients présentaient une récurrence moléculaire (RM) et une perte de la maladie minimale résiduelle indétectable (MMRI), *i.e* un transcrite de BCR-Abl détectable par q-PCR, et 41% des patients présentaient une RMC persistante à 12 mois. Tous les patients ayant rechuté ont été retraités à l'Imatinib, 38% ont présenté une diminution de leur taux de transcrite BCR-Abl et 62% une RMC (Mahon FX et al., 2010). Un suivi médian de 77 mois de cette étude montre que 43% des patients présentaient une rémission sans RM après 24 mois et 38% après 60 mois, confirmant ainsi la possibilité d'une discontinuation de l'Imatinib chez les patients présentant une RMC sans RM (Etienne G et al., 2017). L'étude clinique DADI (Dasatinib Discontinuation) incluait des patients LMC traités par l'Imatinib ou le Nilotinib en première ligne, et par le Dasatinib en seconde ligne, et présentant une RMC supérieure à un an. Après 3 années d'arrêt du Dasatinib, les résultats montrent d'une part un taux de rémission sans traitement de 49% à 6 mois, et d'autre part de 48% à 12 mois. Par ailleurs, il existe une meilleure probabilité de rémission sans rechute chez les patients ne présentant pas de résistance à l'Imatinib, présentant un haut taux de cellules natural killer (NK) et de faibles taux de cellules T régulatrices CD4+ et de cellules T $\gamma\delta$ + avant l'arrêt du traitement (Okada M et al., 2018).

L'essai clinique EDI-PIO (Discontinuation in Chronic Myeloid Leukemia With Deep Molecular Response)(ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT02852486) débutée en 2016 est actuellement en cours jusque 2022. Chez des patients LMC ayant été traités plus de 3 ans à l'Imatinib et présentant une réponse moléculaire profonde stable durant 2 années, l'étude devrait permettre d'évaluer si une rémission sans traitement est possible après discontinuation de l'Imatinib. Avant d'arrêter les traitements, les patients répondant à ces critères seront traités 3 mois par de l'Imatinib et du pioglitazone (Metformin), un antidiabétique aussi connu pour inhiber le complexe I de la CRM (Fontaine E, 2018). Le transcrite de BCR-Abl sera évalué à intervalle régulier par qPCR.

En conclusion, les résultats montrent que la discontinuation de l'Imatinib pourrait être envisagée pour la majorité des patients atteints de LMC présentant des taux de transcrits de BCR-Abl indétectables. Par ailleurs, les patients ayant perdu la RM et retraités par TKI présentent à nouveau une RMM et sans mortalité après 2 années (Campiotti L et al., 2017).

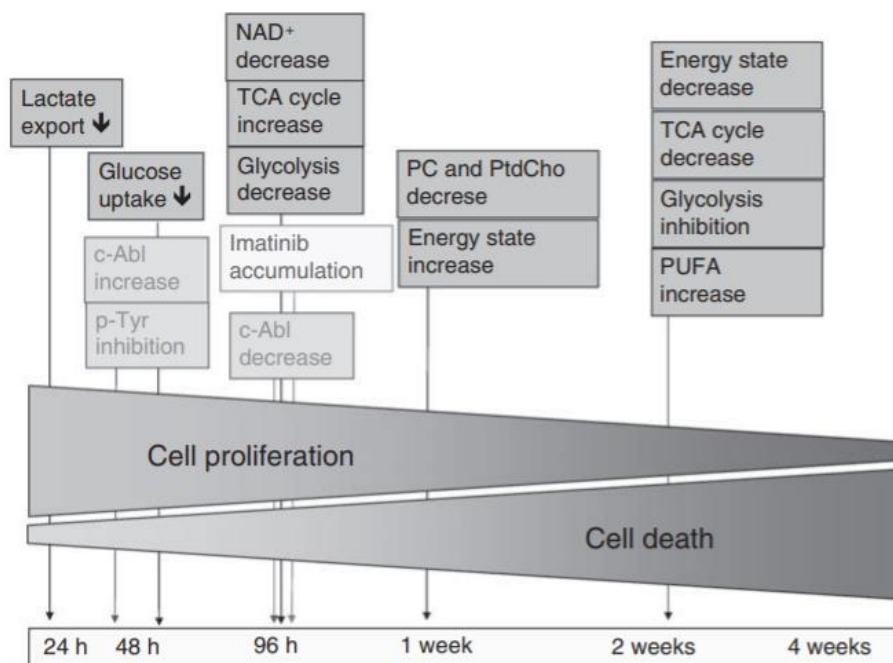
4. Thérapies anticancéreuses et métabolisme des LMC

4.1. Les thérapies anti-cancéreuses conventionnelles

Il existe différents agents anticancéreux capables d'induire l'apoptose en inhibant l'OXPPOS mitochondrial. Parmi ces molécules, nous pouvons distinguer les agents endommageant l'ADN tels que l'Etoposide et la Doxorubicine, les agents induisant un stress réticulaire telle que la Thapsigargine et les inhibiteurs des histones déacétylases telle que l'Apicidine. La Doxorubicine est capable de se fixer au niveau de la mitochondrie de manière dépendante au complexe I. Ainsi, les agents endommageant l'ADN peuvent induire une accumulation de ROS cellulaires et mitochondriaux par augmentation de l'ADNmt et de la biogenèse mitochondriale. En conséquence, l'accumulation de défauts de l'OXPPOS peut alors conduire au relargage mitochondrial du facteur induisant l'apoptose. Les auteurs supposent que les cellules présentant une altération majeure de l'OXPPOS induisent une apoptose caspase – dépendante et –indépendante en réponse aux agents anticancéreux (Yadav N et al., 2015).

4.2. Les thérapies ciblées de BCR-Abl

Il est aujourd'hui connu qu'en se fixant au niveau de la poche d'Abl et en inhibant l'activation des voies de signalisation en aval, l'Imatinib induit un puissant effet anti-glycolytique en diminuant la captation du glucose, mais induit une augmentation de la production d'énergie au travers du métabolisme mitochondrial (Gottschalk S et al., 2004). Les auteurs montrent alors que l'Imatinib permet d'inverser l'effet Warburg, en induisant un switch de l'utilisation du glucose par la glycolyse vers le métabolisme mitochondrial. De manière intéressante, l'équipe de Serkova a montré que l'Imatinib induisait des effets anti-métaboliques de manière dépendante au temps. Sous traitement à l'Imatinib, les cellules leucémiques K562 présentent initialement une diminution de la prolifération cellulaire, due à la diminution de la captation et de la métabolisation du glucose au travers de la glycolyse. Les cellules leucémiques survivent en augmentant l'activité du cycle de Krebs. Après une semaine de traitement, il s'en suit alors une augmentation progressive de la mort cellulaire, en conséquence d'une diminution de l'activité glycolytique, de l'activité du cycle de Krebs et de la production d'énergie (**figure 29**) (Klawitter J et al., 2009).



	24 h	48 h	72 h	96 h	2 weeks	4 weeks
Imatinib dose	0.1 μM	0.1 μM	0.1 μM	0.1 μM	0.2 μM	0.4 μM
Imatinib intracell	0.015 \pm 0.003	0.015 \pm 0.001	0.019 \pm 0.005	0.018 \pm 0.002*	0.035 \pm 0.005**	0.065 \pm 0.009***

The values were calculated as μM imatinib per 10^7 cells and represent means \pm s.d. of four independent experiments. Statistical significance: * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$ when values were compared with the 24-h value(s). Comparison by ANOVA indicated statistically significant differences with $P < 0.001$.

Figure 29 – Cinétique des effets métaboliques induits par un traitement à l’Imatinib sur la lignée cellulaire BCR-Abl⁺ K562. Les cellules K562 ont été traitées à différents temps à l’Imatinib et la concentration intracellulaire a été dosée par HPLC-MS/MS (bas) et les effets métaboliques ont été déterminés à différents temps de traitement (haut) (d’après Klawitter J et al., 2009).

Plus récemment, des auteurs ont cherché à savoir quelles modifications des sous-unités des complexes mitochondriaux conduisaient à une altération du métabolisme du glucose. D’une part, ils montrent qu’une inhibition de BCR-Abl induit une diminution de l’expression de la voie PI3K/Akt, de STAT3, de c-Myc, de la cycline D1, du clivage de PARP et de la caspase 3. D’autre part, les cellules de LMC présentent une diminution de l’activité glycolytique se traduisant par une diminution de l’expression de l’hexokinase II, de l’isoforme PKM2 et de la LDH-A, et en parallèle, ces cellules montrent une surexpression de complexes mitochondriaux. Les auteurs montrent que l’Imatinib permet de réactiver l’OXPHOS mitochondrial (De Rosa V et al., 2019).

4.3. Les mécanismes de résistance aux TKI

Il existe différents types de mécanismes de résistance aux thérapies ciblées. Dans le cas des LMC, les résistances dépendantes de BCR-Abl peuvent être induites par la présence d’une ou plusieurs mutations au niveau du domaine kinase de BCR-Abl, ce qui restaure l’activité kinase en empêchant la

fixation des TKI. Il existe également des résistances indépendantes de BCR-Abl, dont (1) la résistance extrinsèque, induite par les facteurs de croissance dérivés des cellules du microenvironnement tumoral qui protègent les cellules leucémiques des TKI, et (2) la résistance intrinsèque, où les cellules activent des voies de signalisation alternatives indépendamment des facteurs de croissance. Les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées dans la LMC sont nombreux (pour revue Milojkovic D et Apperley J, 2009).

4.3.1. Les mécanismes de résistance dépendantes de BCR-Abl

4.3.1.1. Les mutations ponctuelles du domaine kinase

Dans le cas des LMC, de nombreuses mutations du gène de BCR-Abl induisant des résistances à l'Imatinib ont été décrites (figure 30).

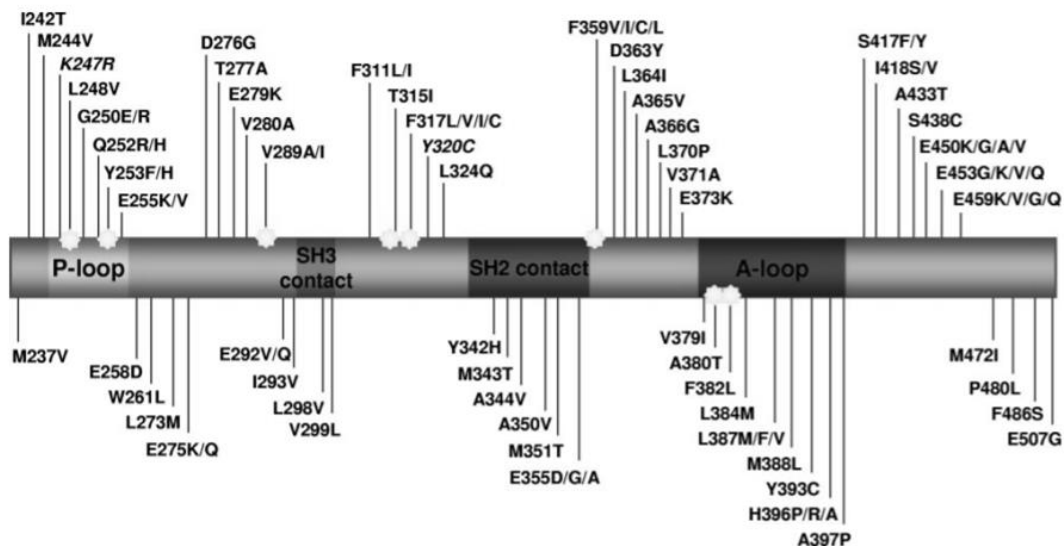


Figure 30 – Ensemble des mutations par substitution d’acides aminés du domaine kinase de BCR-Abl identifiés chez des patients résistants à l’Imatinib. P-loop pour boucle de liaison des phosphates, SH2 et SH3 contact pour régions contenant des protéines avec des domaines SH2 et SH3, A-loop pour boucle d’activation. Les étoiles représentent les mutations directement impliquées dans la liaison de l’Imatinib par des liaisons hydrogène ou des interactions Van der Waals (d’après Soverini S et al., 2011).

Des auteurs ont transfecté des cellules hématopoïétiques avec une grande quantité de vecteurs co-exprimant BCR-Abl et GFP (BA^{hi}). Bien que ces cellules présentent une expression protéique élevée de BCR-Abl, elles restent néanmoins sensibles à l’inhibition de BCR-Abl induit par l’Imatinib, montrant ainsi la dépendance à BCR-Abl pour la croissance et la survie. Cependant, la transfection de cellules CD34⁺ avec des formes mutantes de BCR-Abl conduit à une résistance à l’inhibition de la prolifération et de la survie induite par l’Imatinib (Modi H et al., 2007).

Afin de pallier la résistance des cellules cancéreuses aux thérapies ciblées de première génération, des thérapies de seconde et troisième génération ont vu le jour et permettent aux molécules de se fixer en dépit des mutations ponctuelles du domaine kinase (**figure 31**).

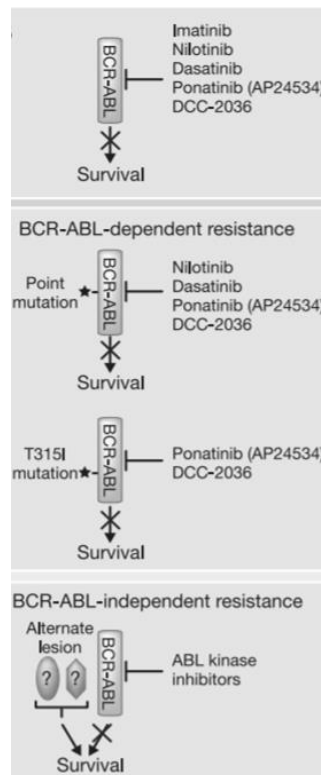


Figure 31 – Les thérapies ciblées de seconde et troisième génération pour contrer les mécanismes de résistance aux TKI dans les LMC. De nombreuses thérapies ciblées ont vu le jour afin de pallier aux mutations ponctuelles au niveau du domaine kinase conduisant à des résistances dépendant de BCR-Abl (d’après O’Hare T et al., 2011).

4.3.1.2. L’amplification des oncogènes

Dans le cas des leucémies BCR-Abl⁺, Gorre et collègues ont montré que chez certains patients, la résistance à l’Imatinib était associée à l’amplification du gène de BCR-Abl (Gorre ME et al., 2001). Des auteurs ont montré que l’amplification d’oncogènes était également impliquée dans la résistance au Nilotinib. En effet, il a été montré que des lignées cellulaires de LMC résistantes au Nilotinib présentaient une surexpression de BCR-Abl, de la tyrosine kinase p53/56 Lyn et de la kinase Src. Le traitement au Dasatinib, en ciblant à la fois BCR-Abl et Lyn, s’est avéré efficace pour induire l’apoptose dans ces cellules résistantes (Mahon FX et al., 2008).

4.3.1.3. Dérégulation des voies de signalisation

La voie STAT

Il est connu que dans les LMC, les protéines STAT3 et STAT5 sont impliquées dans la résistance aux TKI de BCR-Abl. Dans un modèle de co-culture de cellules stromales de moelle osseuse avec des cellules de LMC K562, Bewry et collègues ont montré que la résistance à l'Imatinib était corrélée à une augmentation de la phosphorylation de Tyr-STAT3, ce qui induit une augmentation de l'expression de ses gènes cibles Bcl-XL, Mcl-1 et survivin (Bewry NN et al., 2008). Cette résistance aux TKI pourrait être médiée par une sous-régulation de la protéine STATIP1 (STAT3-interacting protein 1), qui régule négativement la voie STAT3. Des auteurs ont montré que l'inhibition de STATIP1 dans des cellules BCR-Abl⁺ leur confère une résistance aux thérapies anticancéreuses. Dans les cellules résistantes, un faible niveau de STATIP1 a pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire et des niveaux des protéines anti-apoptotiques Bcl-XL. Ainsi, l'inhibition de STAT3 en combinaison avec l'Imatinib permet d'induire un effet anti-prolifératif et de sensibiliser les cellules leucémiques à la mort induit par l'Imatinib (Bewry NN et al., 2008) (Mencalha AL et al., 2014). L'inhibition de la voie JAK2/STAT5 par le ruxolitinib en combinaison avec le Nilotinib est efficace pour induire l'apoptose des cellules de LMC CD34⁺ (Gallipoli P et al., 2014). Cette combinaison a par ailleurs fait l'objet d'un essai clinique en phase I (ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT01702064), et les premiers résultats montrent que 40% des patients traités présentaient une absence de détection du transcrit de BCR-Abl après 6 mois (Sweet K et al., 2018). Le ciblage des facteurs STAT3 et STAT5 en combinaison avec des TKI serait une stratégie efficace pour éliminer les cellules de LMC résistantes ou réfractaires à l'Imatinib. En effet, le ciblage de ces deux protéines par le bardoxolone methyl (CDDO-Me) en combinaison avec des TKI de BCR-Abl s'est avéré efficace pour cibler les cellules leucémiques les plus immatures, mais également les cellules résistantes à l'Imatinib présentant la mutation T315I (Gleixner KV et al., 2017).

La voie PI3K/Akt/mTORC1

Dans la LMC, l'activation de BCR-Abl est accompagnée par l'activation du récepteur c-Kit. Le traitement par le Nilotinib permet d'inhiber ce récepteur, mais la liaison du stem-cell factor (SCF) permet de réactiver le récepteur et participe aux voies de signalisation pro-survie. Cependant, des auteurs ont montré que l'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTORC1 permet de sensibiliser les CSL et les cellules progénitrices au Nilotinib et ce, même en présence du SCF (Airiau K et al., 2013). Le métabolisme est également impliqué dans les phénomènes de résistance, puisque l'enzyme PKM2 participe à la résistance des cellules leucémiques à l'Imatinib (Sturgill EM et Guzman ML, 2013).

La voie MAPK

De nombreuses études ont montré que le microenvironnement jouait un rôle majeur dans la protection des cellules cancéreuses contre les agents anticancéreux. Dans la LMC, des auteurs ont montré que lors d'un contact prolongé avec des cellules stromales de la moelle osseuse, les cellules leucémiques présentent un enrichissement en cellules CD34⁺ et N-cadhérine⁺. Par ailleurs, sous traitement à l'Imatinib, ces cellules ne prolifèrent plus et acquièrent une résistance à ce TKI, même après retrait du stroma. Ces cellules sont caractérisées une augmentation de la phosphorylation de Erk1/2, et l'inhibition de la signalisation de Erk1/2 MAPK permet de supprimer l'acquisition de la résistance et de resensibiliser les cellules leucémiques à l'Imatinib (Kumar A et al., 2017).

4.3.2. Les mécanismes de résistance indépendants de BCR-Abl

4.3.2.1. Modifications des systèmes d'import/export des médicaments anticancéreux

La P-glycoprotéine (P-gp), codée par le gène MDR 1 (multi-drug resistance 1) ou ABCB1, fonctionne comme une pompe d'efflux de médicaments, permettant de diminuer la concentration intracellulaire des médicaments tels que les stéroïdes, les antibiotiques ou encore les médicaments anticancéreux. L'expression de la P-gp est donc fréquemment augmentée dans les cellules cancéreuses afin d'expulser hors de la cellule les chimiothérapies tels que la Doxorubicine ou le Taxol, contribuant ainsi à la multi-résistance des cellules à ces traitements. La surexpression de la P-gp pourrait être due à une amplification chromosomale du gène ABCB1 au niveau du chromosome 7 (Genovese I et al., 2017). La surexpression du gène ABCB1 est également retrouvée dans des cellules de LMC résistantes au Nilotinib (Mahon FX et al., 2008). Cette surexpression est un initiateur clé dans la résistance aux TKI dans les LMC et faciliterait le développement de mécanismes additionnels de résistance aux TKI (Eadie LN et al., 2016). Cependant, le développement d'inhibiteurs de la P-gp reste compliqué de par les structures complexes et le poids moléculaire de ces molécules. Dans la LMC, le traitement des cellules à la metformin permet d'induire indirectement une inhibition de la surexpression de P-gp, et son association avec le 2-DG permet de créer un puissant stress métabolique, conduisant ainsi à une déplétion en ATP aggravée par la diminution de l'expression de P-gp, et *in fine* à l'apoptose des cellules leucémiques (Xue C et al., 2016).

4.3.2.2. Les mutations ponctuelles des voies de signalisation

Dans des lignées cellulaires de LMC résistantes aux TKI de 1^{ère} et 2^{ème} génération sans mutation au niveau du domaine kinase de BCR-Abl, des auteurs ont montré que l'Imatinib induit une inhibition des voies JAK2/STAT5 et de Erk1/2, mais pas de la voie PI3K/Akt/mTOR, alors que les lignées sensibles présentent une inhibition de ces 3 voies. Bien que les TKI parviennent à se fixer au niveau de BCR-Abl, ces cellules résistantes présentent une mutation E545G de la kinase PI3K α , permettant l'activation

constitutive de mTORC1 indépendamment de BCR-Abl. Par conséquent, l'inhibition d'Akt, un médiateur de l'apoptose induite par l'Imatinib, permet d'inhiber la voie PI3K/Akt/mTOR et d'induire la mort cellulaire des cellules résistantes à l'Imatinib (Quentmeir H et al., 2011).

4.3.3. Rôle des cellules souches leucémiques dans la résistance aux traitements

Bien qu'efficaces, les traitements aux TKI ne permettent pas de guérir complètement les patients. Dans la LMC, au sein de la moelle osseuse, des cellules souches leucémiques (CSL) et leurs progéniteurs peuvent persister sous traitements aux TKI et, après arrêt des traitements, proliférer à nouveau et être à l'origine de récives chez les patients. Bien que le développement de l'Imatinib représente une réussite thérapeutique majeure dans le cadre des thérapies ciblées pour traiter les cancers, en dépit de son efficacité, une sous-population de CSL, définies comme primitives et quiescentes, restent insensibles aux TKI *in vitro* (Graham SM et al., 2002), et ce malgré l'inhibition de l'activité de BCR-Abl (Cobin AS et al., 2011). Ces cellules persistantes constituent alors un pool de cellules leucémiques capables de s'auto-renouveler et sont responsables de la maladie résiduelle minimale chez les patients, entraînant ainsi des récives après l'arrêt des traitements aux TKI (Thomas D et Majeti R, 2017). L'une des causes d'échec thérapeutique est notamment due à la capacité des CSL à survivre indépendamment de BCR-Abl, leur conférant alors une résistance intrinsèque aux TKI (Hamilton A et al., 2012). Cibler les CSL représentent aujourd'hui un enjeu majeur afin d'éviter les rechutes chez les patients. Cependant, de par leur faible nombre et leur localisation, la détection de ces cellules est souvent rendue difficile chez les patients. Par ailleurs, malgré leur efficacité, environ 30% des patients ne répondront pas de manière optimale aux TKI, et des mécanismes de résistances peuvent alors apparaître (Jabbour E et Kantarjian H, 2018).

Dans un environnement pauvre en O₂ et en glucose, *i.e* similaire à un environnement *in vivo* où persistent les cellules de LMC résistantes aux TKI, une faible tension en O₂ permet de diminuer l'expression transcriptionnelle de BCR-Abl et induit la dégradation de la protéine BCR-Abl (Bono S et al., 2016). Par ailleurs, la diminution de la disponibilité en glucose dans des conditions hypoxiques permet de sélectionner les cellules BCR-Abl-indépendantes possédant un potentiel de cellule souche et réfractaires à l'Imatinib. Lors d'une restriction en O₂, les cellules résistantes à l'hypoxie sont encore capables de maintenir l'expression de la protéine BCR-Abl en présence de glucose. Sous des conditions de restriction en O₂ et en glucose, la protéine BCR-Abl est alors dégradée de manière protéasome ou caspases-dépendante (K562), ou autophagie-dépendante (KCL-22) (Giuntoli S et al., 2006). Corbin et al. ont montré que, bien que l'Imatinib soit capable d'inhiber l'activité de BCR-Abl et d'affecter la croissance des cellules souches, progénitrices, quiescentes et en cycle, la présence de cytokines

permet de soutenir la croissance et la survie de ces cellules en absence d'une activité de BCR-Abl (Corbin AS et al., 2011). Ils émettent alors l'hypothèse que les CSL ne présenteraient pas d'addiction aux oncogènes, et qu'ainsi, le simple ciblage de BCR-Abl ne serait pas suffisant pour les éliminer. Des auteurs ont montré que l'Acriflavine (ACF), un inhibiteur de HIF-1 approuvé par la *Food and Drug Administration* pour des utilisations non oncogéniques, était efficace pour tuer les cellules leucémiques de LMC. Notamment, l'ACF, mais pas les TKI, est capable de cibler le potentiel des CSL de LMC *in vitro* et *ex vivo* issues de cellules primaires de patients atteints de LMC, sans effets délétères sur les cellules hématopoïétiques non-LMC. *In vivo*, l'ACF est également capable de diminuer la leucémogénèse et la maintenance des CSL (Cheloni G et al., 2017). Le ciblage de l'hypoxie est donc une stratégie émergente pour cibler les cellules cancéreuses (Wilson WR et Hy MP, 2011), et l'association de molécules ciblant HIF permettrait de potentialiser l'effets des TKI (Cheloni G et al., 2017).

Les CSL de LMC résident dans des niches spécifiques au niveau du microenvironnement de la moelle osseuse (MMO). Le MMO est un microenvironnement particulier où résident différents types cellulaires, tels que les macrophages, les cellules endothéliales, les ostéoclastes, les ostéoblastes, les adipocytes et les fibroblastes, mais elle est également constituée en grande partie de matrice extracellulaire riche en facteurs de croissance et de cytokines sécrétées de manière autocrine et paracrine. La présence de cellules cancéreuses peut entraîner une modulation du métabolisme de ces cellules afin de les tourner à leur avantage, pour faciliter la tumorigénèse. Il a été montré que le MMO permettrait de protéger les CSL de traitements anticancéreux conventionnels, et serait l'une des causes de rechute chez les patients (Korn C et Mendez-Ferrer S, 2017). Dans les LMC, la présence de l'oncogène BCR-Abl induit une sous-régulation de l'expression du récepteur à chimiokines CXCR4. Ce récepteur est notamment impliqué dans la domiciliation des CS au niveau de la moelle osseuse. De ce fait, la diminution de son expression est associée à un défaut de migration des cellules leucémiques. Lors d'un traitement à l'Imatinib ou à l'IFN- α , les cellules leucémiques réactivent l'expression de CXCR4, ce qui induit leur migration au niveau de la moelle osseuse où elles acquièrent une chimiorésistance médiée par le stroma (Jin L et al., 2008). Il existe donc un intérêt majeur à cibler cette niche, sans en altérer les cellules saines.

Partie 3 – Implication du métabolisme dans l’efficacité et la résistance aux thérapies anticancéreuses : cas du mélanome muté BRAF^{V600E}

1. Le mélanome muté BRAF^{V600E}

Le mélanome malin représente le cancer de la peau le plus agressif chez l’homme, affectant surtout les jeunes adultes. Les mutations sont nombreuses, et touchent notamment des oncogènes tels que N-RAS ou des suppresseurs de tumeur tels que p53, bien que BRAF, une sérine/thréonine kinase, constitue la majorité des mutations dans ce cancer. Il existe plus de 30 mutations somatiques présentes au niveau du gène BRAF ayant été identifiées dans le mélanome, les cancers colorectaux, le cancer du sein ou encore le cancer des poumons (Davies H et al., 2002).

Epidémiologie

Environ 50% des mélanomes cutanés présentent des mutations de la protéine kinase BRAF, conduisant à l’activation constitutive de la kinase et des voies de signalisation en aval, notamment la voie MAPK/Erk, permettant aux cellules de proliférer de manière anarchique et de survivre. La mutation la plus fréquente de BRAF est la substitution d’une glutamine par une valine en position 600 (V600E), ce qui conduit à l’activation constitutive de l’activité kinase, et par conséquent de la signalisation Mek/Erk et de la prolifération cellulaire (Griffin M et al., 2017). L’apparition de cette mutation serait en partie due à l’exposition et au temps d’exposition de la peau aux rayons de soleil. Il existe notamment une corrélation entre l’incidence de survenue de cette mutation avec le phénotype de peau présentant une faible protection aux rayons ultraviolets, *i.e* les peaux claires (Fedorenko IV et al., 2011).

2. Les stratégies thérapeutiques du mélanome BRAF^{V600E}

2.1. Les thérapies ciblées de BRAF^{V600E}

Le développement d’inhibiteurs de MAPK (MAPKi) ciblant BRAF (BRAFi) et MEK (MEKi), respectivement le Vemurafenib ou le Dabrafenib, et le Trametinib ou le Cobimetinib, ont révolutionné les traitements du mélanome chez les patients (**figure 32**) (Kozar I et al., 2019).

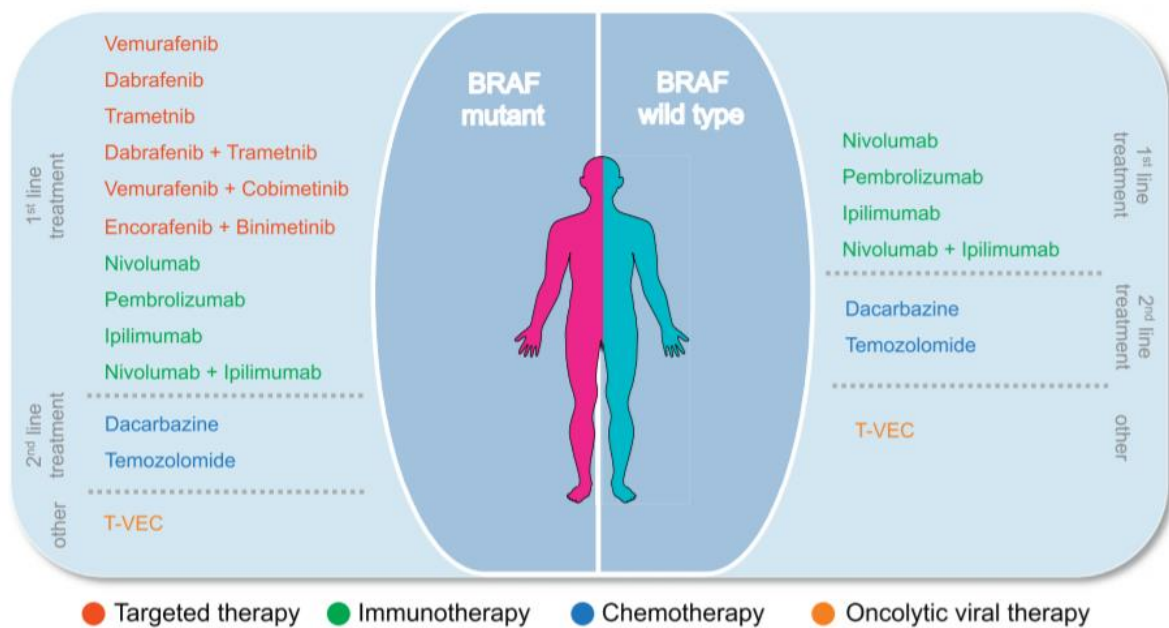


Figure 32 – Traitements approuvés pour les patients présentant un mélanome métastatique non opérable. Les patients présentant BRAF mutant sont traités en première ligne par thérapie ciblée aux inhibiteurs de BRAF (BRAFi) ou par immunothérapie, alors que les patients présentant BRAF non muté sont préférentiellement traités par immunothérapie en première ligne. Les patients ne répondant pas aux traitements de première ligne sont alors traités en seconde ligne par des chimiothérapies, et éventuellement en troisième ligne par des traitements locaux par traitement viral oncolytique (Kozar I et al., 2019).

Effets métaboliques induits par les BRAFi

La majorité des cellules de mélanome présentent un phénotype de type Warburg et utilisent préférentiellement la glycolyse aérobie pour leur survie et leur prolifération. L'inhibition de BRAF par le Vemurafenib (PLX4032) dans des mélanomes métastatiques induit des effets métaboliques qui participent à l'induction de la mort cellulaire. Le traitement de mélanome BRAF^{V600E} au Vemurafenib conduit à une réduction de la captation du glucose des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (Trinh A et al., 2018), mais aussi cliniquement chez des patients traités. Theodosakis et collègues ont notamment montré que cette diminution de l'activité glycolytique était corrélée à une diminution du volume cellulaire (Theodosakis N et al., 2015).

Bien qu'efficace, les BRAFi ne parviennent pas à éliminer complètement les cellules de mélanome mutées BRAF^{V600E}. Sous BRAFi, la diminution de l'utilisation du glucose et de la production de lactate est associée à une augmentation de l'oxydation du pyruvate au sein du métabolisme mitochondrial (Delgado-Goni T et al., 2016). Notre équipe a montré que les cellules de mélanome ayant acquis une résistance aux BRAFi présentent une respiration mitochondriale et un stress oxydatif plus important, ce qui les rend plus sensibles à la mort induite par des molécules pro-oxydantes telle que l'elesclomol (Corazao-Rozas P et al., 2013). Par ailleurs, la résistance aux BRAFi induit une dépendance à la

glutamine dans les cellules de mélanome (Baenke F et al., 2016). Nous avons également observé une augmentation de la captation et de la métabolisation de la glutamine en comparaison des cellules non résistantes. Cette augmentation du métabolisme de la glutamine est utilisée par les mitochondries afin de favoriser la synthèse *de novo* du glutamate et la synthèse de glutathion, permettant de faire face au stress oxydant. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur de la glutamine GLS1, le BPTES, s'est avérée efficace pour affecter la prolifération et la survie des cellules de mélanome résistantes aux BRAFi (Trinh A et al., 2018).

2.2. Les mécanismes de résistance aux MAPKi

2.2.1. Les mécanismes de résistances intrinsèques aux MAPKi

Des études ont montré que 20% des patients présentant le mélanome muté BRAF^{V600E} ne répondaient pas aux BRAFi (Fedorenko VI et al., 2011). Parmi les résistances intrinsèques aux inhibiteurs de MAPK (MAPKi), il a été montré que l'un des mécanismes de résistance acquise au MEKi est due à l'amplification de l'oncogène BRAF^{V600E}, qui augmente la proportion de Mek phosphorylée et donc augmente l'activation de la voie MAPK (Sale MJ et al., 2019).

2.2.2. Les mécanismes de résistances extrinsèques aux MAPKi

2.2.2.1. Dérégulation des voies de signalisation

La voie STAT.

Dans le mélanome, plusieurs voies de signalisation participent à la tumorigenèse. Il a été montré que STAT3 est nécessaire à l'activation des cibles en aval de BRAF et pour stabiliser la protéine anti-apoptotique Mcl-1 impliquée dans la survie et la chimiorésistance et la résistance au Vemurafenib des cellules de mélanomes BRAF^{V600E} (Becker TM et al., 2014). Par conséquent, l'inhibition de STAT3 permet d'induire une inhibition de la croissance tumorale chez les cellules de mélanome sensibles et résistantes au Vemurafenib (Liu F et al., 2013).

La voie PI3K/Akt/mTORC1.

Dans le mélanome muté BRAF^{V600E}, des auteurs ont montré que les cellules exposées de manière aigue ou chronique à un faible pH développaient une résistance envers le Vemurafenib, et que l'inhibition de mTOR par l'everolimus permettait de contrer cette résistance et d'affecter la survie et la prolifération de ces cellules (Ruzzolini J et al., 2017).

Plus de 10% des mélanomes traités au Vemurafenib présentent une perte du suppresseur de tumeur PTEN, associée à une augmentation de la voie Akt qui conduit à la suppression de la protéine pro-apoptotique Bad et l'inhibition de la liaison de Bad à Bax. De plus, sous BRAFi, il a également été

observé un export hors du noyau du facteur nucléaire FoxO3a, un facteur de transcription régulant la survie et la croissance cellulaire, conduisant à une diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim (Fedorenko Vi et al., 2011).

La voie MAPK.

L'amplification de la kinase MAP38K (ou COT) dans le mélanome est l'un des mécanismes permettant d'activer directement la voie Mek/Erk de manière RAF-indépendante, ce qui permet d'induire une cascade de signalisation aboutissant à la prolifération et à la survie des cellules de mélanome résistantes aux BRAFi (Kozar I et al., 2019).

2.2.2.2. Les mutations ponctuelles des voies de signalisation

Dans le cas du mélanome, 80% des cas de résistance sont issus de la réactivation de la voie MAPK et des voies alternatives, grâce à des mutations activatrices de gènes impliqués dans la prolifération et la survie ou à la perte des gènes suppresseurs de tumeur par exemple (**figure 33**) (Kakadia S et al., 2018).

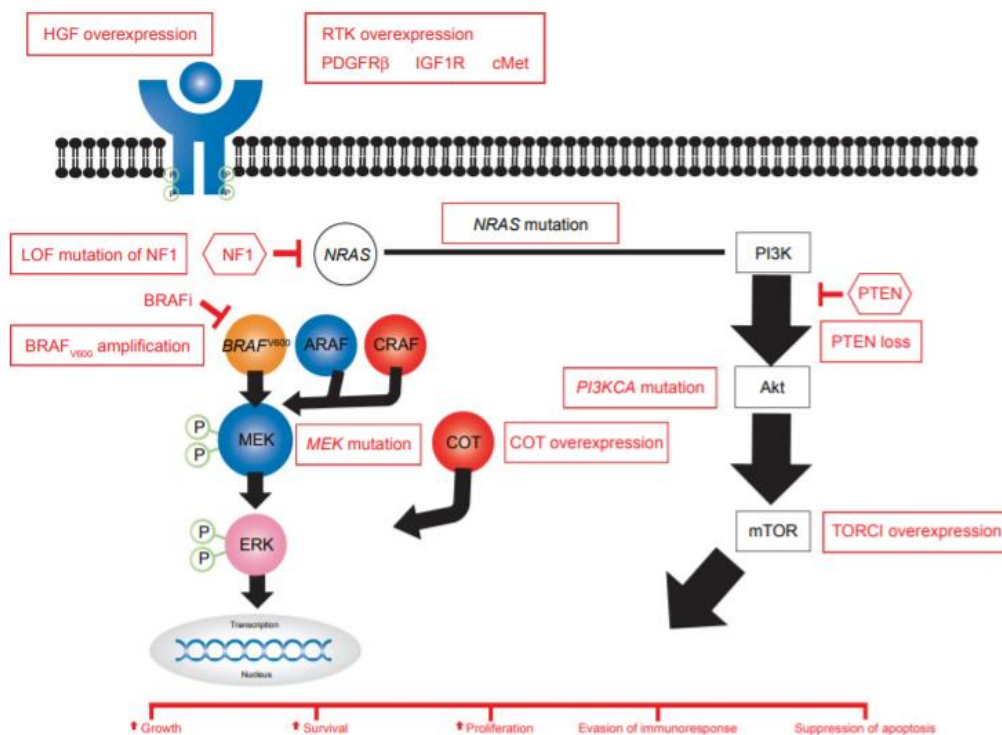


Figure 33 – Les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées dans le mélanome. Différents mécanismes impliquant l'amplification, la surexpression, la mutation gain de fonction d'oncogènes ou la mutation perte de fonction de suppresseurs de tumeur permettent de contourner les BRAFi et d'activer des voies de signalisation permettant la prolifération, la survie, la croissance, l'évasion de la réponse immunitaire et la suppression de l'apoptose des cellules devenues résistantes aux BRAFi (d'après Kakadia S et al., 2018).

2.2.3. Implication des cellules souches cancéreuses de mélanome dans la résistance aux traitements

La présence de CSCs dans les mélanomes a longtemps porté à débat. Les cellules cancéreuses constituant le mélanome sont très hétérogènes, et un faible nombre d'entre elles peut présenter des caractéristiques d'auto-renouveaulement, d'initiation de tumeur, de métastase, de transition épithélio-mésenchymateuse, de progression tumorale et d'angiogenèse (figure 34). Ces cellules présentant des caractéristiques de souchitude sont également résistantes aux traitements anticancéreux (Kumar A et al., 2017).

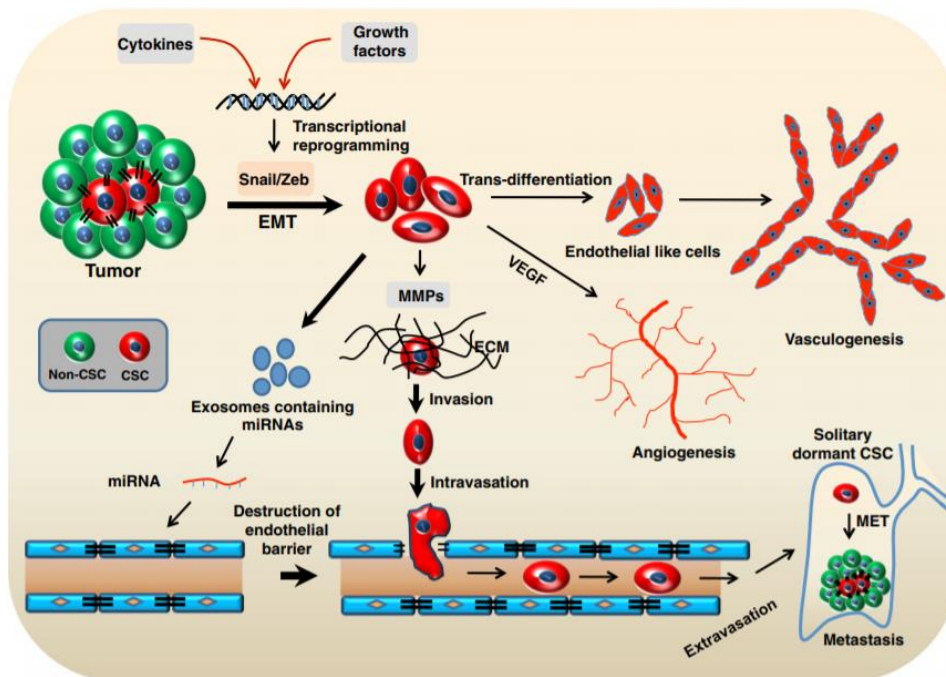


Figure 34 – Implication des CSCs dans les processus de tumorigenèse. Les CSCs sont capables de sécréter des cytokines et des facteurs de croissance capables de médier la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) où elles acquièrent un phénotype mésenchymal favorisant l'invasion. Les CSCs sécrètent des matrix metalloproteases (MMPs) et des miRNA afin de remodeler le microenvironnement et induire l'intravasation au niveau des vaisseaux, pour rejoindre leur niche métastatique où elles restent sous forme dormantes. Les CSCs peuvent ensuite être réactivées et induire la transition mésenchymato-épithéliale afin d'établir des tumeurs secondaires. Les cellules peuvent également sécréter du VEGF afin de favoriser l'angiogenèse, et se trans-différencier pour induire une vasculogenèse (d'après Kumar A et al., 2017) .

3. Le Vemurafenib : un arrêt de traitement envisageable ?

Sur une cohorte de 337 patients atteints de mélanome en stade avancé (IIIc et IV) et non traités au préalable, Chapman et al. ont réalisé un essai clinique BRIM-3 (ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT01006980), où ils ont montré une survie sans progression tumorale chez 74% des patients et une survie globale chez 84% des patients après 6 mois de traitements (Chapman PB et al., 2011).

Cependant, bien que ces traitements soient efficaces dans un premier temps, environ 80% des patients finissent par rechuter après 3 ans de traitements (Chapman PB et al., 2017).

Des BRAFi tels que le Vemurafenib ou le Dabrafenib ont été approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) en combinaison avec des inhibiteurs de MEK (MEKi) tel que le Cobimetinib pour le traitement de patients atteints de mélanomes métastatiques mutés BRAF^{V600E}. Dans l'étude clinique « coBRIM » de phase III débutée en 2012, des patients présentant un mélanome évolutif ou métastatique non opérables, et non traités préalablement, ont été traités au Vemurafenib seul ou par la combinaison Vemurafenib et Cobimetinib (ClinicalTrials.gov Identifiant: NCT01689519). La médiane de survie sans progression était de 6.2 et 9.9 mois, et le niveau de réponse complète ou partielle de 45% contre 68% respectivement. En conclusion de l'étude, les résultats montrent une meilleure survie sans progression chez les patients traités par le Vemurafenib et le Cobimetinib, en dépit d'une toxicité plus importante (**figure 35**) (Larkin J et al., 2014).

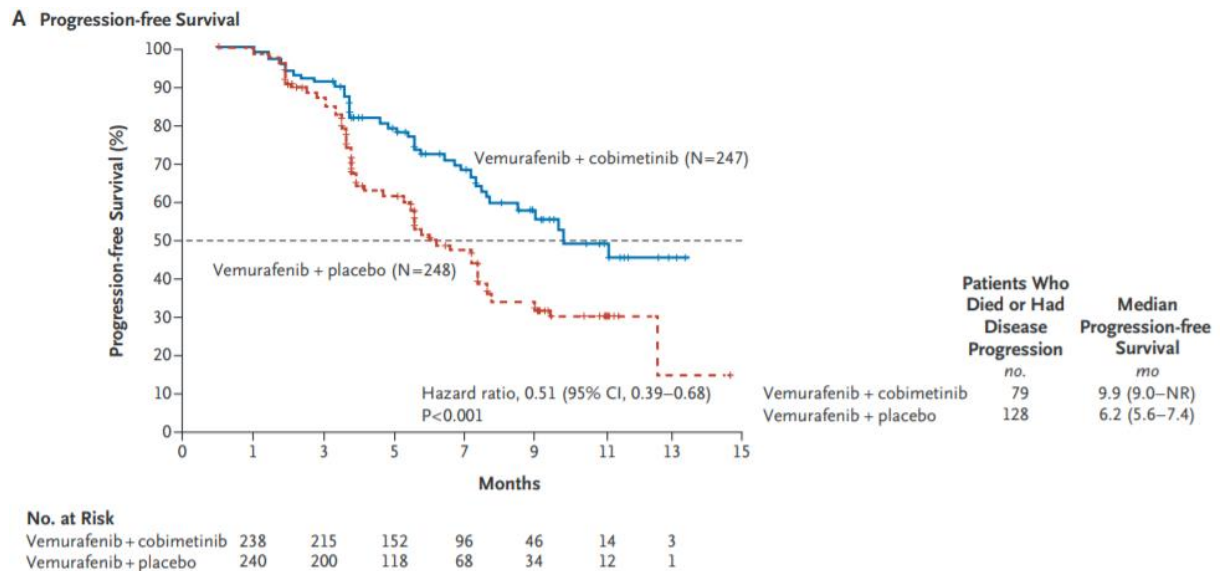


Figure 35 – Représentation de la survie sans progression de l'essai clinique coBRIM. Des patients atteints de mélanome métastatique n'ayant jamais été traités auparavant ont reçu le traitement au Vemurafenib + adjuvant, ou la combinaison Vemurafenib + Cobimetinib. La survie sans progression a été évaluée entre les deux groupes (d'après Larkin J et al., 2014).

FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

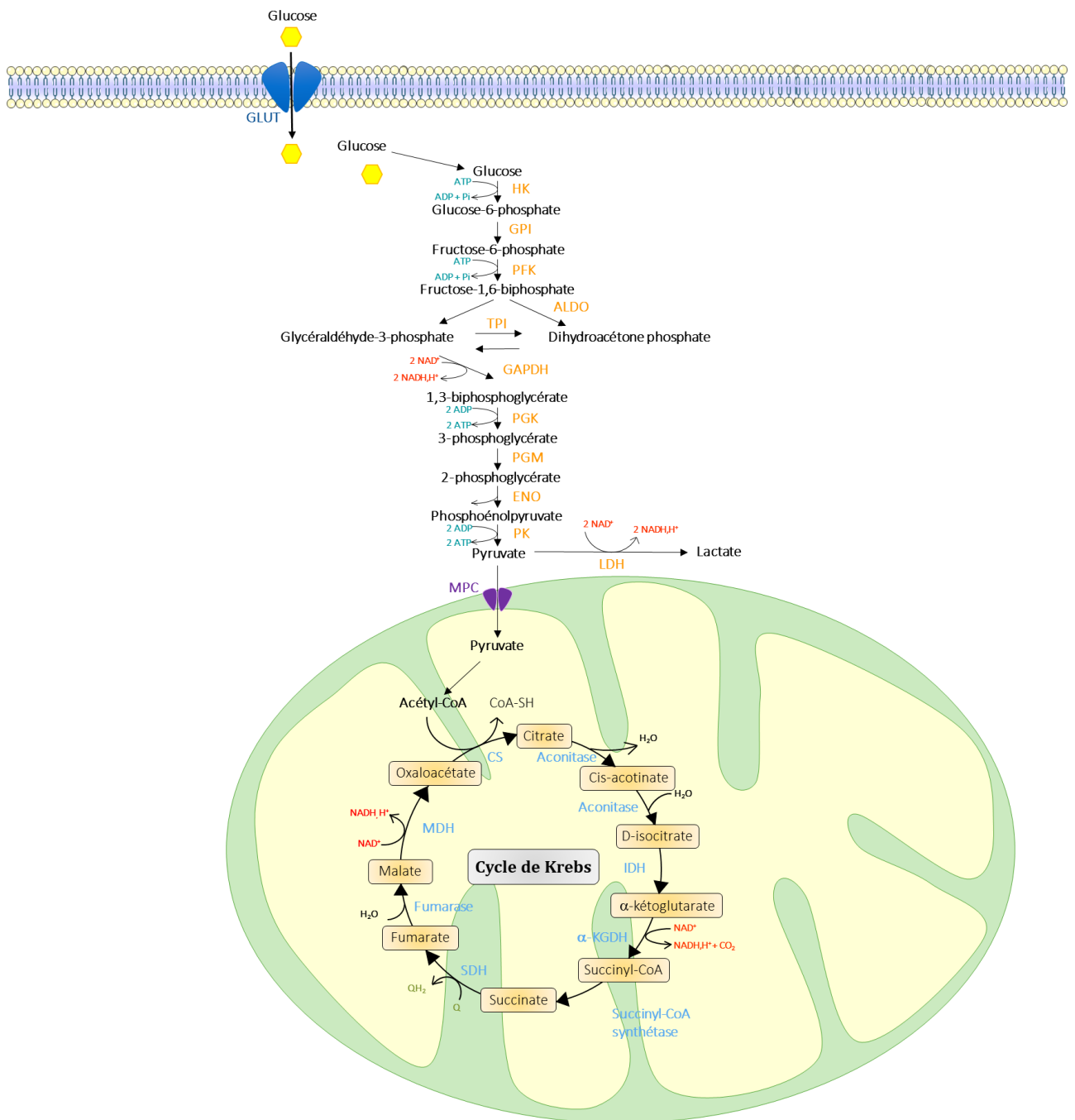


Figure supplémentaire 1 – Métabolisme : vue globale. (1) Après avoir été capté par la cellule, le glucose peut être métabolisé au travers de la glycolyse, un processus métabolique constitué de 10 étapes, permettant la formation du pyruvate qui lorsqu'il est converti en lactate, permet la production de 2 ATP. (2) Le glucose peut également être converti en G6P et emprunter la voie des pentoses phosphate afin de former du ribose-5-phosphate et régénérer le NADPH. (3) Afin de faire fonctionner le cycle de Krebs, la mitochondrie utilise des sources de carbone issues du pyruvate de la glycolyse, des acides aminés tels que la glutamine, ou encore des acides gras pour générer des équivalents réducteurs NADH et FADH₂, qui seront alors utilisés au niveau de la chaîne de transport des électrons (ETC). L'OXPHOS mitochondrial permet de générer l'équivalent de 32 molécules d'ATP.

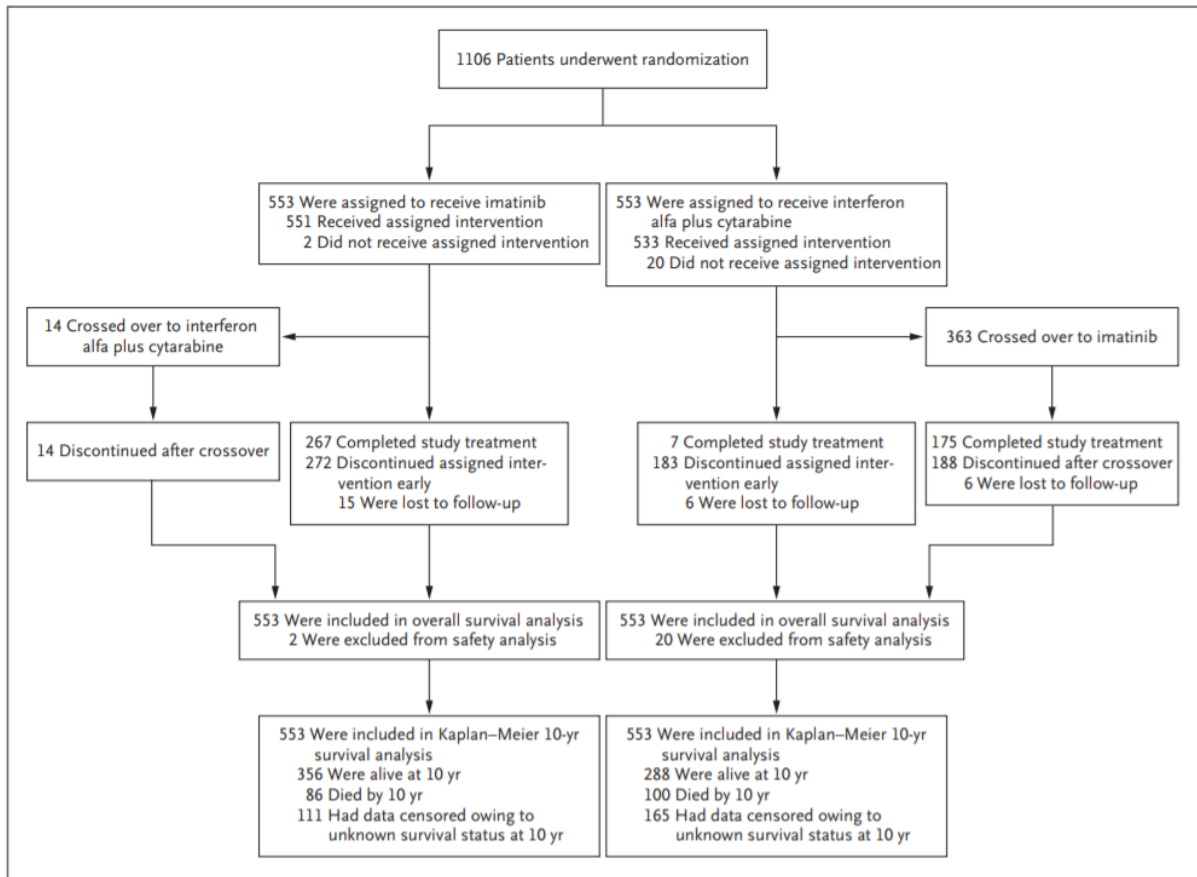
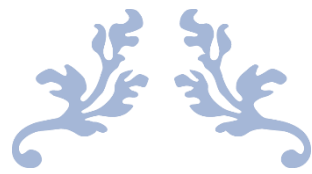


Figure supplémentaire 2 – Résumé des patients de l'étude clinique comparant le traitement Imatinib versus les traitements IFN- α + faible dose de cytarabine afin de déterminer la survie globale après 11 ans (d'après Hochhaus A et al., 2017).



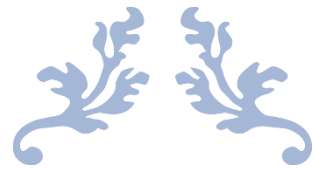
PROBLÉMATIQUE

Nous avons vu précédemment que les cellules cancéreuses possèdent un métabolisme particulier et métabolisent le glucose au travers de la glycolyse au détriment de l'OXPHOS mitochondrial. En effet, les cellules cancéreuses sont capables de mettre en place tout un panel de programmes favorisant la glycolyse, telles que l'augmentation de l'expression de transporteurs et d'enzymes glycolytiques, et la répression d'enzymes impliqués dans l'inhibition de l'OXPHOS telle que l'enzyme PDK (Kluza J et al., 2012). Cependant, de nombreux travaux ont permis de mettre en lumière le rôle clé du métabolisme mitochondrial dans plusieurs processus tumorigéniques. En effet, en plus de son activité dans le métabolisme et dans le déroulement de l'apoptose, il a été montré que la mitochondrie est également impliquée dans la régulation du stress oxydant, en favorisant la formation du glutamate pour augmenter le pool de glutathion par exemple (Trinh A et al., 2018). La mitochondrie joue également un rôle dans la protection contre le stress réticulaire, grâce au remodelage du réseau mitochondrial autour du réticulum endoplasmique dans le mélanome muté BRAF^{V600E} (Corazao-Rozas P et al., 2016). Dans le cas de leucémies, il a été montré le rôle protecteur de la protéine GILZ contre le stress réticulaire (André F et al., 2016).

- (1) Sous traitements aux chimiothérapies induisant des effets anti-métaboliques telles que les thérapies ciblées, un faible nombre de cellules cancéreuses peut survivre au traitement et, après un temps indéfini, proliférer à nouveau et induire à nouveau la pathologie. **Quelles sont les modifications métaboliques de ces cellules ? Quelles sont les modifications moléculaires leur permettant de survivre aux traitements ?**
- (2) Plusieurs articles ont montré que l'inactivation du métabolisme mitochondrial, en ciblant des protéines mitochondriales telle que la tigecycline inhibant la traduction mitochondriale ou l'oligomycine A inhibant l'ATP synthase mitochondriale, affecte la viabilité des cellules cancéreuses. **Comment le métabolisme mitochondrial protège-t-il les cellules cancéreuses ? Par quels mécanismes favorise-t-il leur survie ?**
- (3) Puisque la glycolyse est découplée de l'activité mitochondriale, et puisque les mitochondries sont toujours fonctionnelles, l'une des questions posées est **comment est alimenté le métabolisme mitochondrial ?**
- (4) Il est connu que les cellules souches cancéreuses sont également impliquées dans la persistance et la résistance aux thérapies anticancéreuses. Des auteurs ont montré que sous thérapies ciblées, les cellules souches leucémiques étaient capables de survivre de manière indépendante de BCR-Abl. Dans le modèle du mélanome muté BRAFV600E résistant au BRAFi,

il a été montré que les cellules étaient dépendantes de l'OXPHOS mitochondrial. Il est donc intéressant de **connaître les failles métaboliques des cellules cancéreuses afin de pouvoir les cibler.**

- (5) Plusieurs travaux suggèrent que le ciblage d'une seule voie métabolique ne serait pas suffisant pour cibler la population de cellules cancéreuses. Il serait donc intéressant de savoir **quelles sont combinaisons thérapeutiques associant thérapies ciblées et inhibiteurs mitochondriaux capables d'induire une coopérativité anti-métabolique afin d'éradiquer les cellules cancéreuses ?**



RÉSULTATS ARTICLE 1

RÉSUMÉ ARTICLE 1 :

« Metabolic rewiring in cancer cells overexpressing the glucocorticoid-induced leucine zipper protein (GILZ) : activation of mitochondrial oxidative phosphorylation and sensitization to oxidative cell death induced by mitochondrial targeted drugs »

Dans les cellules cancéreuses, le métabolisme mitochondrial est influencé par des facteurs intrinsèques, tels que les oncogènes, mais également par des facteurs extrinsèques qui dépendent du microenvironnement tumoral. Parmi les facteurs extrinsèques, il a été montré que les glucocorticoïdes participent à la prolifération et à la progression tumorale, notamment au travers de l'activation de l'expression d'une des protéines cibles : la protéine GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper). Plusieurs travaux suggèrent que GILZ serait impliquée dans le métabolisme des cellules leucémiques, puisque cette protéine est capable d'interagir avec de nombreux effecteurs impliqués dans la prolifération, la survie, mais également le métabolisme tels que les protéines de la voie MAPK (Ayroldi E et al., 2007), de la voie PI3K/Akt/mTOR comme FoxO3 (Latré de Laté P et al., 2010) et mTORC2 (Joha S et al., 2012).

Dans une étude précédente, notre laboratoire a montré que GILZ a un rôle cytoprotecteur face au stress réticulaire dans des modèles de LAM, de LMC et de mélanome muté BRAF^{V600E}. En effet, lors d'un stress réticulaire, la surexpression de GILZ permet aux cellules cancéreuses de maintenir leur réseau mitochondrial, ce qui se traduit par une augmentation de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) mitochondriale et de la production d'ATP. Nous avons montré d'une part que GILZ augmente l'expression de la respiration mitochondriale de manière dose-dépendante en transfectant des quantités croissantes de la protéine GILZ, et d'autre part que ces effets sont réversibles. Afin d'étudier le rôle endogène de GILZ, nous avons traité des cellules leucémiques à la Dexaméthasone (DEX). Sous traitement à la DEX, les cellules présentent une augmentation de leur respiration mitochondriale basale, mais celle-ci est annihilée lors d'un siRNA de GILZ, montrant alors l'implication de GILZ dans le métabolisme OXPHOS mitochondrial.

Nous avons précédemment montré que GILZ induit un remodelage du réseau mitochondrial, mais la présente étude montre qu'il ne s'accompagne pas d'une biogenèse mitochondriale puisque l'expression des protéines PGC1 α et β reste inchangée par l'expression de GILZ. Par ailleurs, l'étude de la respiration mitochondriale sur mitochondries isolées ne montre aucune différence dans l'OXPHOS de cellules leucémiques surexprimant GILZ et celles qui ne la surexpriment pas. Nous avons alors étudié l'utilisation de substrats par les cellules surexprimant GILZ. Nos résultats montrent que ces dernières induisent une relocalisation des transporteurs au glucose Slc2A1 et Slc2A3 au niveau de la membrane plasmique permettant ainsi une augmentation de la consommation de glucose. En outre, l'utilisation

d'inhibiteurs de l'entrée du pyruvate issu du glucose (UK5099), de la glutamine (BPTES) et des acides gras (Etomoxir) dans les mitochondries induit une diminution de l'activité OXPHOS de ces cellules au même niveau que les cellules leucémiques ne surexprimant pas GILZ, montrant alors que ces cellules surexprimant GILZ métabolisent davantage de substrats au sein de leurs mitochondries. Cependant, l'augmentation de l'OXPHOS n'est pas sans conséquence puisque ces cellules présentent également une augmentation de la production de ROS mitochondriaux. Par conséquent, l'utilisation d'agents pro-oxydants tels que l'elesclomol ou la ménadione pourrait permettre de resensibiliser les cellules surexprimant GILZ à la mort cellulaire.



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biociel



Research paper

Metabolic rewiring in cancer cells overexpressing the glucocorticoid-induced leucine zipper protein (GILZ): Activation of mitochondrial oxidative phosphorylation and sensitization to oxidative cell death induced by mitochondrial targeted drugs



Fanny André^a, Anne Trinh^a, Stéphane Balayssac^c, Patrice Maboudou^b, Salim Dekiok^b, Myriam Malet-Martino^c, Bruno Quesnel^a, Thierry Idziorek^a, Jérôme Kluza^{a,1}, Philippe Marchetti^{a,b,*,1}

^a Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S 1172, JPArc, Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer, F-59000, Lille, France

^b CHU Lille, Centre de Biologie-Pathologie, Biologie et Thérapie cellulaire & Banque de Tissus, F-59000, Lille, France

^c Laboratoire SPCMIB, UMR CNRS 5068 Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062, Toulouse Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 December 2016

Received in revised form 17 February 2017

Accepted 24 February 2017

Available online 1 March 2017

Keywords:

Glucocorticoids

TSC-22

ROS

Mitochondria

Cancer cell metabolism

ABSTRACT

Cancer cell metabolism is largely controlled by oncogenic signals and nutrient availability. Here, we highlighted that the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ), an intracellular protein influencing many signaling pathways, reprograms cancer cell metabolism to promote proliferation. We provided evidence that GILZ overexpression induced a significant increase of mitochondrial oxidative phosphorylation as evidenced by the augmentation in basal respiration, ATP-linked respiration as well as respiratory capacity. Pharmacological inhibition of glucose, glutamine and fatty acid oxidation reduced the activation of GILZ-induced mitochondrial oxidative phosphorylation. At glycolysis level, GILZ-overexpressing cells enhanced the expression of glucose transporters in their plasmatic membrane and showed higher glycolytic reserve. ¹H NMR metabolites quantification showed an up-regulation of amino acid biosynthesis. The GILZ-induced metabolic reprogramming is present in various cancer cell lines regardless of their driver mutations status and is associated with higher proliferation rates persisting under metabolic stress conditions. Interestingly, high levels of OXPHOS made GILZ-overexpressing cells vulnerable to cell death induced by mitochondrial pro-oxidants. Altogether, these data indicate that GILZ reprograms cancer metabolism towards mitochondrial OXPHOS and sensitizes cancer cells to mitochondria-targeted drugs with pro-oxidant activities.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer cell metabolism has recently been the focus of attention as a novel source of potential targets for anticancer drugs development (Marchetti et al., 2014). Aerobic glycolysis (a.k.a the Warburg effect) is the hallmark of tumor metabolism and has traditionally been associated with cancer cell proliferation (Pavlova and Thompson, 2016). However, the metabolic signature of can-

cer cell is not always limited to aerobic glycolysis and several cancer cell types, including leukemia cells, are on the contrary critically dependent on mitochondrial oxidation for growth and survival (Zu and Guppy, 2004). In these cancer cells, the mitochondrial oxidization of amino acids, such as glutamine, and/or fatty acids are used as additional substrates to glucose-derived pyruvate. Accordingly, pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation in the mitochondria inhibits the proliferation of human leukemic cells and sensitizes them to apoptosis (Samudio et al., 2010). Thus, the fact that beyond glycolysis, cancer cells can adopt different metabolic oxidative programs for growth and survival does make mitochondrial metabolism a valuable target for cancer therapy.

It is now well established that the metabolic network of cancer cell is dependent on both external and internal factors (Marchetti et al., 2015). On the one hand, metabolic heterogeneity arises, at

Abbreviations: Elesclomol, N¹,N³-dimethyl-N¹,N³-bis(phenylcarbonothioyl) propanedihydrazide; HE, hydroxyethidine; NAC, N-acetyl cysteine.

* Corresponding author at: INSERM UMR-S 1172 Faculté de Médecine, 1, Place Verdun F- 59045 Lille Cedex France.

E-mail address: philippe.marchetti@inserm.fr (P. Marchetti).

¹ JK and PM share co-seniorship of this paper.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biociel.2017.02.011>

1357-2725/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

least partly, as a consequence of the genetic heterogeneity of cancer cells. Thus, oncogene activation is directly embedded in the metabolic rewiring. Mutations in the MAPK pathway (e.g. mutations affecting BRAF) reprogram the metabolism to promote cancer cell proliferation via the increase in glucose uptake and glycolysis and mitochondrial OXPHOS attenuation (for review (Marchetti et al., 2014)). On the other hand, environmental signals seriously influence the metabolic program of cancer cells. As a matter of fact, the metabolism of cancer cells has to accommodate fluctuating microenvironment conditions such as variable oxygen rate, nutrient delivery and poor metabolic waste removal. Indeed, the microenvironment promotes a selection pressure on cancer cells forcing them to adapt their metabolic networks in order to survive and proliferate (Obre and Rossignol, 2015).

The glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) protein, a member of the TGF β -stimulated clone-22 domain (TCS-22) family, is widely expressed in various cell types including normal and transformed hematopoietic cells. The expression of GILZ, originally reported as being increased in thymocytes exposed to dexamethasone (D'Adamio et al., 1997), could also be enhanced by other soluble factors like estradiol (Tynan et al., 2004), interleukin 10 (IL-10) or the transforming growth factor β (TGF β) (Ronchetti et al., 2015). Hypoxia was found to be a strong inducer of GILZ expression via the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) –dependent signaling pathway (Wang et al., 2012). GILZ possesses pleiotropic activities and is considered as one of the principal mediators of the anti-inflammatory and immunosuppressive activities of glucocorticoids (Ronchetti et al., 2015). GILZ is involved in direct intracellular interactions with several transcription factors and main signaling proteins (such as Ras or mammalian target of rapamycin complex-2 (mTORC2) (Ayroldi et al., 2007; Joha et al., 2012)). Besides these canonical immunological functions, GILZ also interferes with intracellular signaling pathways that control proliferation, differentiation and survival of normal and cancer cells (Ayroldi et al., 2007; Di Marco et al., 2007; Joha et al., 2012). Recently, we demonstrated that the overexpression of GILZ protected leukemia cells from endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated apoptosis via mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) dependent mechanisms (André et al., 2016). In this study, we investigated the metabolic effects of GILZ in cancer cells. Our results evidenced that GILZ rewired the metabolism towards mitochondrial oxidative phosphorylation, a metabolic change associated with high cancer cell proliferation. Furthermore, mitochondrial reprogramming can be exploited for therapeutic approaches using pro-oxidative drugs that selectively target mitochondria.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and reagents

The Da1 IL3-dependent mouse leukemia cell line was maintained in DMEM medium (Gibco-BRL, Life Technologies SARL, Cergy-Pontoise, France) containing 25 mM glucose supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco-BRL), 1 mM sodium pyruvate (Gibco-BRL) and 4 ng/mL IL-3 (PeproTech, London, UK). The more aggressive Da1-3b/M1 leukemia cell line, which carries an E255K BCR-ABL mutation, was cultured in the same medium without IL-3 (Joha et al., 2012). The BCR-ABL⁺ human K562 cell line and BRAFV600E mutated melanoma cells were cultured as Da1-3b/M1 cells (André et al., 2016). A375p0 cells depleted in mitochondrial DNA were maintained in a specific medium and sublines were controlled for mtDNA depletion using specific PCR reactions as previously published (Marchetti et al., 1996). Recently, A375p0 cells overexpressing GILZ were well refined (André et al.,

2016). Murine and human GILZ cell lines were obtained by stable transfection with pcDNA GILZ– blasticidin plasmid (InvivoGen Toulouse, France) as previously described (Joha et al., 2012). Alternatively, GILZ transient silencing was performed with siRNAs (sc-43805, Santa Cruz Biotechnology) or with a similar amount of non-targeting control siRNA (sc-37007). Transient transfections of siRNAs were performed using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Reagents were purchased from Sigma-Aldrich (StLouis, MO, USA) unless otherwise stated. Elesclomol (STA-4783) was purchased from Selleckchem (Huissen, The Netherlands).

2.2. Subcellular fractionation

Mitochondrial enrichment was obtained using a protocol based on differential centrifugation, according to the procedure described by Frezza (Frezza et al., 2007). Briefly, cells (at least 1×10^8) were resuspended in the IB buffer containing sucrose, Tris/MOPS and EGTA, as indicated (Frezza et al., 2007), homogenized in a Potter-Thomas homogenizer on ice, and then centrifuged for 10 min at 600g followed by centrifugation for 10 min at 7000g before the mitochondria pellet was resuspended. Cell permeabilization was verified under microscope using Trypan Blue.

2.3. Metabolism determination

Oxygen consumption rates were recorded with Clark-type oxygen electrodes (Hansatech Instruments Ltd, UK) (Kluza et al., 2011). Alternatively, cellular bioenergetics, including oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR), were measured by Seahorse Bioscience XF-24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA). 24-well plates were coated with Corning[®] Cell-Tak[™] Cell and Tissue Adhesive (Corning Incorporated) to allow the adhesion of suspended cells (2×10^4 cells/well). Oligomycin A, carbonyl-cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), antimycin A and rotenone were applied on the microplate to test mitochondrial respiration while glucose, oligomycin A and 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG) were added to test glycolytic activity. Glucose and lactate were measured in the extracellular medium using a SYNCHRON LX20 Clinical system (Beckman Coulter, Fullerton, CA USA). Cell titer Glow Assay Kit (Promega) was used for ATP determination.

2.4. Flow cytometric analyses

Evaluation of mitochondrial mass or mitochondrial membrane potential was performed by flow cytometry (FACS Canto II cytofluorometer (Beckton Dickinson)) with 50 nM MitoTracker-Green (MTG) or 50 nM CMX-Ros staining as described (Kluza et al., 2011). Evaluation of cell viability was conducted with propidium iodide staining, cell cycle analysis and detection of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) were evaluated with hydroethidine (HE) following standard protocols (Corzaao Rozas et al., 2013).

2.5. Real-time quantitative reverse transcription PCR

Quantitative detection of mRNA was performed by real-time PCR using the Lightcycler 480 detector (Roche Applied Science, Mannheim Germany) as previously published (Kluza et al., 2011). The transcript levels in triplicates were compared using the Pfaffl method after normalization to those of β tubulin.

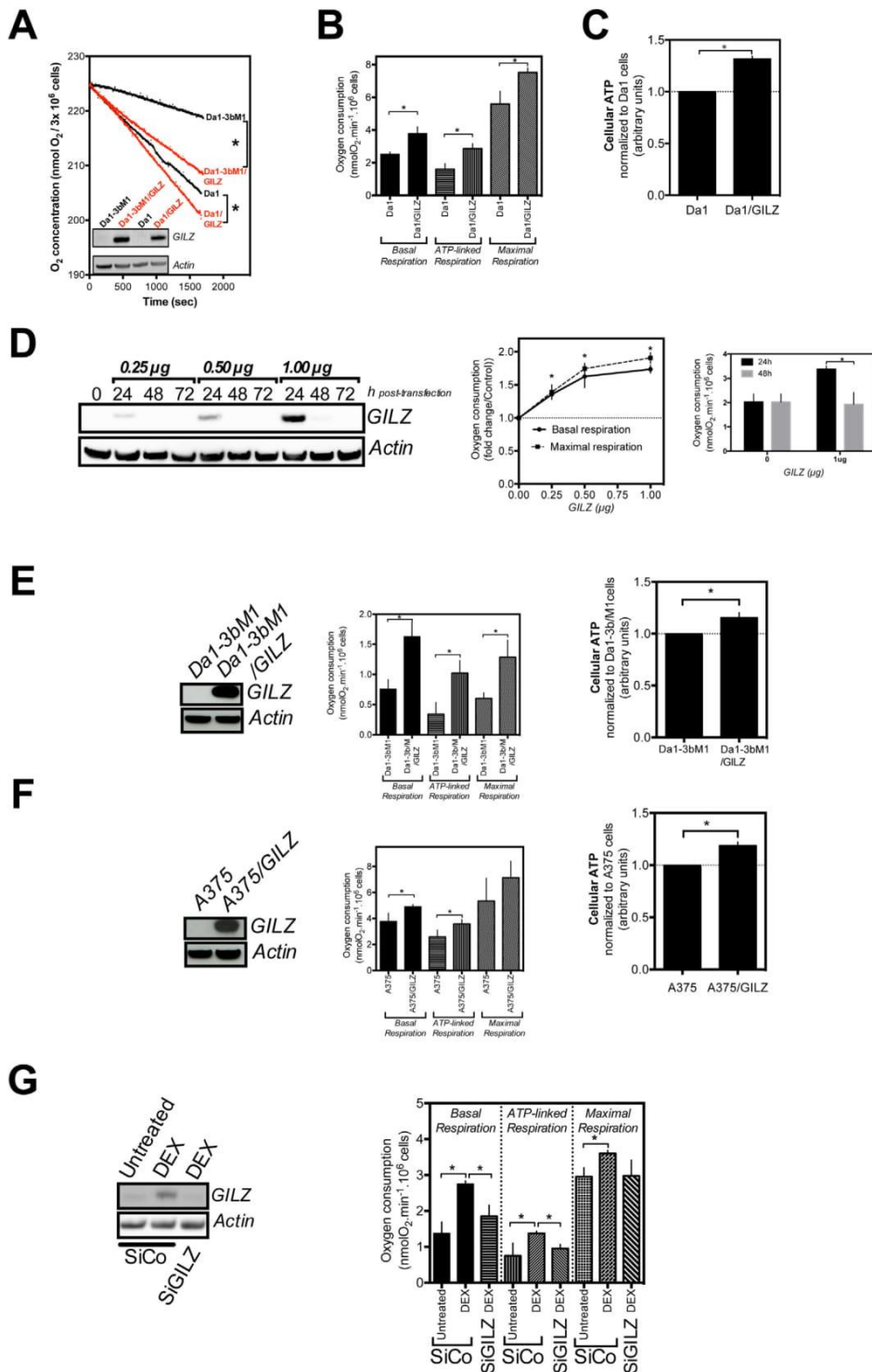


Fig. 1. Determination of OXPHOS in cancer cells overexpressing GILZ (A) Representative traces of oxygen concentration recorded over time of indicated cells. Representative experiment of 3 performed **p* < 0.05 (inset: GILZ expression measured by Western blot in Da1 or Da1-3b/M1 cells transiently transfected with pcDNA (control) or pcDNA-GILZ. Actin serves as loading control); (B) Basal respiration, ATP-linked respiration (basal respiration subtracted from respiration measured after 3 μ M oligomycin), and maximal respiration (after 3 μ M FCCP) are indicated (*n* = 5, mean \pm SD **p* < 0.05); (C) Intracellular ATP production in Da1 and Da1/GILZ (*n* = 3, mean \pm SD; **p* < 0.05); (D) Dose response transfection of pcDNA-GILZ in Da1 cells then (left) protein extracts were prepared at indicated times and analyzed for GILZ expression by Western-blot. Actin served as loading control; (center) Basal respiration and maximum respiration (FCCP exposure) were measured 24h after transfection with the indicated amounts of pcDNA-GILZ (mean \pm SD, *n* = 4; **p* < 0.05 vs. Control); (right) Basal respiration was compared 24h and 48h post-transfection with 1 μ g pcDNA-GILZ (mean \pm SD, *n* = 3; **p* < 0.05); (E) Da1-3bM1 or (F) A375 cells were transfected with pcDNA (control) or pcDNA-GILZ and (right) GILZ expression was checked by Western blot, (center)

2.6. Quantification of metabolites

Metabolites were extracted (Kluza et al., 2012) and the ¹H NMR method was applied for quantification as previously described (Cruz et al., n.d.).

2.7. Immunoblotting

When indicated, cell fractionation by differential centrifugation was used (Ballot et al., 2010). The immunoblotting procedure has been previously detailed (Ballot et al., 2009). The following primary antibodies were used: GILZ (FL-134) (1:500, Santa Cruz biotechnology), GILZ (G-5) (1:500, Santa Cruz biotechnology), MitoProfile[®] Total OXPHOS WB Antibody Cocktail (Ab110413) (1:1000, Abcam), SLC2A1 (H-43) (1:500, Santa Cruz biotechnology), SLC2A3 (Ab41525) (1:1000, Abcam), SLC2A6 (M-16) (1:500, Santa Cruz biotechnology), HKI (G-1) (1:500, Santa Cruz biotechnology), HKII (C-14) (1:500, Santa Cruz biotechnology), GAPDH (6C5) (1:1000, Santa Cruz biotechnology), PKM2 (#31985) (1:1000, Cell signaling), PDK3 (RR-2) (1:1000, Santa Cruz biotechnology), Aldolase (1:1000, Santa Cruz biotechnology), PGC1 α , (1:1000, Cell signaling), A (1:1000, Santa Cruz biotechnology).

2.8. Statistical analysis

Statistics were performed with GraphPad Prism[®] version 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The student's *t*-test was used to compare data sets with a statistical significance set at **p* < 0.05.

3. Results

3.1. GILZ-overexpressing cancer cells exhibit high mitochondrial OXPHOS

Our previous study on the influence of GILZ on ER stress-induced cell death showed that the anti-apoptotic effect of GILZ required the involvement of functional mitochondria (André et al., 2016). To further investigate the effect of GILZ on mitochondrial activity, we first measured oxygen consumption *in vitro* using Clark-type electrodes. In comparison to leukemic Da1 cells transfected with empty vector, leukemic cells overexpressing GILZ exhibited a higher level of respiration as indicated by a significant increase in oxygen consumption (Fig. 1A and B). Both basal and maximum respiratory capacity increased in GILZ-transfected cells. The increase in oxygen consumption can mainly be explained by an increased respiration coupled to ATP synthesis (ATP-linked respiration, Fig. 1B). These observed changes were directly correlated to a significant increase in ATP produced by GILZ-transfected cells (Fig. 1C). The regulation of OXPHOS capacity by GILZ was dose-dependent (Fig. 1D, left and center) and reversible (Fig. 1D, right) highlighting the specificity of the action.

Since mitochondrial metabolism is influenced by activated oncogenes in cancer cells (Marchetti et al., 2014, 2015), our next step was to determine whether the effects of GILZ on mitochondrial OXPHOS were also present in oncogene-addicted cell lines such as BCR-ABL mutated leukemia cells Da1-3b/M1 (Fig. 1A and 1E) or BRAFV600E melanoma cells, A375 (Fig. 1F). Similarly to Da1 cells (Fig. 1A–C), the overexpression of GILZ in oncogene-addicted cell

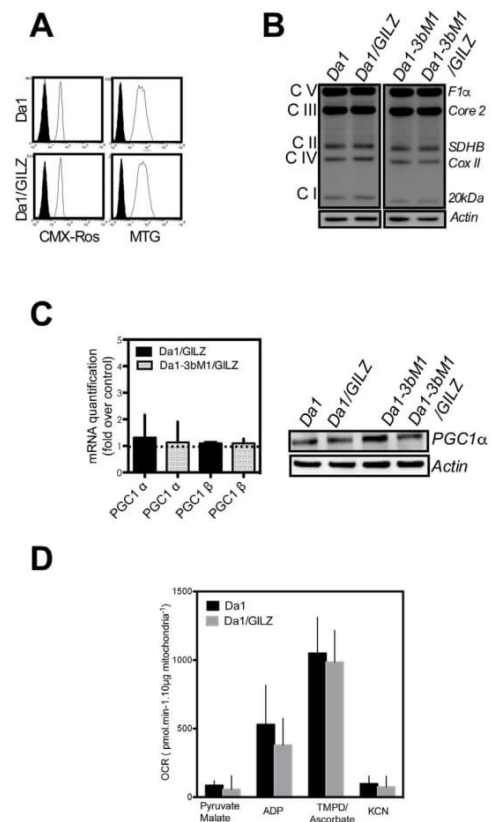


Fig. 2. Determination of mitochondrial mass in cancer cells overexpressing GILZ (A) Cytofluorometric analysis of $\Delta\Psi_m$ (CMX-Ros staining) and mitochondrial mass (MTG staining) in Da1 and Da1/GILZ. Fluorescence pattern of cells stained with CMX Ros or MTG (white profiles). Black profiles correspond to unstained cells; (n = 5); (B) Western blot analysis of mitochondrial respiratory chain complex proteins including complex I (20 kDa subunit), complex II (SDHB), III (core 2 protein), IV (Cox II) and I (F1 α ATPase) (n = 4) in indicated cell lines; (C) (left) mRNA and (right) protein expression of PGC1 α mRNA was determined by qRT-PCR. mRNA levels were corrected to the expression of β tubulin and are presented as fold changes in expression relative to the mean expression in control cells (mean \pm SD of 3 independent experiments) (D) oxygen consumption rates (OCR) of mitochondria isolated from Da1 vs. Da1/GILZ cells. Respiration in response to complex I (pyruvate + malate, 5 mM each) substrate was determined in the presence or absence of 1 mM ADP. The respiration driven by *N,N,N',N'*-tetramethyl *p*-phenylenediamine (TMPD 0.5 mM) + ascorbate (1 mM which reflects complex IV activity was measured and the complex IV inhibitor potassium cyanide (KCN, 100 mM), was used. (n = 5, mean \pm SD).

lines led to the significant enhancement of mitochondrial OXPHOS and ATP production (Fig. 1E and 1F).

The synthetic glucocorticoid, dexamethasone (DEX), enhanced GILZ expression in BCR-ABL⁺ K562 leukemia cells (Fig. 1G and André et al., 2016)). DEX resulted in increased mitochondrial OXPHOS, most likely due, at least in part, to the increased production of GILZ since the inhibition of GILZ expression by siRNA/ significantly hampered the high level of mitochondrial OXPHOS induced by DEX (Fig. 1F). Overall, GILZ overexpression enhanced mitochondrial metabolism, regardless of the cancer cells' genetic background.

Basal respiration, ATP-linked respiration and maximal respiration were measured as in (B), (right) Intracellular ATP production was measured as in (C); (mean \pm SD, n = 3 **p* < 0.05); (G) K562 cells were transfected with siRNA against GILZ or scrambled control (SiCo) for 12 h before 1 μ M dexamethasone for 48 h. (left) Cells were harvested for Western-blot of GILZ protein expression with actin as a loading control; (right) SiCo or siGILZ cells pre-treated with DEX were harvested for measurement of respiration parameters as above. (mean \pm SD, n = 3 independent experiments, **p* < 0.05).

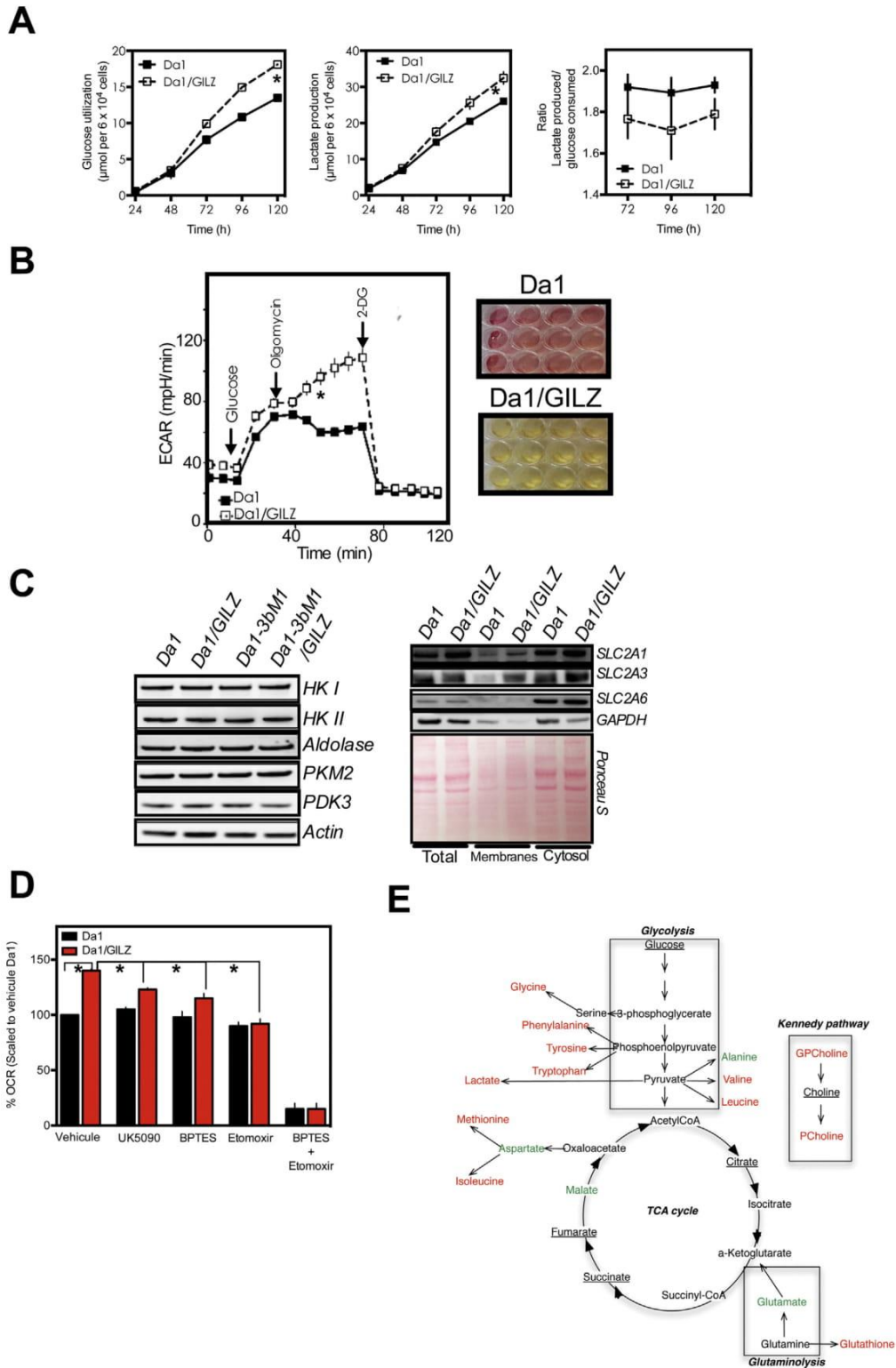


Fig. 3. Metabolic reprogramming in GILZ overexpressing cells (A) 60,000 cells received fresh medium containing glucose then glucose utilization (*left*), lactate production (*center*) and the ratio L/G, (*right*) were determined in the cell supernatant over time ($n=3$, mean \pm SD) (B) (*left*) Profile of extra cellular acidification rate (ECAR) was monitored with a Seahorse XF24 analyzer over time. As indicated, 25 mM glucose, 1 μ M oligomycin A, 100 mM 2-DG were injected sequentially. ($n=4$) (*right*) Representative images of dishes containing confluent Da1 and Da1/GILZ cells in phenol red-containing medium; (C) (*left*) Western blot analysis of protein expression of glycolytic enzymes and enzymes related to pyruvate metabolism in Da1 or Da1-3b/M1 cells compared with cells overexpressing GILZ. Actin served as loading control; (*right*) Western blot analysis of glucose transporters in total lysates, plasma membranes and cytosol

3.2. GILZ-overexpression does not modulate the number of mitochondria nor the intrinsic mitochondrial composition

Afterwards, we evaluated the potential mechanisms through which GILZ could strengthen mitochondrial OXPHOS. We found no changes in the mitochondrial mass as assessed by MTG staining (Fig. 2A), by the expression of mitochondrial electron transport chain proteins (Fig. 2B) or by the expression of the major transcriptional factor in mitochondrial biogenesis, PGC1 α (Fig. 2C). Intriguingly, measurement of oxygen consumption in the mitochondrial fractions isolated from GILZ-overexpressing leukemia cells (Fig. 2B) did not confirm the increase observed in intact cells overexpressing GILZ (Fig. 1). These results suggest that the increase in mitochondrial OXPHOS could originate from other upstream factors (or at the level) of mitochondria.

3.3. Metabolism of GILZ-overexpressing cells is characterized by an increase in mitochondrial fuel consumption

Compared with Da1, Da1/GILZ cells were more active in glucose and produced more lactate (Fig. 3A), as evidenced by the level of medium acidification and values of the extracellular acidification rate (ECAR) (Fig. 3B). However, GILZ did not increase the production of lactate per glucose consumed (Fig. 3A right) suggesting no major increase in aerobic glycolysis. Consistently, we specifically identified the up-regulation of the glucose transmembrane transporters, SCL2A1, SCL2A3 in the plasmatic membranes of Da1/GILZ cells (Fig. 3C), however no changes in the expression of several glycolytic enzymes were observed in GILZ overexpressing cells. Interestingly, GILZ-expressing cells exposed to oligomycin at a concentration that reduced respiration (*a.k.a* glycolytic reserve), strongly up-regulated the ECAR level (Fig. 3B), suggesting that in absence of functional mitochondria, GILZ exhibits a compensatory shift via glycolysis to meet their energy demands.

Cancer cell mitochondria often rely on other carbon sources besides glucose to prevent cell death and fuel proliferation (Jose et al., 2011). In order to test alternative carbon sources, we measured the cells' oxygen consumption in the presence or absence of the following fuel pathway inhibitors: UK5099, a mitochondrial pyruvate carrier blocker that reduces mitochondrial glucose-derived pyruvate oxidation, BPTES, a glutaminase inhibitor or Etomoxir, which inhibits fatty acid oxidation at carnitine palmitoyltransferase-1 (Fig. 3D). The increase in oxygen consumption of Da1/GILZ cells was significantly reduced upon exposure to UK5099 or BPTES. Furthermore, the difference in oxygen consumption between Da1 and Da1/GILZ cells was nearly abolished by Etomoxir treatment (Fig. 3D). These results suggest that in addition to the effect on glucose-dependent respiration, GILZ also supports the oxidation of glutamine and fatty acid in mitochondria.

Finally, we examined the metabolite levels of Da1 and Da1/GILZ in details using ^1H NMR analysis. As presented in Fig. 3E and Table 1, GILZ activated a specific metabolic program in leukemia cells characterized by a higher production of amino acids derived from intermediates of glycolysis and tricarboxylic acid (TCA) cycle.

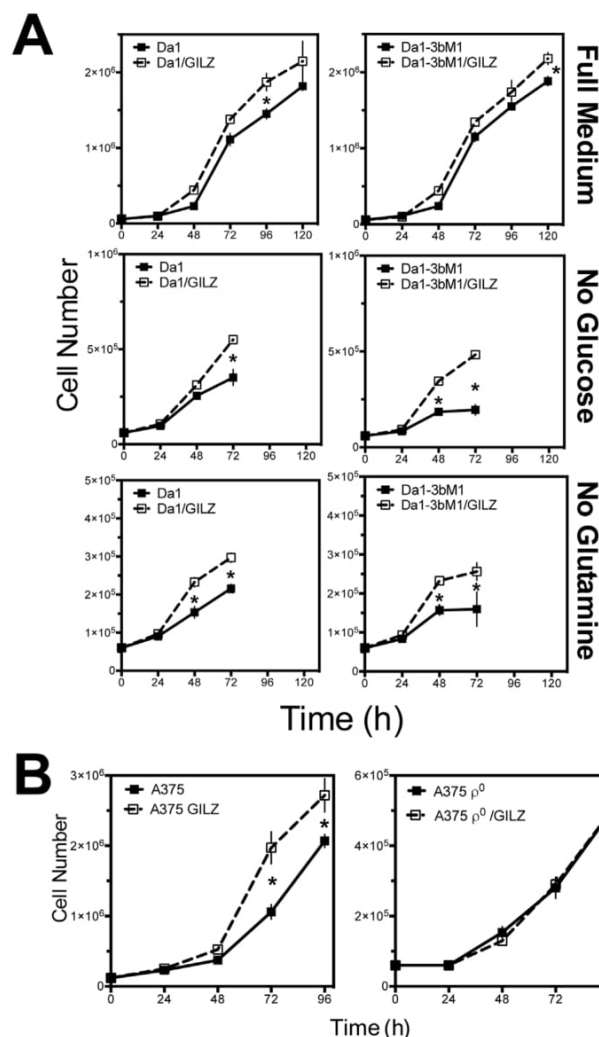


Fig. 4. Influence of GILZ on cell proliferation (A) Number of cells were determined indicated time in medium with both glucose and glutamine (full medium), medium without glucose (no glucose) and medium without glutamine (no glutamine) (mean \pm SD, n=3, *p<0.05); (B) A375 or A375 p⁰ cells transiently transfected with pcDNA (control) or pcDNA-GILZ were counted over time. (mean \pm SD, n=3, *p<0.05).

3.4. Mitochondrial metabolism supports high proliferation rate in GILZ-overexpressing cells

Metabolic networks tightly coordinate metabolic processes, cell functions and cell fate. We evaluated whether increase in mitochondrial metabolism induced by GILZ could regulate cell proliferation. GILZ-overexpressing leukemia (Fig. 4A, upper panel) and melanoma cells (Fig. 4B) presented a rather higher proliferative rate vs. controls, consistent with the high levels of choline metabolites observed in Da1/GILZ measured by NMR (Table 1). Glucose- or glutamine-deprived cultures grew slower than leukemic cells in full medium containing both glucose and glutamine (Fig. 4A). However, under nutrient stress conditions, GILZ-overexpressing

from Da1 and Da1/GILZ cells. GAPDH was used as loading control in cytosolic extract. Ponceau S staining was used as loading control. Blots are representative from independent experiments; (D) Oxygen Consumption Rate (OCR) in indicated cells exposed to 10 μM UK5099, 3 μM BPTES, 20 μM Etomoxir or 20 μM Etomoxir + 3 μM BPTI (mean \pm SD, n=3, *p<0.05); (E) Comprehensive metabolic pathways map of metabolites detected in Da1/GILZ vs. Da1 cells (red represents increased metabolites, green represents decreased, underlined represents no change and the other metabolites were not detected). Results are representative of ^1H NMR spectra from six individual cultures of each cell line. Quantification is presented in Table 1.

Table 1
Metabolites quantified by ¹H NMR in Da1 leukemia cells overexpressing GILZ.

nmol/mg	Citrate	Succinate	Fumarate	Malate [*]	Glutamate [*]	Aspartate [*]	Methionine [*]	Isoleucine [*]	Glycine [*]
Da1	4.3+/- 1.0	9.0+/- 0.4	1.3+/- 0.2	14.5+/- 1.3	148.2+/- 8.9	134.4+/- 16.4	4.5+/- 0.9	14.5+/- 1.4	82.4+/- 7.3
Da1/GILZ	4.2+/- 0.5	9.3+/- 0.8	1.1+/- 0.2	11.4+/- 1.4	44.7+/- 9.2	54.9+/- 6.3	11.2+/- 1.3	23.6+/- 3.0	158.4+/- 14.6
nmol/mg	Phenylalanine [*]	Tyrosine [*]	Tryptophan [*]	Valine [*]	Alanine [*]	Choline	PCholine [*]	GPCholine [*]	Glutathione [*]
Da1	10.0+/- 0.8	9.7+/- 0.6	2.2+/- 0.3	12.0+/- 1.0	289.0+/- 23.8	3.6+/- 0.4	42.4+/- 4.2	7.0+/- 0.9	38.2+/- 5.8
Da1/GILZ	16.9+/- 1.5	18.6+/- 2.2	4.0+/- 0.3	22.5+/- 3.0	106.5+/- 23.9	3.9+/- 0.5	79.8+/- 10.6	12.8+/- 1.4	46.6+/- 4.8
nmol/mg	Leucine [*]			Glucose		Lactate [*]			
Da1	15.7+/- 1.2			20.4+/- 7.4		153.3+/- 25			
Da1/GILZ	27.7+/- 3.5			23+/- 15		195+/- 10.1			

Results are means +/- SD of two independent experiments in triplicates.

^{*} P < 0.05 vs. Da1.

cells retained a proliferative advantage over control cells (Fig. 4A middle and lower panel) suggesting that GILZ-overexpressing cells exhibit a superior metabolic adaptability to metabolic stress conditions. To demonstrate whether the proliferative effect of GILZ could depend on its effect on mitochondrial OXPHOS, we used the well-characterized A375 p0 cells, devoid of mitochondrial DNA, transiently transfected with GILZ cDNA (André et al., 2016). Whereas overexpression of GILZ significantly increased A375 cell proliferation (Fig. 4B, left), we did not observe a higher proliferation rate in GILZ-overexpressing A375 p0 cells, which were respiratory-deficient (André et al., 2016), compared to A375 p0 cells (Fig. 4B, right). These data suggest that GILZ supports cancer cell proliferation even under metabolic stress conditions through its effect on mitochondrial metabolism.

3.5. GILZ-overexpressing cells display high sensitivity to cell death induced by mitochondrial targeted pro-oxidant drugs

Finally, we sought to determine the potential therapeutic benefits of GILZ overexpression in leukemia cells. Elesclomol, a clinical trial pro-oxidative drug, induces cancer cell death through mitochondrial targeting (Blackman et al., 2012). Thus, we hypothesized that the mitochondrial OXPHOS metabolism promoted by GILZ would render these cells more sensitive to cell death induced by elesclomol. No significant differential production of ROS was observed among untreated cells lines. However, in agreement with our previous results (Blackman et al., 2012; Kluza et al., 2012), elesclomol induced a dose-dependent increase in mitochondrial ROS generation and death in leukemic cells (Fig. 5A–C). ROS-dependent cytotoxicity induced by elesclomol or menadione, a mitochondrial ROS inducer, was higher in GILZ-overexpressing cell lines than in parental cells (Fig. 5A, B and D), consistent with the increased mitochondrial metabolism observed in GILZ-overexpressing cells (Fig. 1). These results indicate that GILZ exacerbates the anti-cancer effects of mitochondrial pro-oxidant drugs.

4. Discussion

Impaired mitochondrial activity has long been suspected to impact the multi-step process of neoplastic evolution forcing cancer cells to use predominantly the aerobic glycolysis to produce cellular energy and macromolecules even in the presence of sufficient oxygen (Marchetti et al., 2014, 2015). More recent studies, however, demonstrated that mitochondria can be reactivated in cancer and as such the mitochondrial activity is fully involved in the metabolic reprogramming required for cancer development.

In this study, we characterized the metabolism state in several types of cancer cells overexpressing GILZ using functional metabolic assays. We determined that GILZ-overexpressing cells

displayed a metabolic phenotype characterized by high glucose uptake and high levels of mitochondrial OXPHOS. Consequently, GILZ-dependent mitochondrial activity generates energy and biosynthetic materials (amino-acids and lipids) used to sustain cancer cell proliferation. This is further supported by the findings that the level of GILZ expression in biopsied specimens from patients with epithelial ovarian cancer is correlated to cancer cell proliferation (Redjimi et al., 2009). Interestingly, the proliferative advantage of GILZ-overexpressing cells is maintained under conditions of glucose or glutamine deprivation, a situation resulting in metabolic stress. In Similarly, we recently showed that GILZ protects cancer cells against ER stress, via mitochondrial dependent pathways (André et al., 2016). Accordingly, endogenous GILZ also protects T lymphocytes from IL-2 deprivation (Pépin et al., 2016). GILZ expression is highly regulated by both endogenous and exogenous glucocorticoids (Ayyar et al., 2015). Altogether, this is compatible with a model where GILZ coordinates the protective response of endogenous and exogenous glucocorticoids to stress stimuli.

It was well established that cancer cell mitochondria have the ability to use different carbon sources depending on their availability. In cancer cells, mitochondrial metabolism is partially independent from the oxidation of glucose-derived pyruvate resulting from the decoupling between glycolysis and mitochondrial oxidation. Alternative substrates such as glutamine or fatty acids (FA) are also oxidized by mitochondria. Importantly, our findings indicate that in addition to the increase in glucose uptake, GILZ may favor the mitochondrial capacity to switch between fuels (glutamine and FA), a compensatory state able to maintain high metabolic status under stress. Although we did not observe changes in the expression of glycolytic proteins, we cannot entirely rule out the possibility of an increased activity of some glycolytic enzymes including Phosphofructokinase-1 (PFK-1), a rate-limiting enzyme that possesses complex allosteric regulations (Moreno-Sánchez et al., 2010).

The putative mechanisms underlying high mitochondrial OXPHOS in GILZ-overexpressing cells remain elusive. Mitochondrial reprogramming can be seen as an adaptive process rendering cells resistant to cell death induced by anticancer drugs including genotoxic or oncogenic kinase inhibitors such as BRAFV600E inhibitors. The mitochondrial signature of cancer cells relies predominantly on the activation of the peroxisome-proliferator-activated receptor coactivator-1α (PGC-1α), a major transcriptional factor for mitochondrial biogenesis. In sharp contrast to the induction of mitochondrial metabolism by oncogenic kinase inhibitors (Haq et al., 2013; Corazao Rozas et al., 2016), GILZ-mediated mitochondrial activity is not associated with mitochondrial biogenesis (Fig. 2). Our group reported that GILZ is a crucial inhibitor of mTORC-2 (the mammalian target of rapamycin complex-2) by binding to its subunit, Rictor (Joha et al., 2012). It is noteworthy

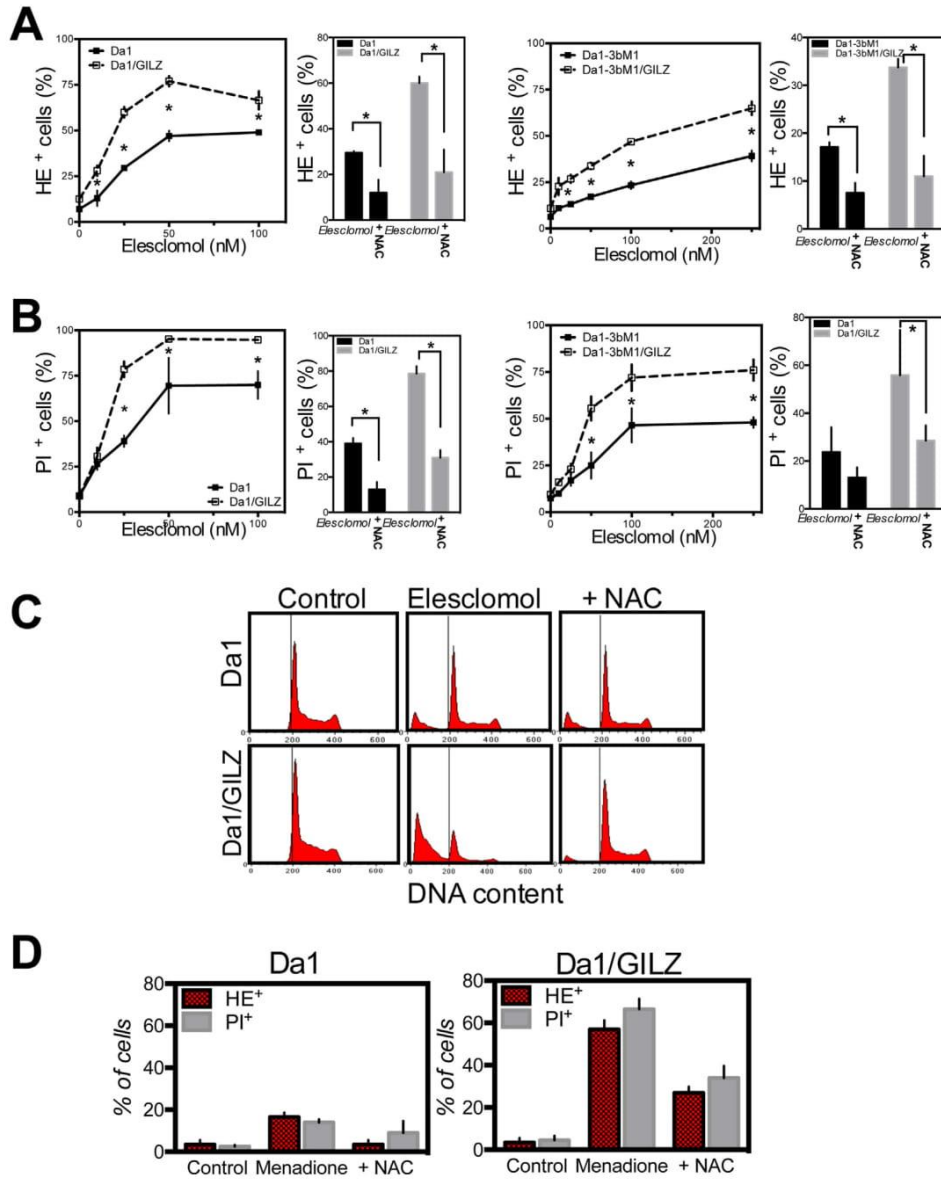


Fig. 5. Overexpression of GILZ favors oxidative cell death Dose-response of ROS production (HE staining) (A) or cell death (PI staining) (B) in indicated cells exposed to increasing concentrations of elesclomol for 24 h (mean \pm SD, n = 3, *p < 0.05). Alternatively, cells were treated with elesclomol for 24 h with or without pre-incubation with 10 mM N-Acetyl Cysteine (NAC) for 12 h before HE staining (A) or PI staining (B) (mean \pm SD, n = 3, *p < 0.05); (C) Cell cycle profile of cells exposed to 25 nM elesclomol with or without 10 mM NAC. Representative histograms were obtained by flow cytometry; (D) ROS production (HE staining) and cell death (PI staining) in cells exposed to 100 μ M menadione with/without 10 mM NAC for 12 h (mean \pm SD, n = 3).

that the mTOR pathway plays a significant role in mitochondrial metabolism. Indeed, Rictor knockdown significantly stimulates mitochondrial OXPHOS (Schieke et al., 2006) defining mTORC2 as a negative regulator of mitochondrial respiration. Upon activation, mTORC2 is localized to contact sites between ER and mitochondria *a.k.a.* mitochondria-associated ER membrane (MAM) (Betz et al., 2013). Rictor-deficient cells (Betz et al., 2013) as well as MAM-deficient cells (de Brito and Scorrano, 2008) showed elevated calcium flux from ER to mitochondria. It is also established that ER-mitochondria Ca²⁺ transfer amplifies mitochondrial OXPHOS (Corazao Rozas et al., 2016) since crucial mitochondrial enzymes require calcium as a cofactor. Thus, one might suggest that GILZ, through inhibition of mTORC2 at the MAM, could increase

mitochondrial calcium uptake and thereby boost mitochondrial function. Further studies are needed to test this hypothesis.

Finally, we unveiled the potential therapeutic opportunities offered by the mitochondrial activity mediated by GILZ. Elesclomol, one of the first mitochondria-specific drug evaluated in clinical trials, displayed higher ROS-dependent cytotoxicity in GILZ-overexpressing cells (Fig. 5). This is in line with our previous results indicating that the degree of cell death induced by elesclomol was positively correlated to the level of mitochondrial respiration in cancer cells (Blackman et al., 2012; Kluza et al., 2012). Indeed, elesclomol interferes with the electron flow along the electron transport chain to generate high levels of mitochondrial ROS ending in subsequent cell death (Blackman et al., 2012). Likewise,

dichloroacetate, a compound reactivating mitochondrial function, potentiates oxidative cell death induced by elesclomol (Kluza et al., 2012). To improve the feasibility of the clinical translation of this approach, we also tested the combination of elesclomol with the synthetic glucocorticoid, DEX, which is routinely prescribed. Unfortunately, the stimulation of GILZ expression by DEX did not result in a significant increase in the percentage of elesclomol-induced cell death (not shown) suggesting that DEX also interferes with ROS-mediated cell death in a GILZ-independent manner. Other combination therapies to increase GILZ expression in association with mitochondrial-targeted drugs might prove to be a valuable synthetic lethal approach for achieving desirable therapeutic outcomes.

5. Conclusion

Regardless of these considerations, our study highlights that GILZ is a key driver of mitochondrial metabolism in cancer cells involved in the adaptive responses to stress stimuli and could be potentially useful for therapeutic interventions.

Acknowledgements

This work received a financial support from INSERM, UNIVERSITE DE LILLE, SIRICConcLille (to PM), Ligue Contre le Cancer (Comité du Nord & Comité de l'Aisne) (to PM), and a special financial support from the Association pour l'Etude des Anomalies Congénitales Neurodev of Pr. B. Poupard (to PM). FA is recipient of the n°2013-01 fellowship from the CHRU Lille-Région Nord-Pas de Calais.

References

- André, F., Corazao Rozas, P., Idziorek, T., Quesnel, B., Kluza, J., Marchetti, P., 2016. GILZ overexpression attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated cell death via the activation of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478, 513–520.
- Ayrolidi, E., Zollo, O., Bastianelli, A., Marchetti, C., Agostini, M., Di Virgilio, R., Riccardi, C., 2007. GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J. Clin. Invest.* 117, 1605–1615.
- Ayyar, V.S., Almon, R.R., Jusko, W.J., DuBois, D.C., 2015. Quantitative tissue-specific dynamics of in vivo GILZ mRNA expression and regulation by endogenous and exogenous glucocorticoids. *Physiol. Rep.* 3.
- Ballot, C., Kluza, J., Martoriati, A., Nyman, U., Formstecher, P., Joseph, B., Bailly, C., Marchetti, P., 2009. Essential role of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by the marine alkaloid Lamellarin D. *Mol. Cancer Ther.* 8, 3307–3317.
- Ballot, C., Kluza, J., Lancel, S., Martoriati, A., Hassoun, S.M., Mortier, L., Vienne, J.-C., Briand, G., Formstecher, P., Bailly, C., Nevriere, R., Marchetti, P., 2010. Inhibition of mitochondrial respiration mediates apoptosis induced by the anti-tumoral alkaloid lamellarin D. *Apoptosis* 15, 769–781.
- Betz, C., Stracka, D., Prescianotto-Baschong, C., Frieden, M., Demaurex, N., Hall, M.N., 2013. mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12526–12534.
- Blackman, R.K., Cheung-Ong, K., Gebbia, M., Proia, D.A., He, S., Kepros, J., Jonneaux, A., Marchetti, P., Kluza, J., Rao, P.E., Wada, Y., Giaever, G., Nislow, C., 2012. Mitochondrial electron transport is the cellular target of the oncology drug elesclomol. *PLoS One* 7, e29798.
- Corazao Rozas, P., Guerreschi, P., Jendoubi, M., André, F., Jonneaux, A., Scalbert, C., Garçon, G., Malet-Martino, M., Balaýssac, S., Rocchi, S., Savina, A., Formstecher, P., Mortier, L., Kluza, J., Marchetti, P., 2013. Mitochondrial oxidative stress is the Achilles' heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget* 4, 1986–1998.
- Corazao Rozas, P., Guerreschi, P., André, F., Gabert, P.-E., Lancel, S., Dekiok, S., Fontaine, D., Tardivel, M., Savina, A., Quesnel, B., Mortier, L., Marchetti, P., Kluza, J., 2016. Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors. *Oncotarget* 7, 39473–39485.
- Cruz, T., Lalande, J., Balaýssac, S., Kluza, J., Gilard, V., n.d., Normalization and scaling effects on H NMR spectra in a metabolomics analysis of leukemic cells. *Future Med.*
- D'Adamo, F., Zollo, O., Moraca, R., Ayrolidi, E., Bruscoli, S., Bartoli, A., Cannarile, L., Migliorati, G., Riccardi, C., 1997. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 7, 803–812.
- de Brito, O.M., Scorrano, L., 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605–610.
- Di Marco, B., Massetti, M., Bruscoli, S., Macchiarulo, A., Di Virgilio, R., Velardi, E., Donato, V., Migliorati, G., Riccardi, C., 2007. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-kappaB interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* 35, 517–528.
- Frezza, C., Cipolat, S., Scorrano, L., 2007. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat. Protoc.* 2, 287–295.
- 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., Wargo, J.A., Song, J.S., Fisher, D.E., Arany, Z., Widlund, H.R., 2013. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* 23, 302–315.
- Joha, S., Nuges, A.-L., Hetuin, D., Berthon, C., Dezitter, X., Dauphin, V., Mahon, F.-X., Roche-Lestienne, C., Preudhomme, C., Quesnel, B., Idziorek, T., 2012. GILZ inhibits the mTORC2/AKT pathway in BCR-ABL(+) cells. *Oncogene* 31, 1419–1430.
- Jose, C., Bellance, N., Rossignol, R., 2011. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 552–561.
- Kluza, J., Jendoubi, M., Ballot, C., Dammak, A., Jonneaux, A., Idziorek, T., Joha, S., Dauphin, V., Malet-Martino, M., Balaýssac, S., Maboudou, P., Briand, G., Formstecher, P., Quesnel, B., Marchetti, P., 2011. Exploiting mitochondrial dysfunction for effective elimination of imatinib-resistant leukemic cells. *PLoS One* 6, e21924.
- Kluza, J., Corazao Rozas, P., Touil, Y., Jendoubi, M., Maire, C., Guerreschi, P., Jonneaux, A., Ballot, C., Balaýssac, S., Valable, S., Corroyer-Dulmont, A., Bernaudin, M., Malet-Martino, M., de Lassel, E.M., Maboudou, P., Formstecher, P., Polakowska, R., Mortier, L., Marchetti, P., 2012. Inactivation of the HIF-1 α /PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants. *Cancer Res.* 72, 5035–5047.
- Marchetti, P., Susin, S.A., Decaudin, D., Gamen, S., Castedo, M., Hirsch, T., Zamzami, N., Navai, J., Senik, A., Kroemer, G., 1996. Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cells lacking mitochondrial DNA. *Cancer Res.* 56, 2033–2038.
- Marchetti, P., Guerreschi, P., Kluza, J., Mortier, L., 2014. Metabolic features of melanoma: a gold mine of new therapeutic targets? *Curr. Cancer Drug Targets* 14, 357–370.
- Marchetti, P., Guerreschi, P., Mortier, L., Kluza, J., 2015. Integration of mitochondrial targeting for molecular cancer therapeutics. *Int. J. Cell Biol.* 2015, 283145.
- Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E., Rodríguez-Enríquez, S., Gallardo-Pérez, J.C., Quezada, H., Westerhoff, H.V., 2010. Metabolic control analysis indicates a change of strategy in the treatment of cancer. *Mitochondrion* 10, 626–639.
- Obre, E., Rossignol, R., 2015. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 59, 167–181.
- Pépin, A., Espinasse, M.-A., Latré de Laté, P., Szely, N., Pallardy, M., Biola-Vidamment, A., 2016. TSC-22 promotes interleukin-2-deprivation induced apoptosis in T-lymphocytes. *J. Cell Biochem.* 117, 1855–1868.
- Pavlova, N.N., Thompson, C.B., 2016. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.* 23, 27–47.
- Redjimi, N., Gaudin, F., Touboul, C., Emilie, D., Pallardy, M., Biola-Vidamment, A., Fernandez, H., Prévot, S., Balabanian, K., Machelon, V., 2009. Identification of glucocorticoid-induced leucine zipper as a key regulator of tumor cell proliferation in epithelial ovarian cancer. *Mol. Cancer* 8, 83.
- Ronchetti, S., Migliorati, G., Riccardi, C., 2015. GILZ as a mediator of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *Front. Endocrinol.* 6.
- Samudio, I., Harmancey, R., Fiegl, M., Kantarjian, H., Konopleva, M., Korchin, B., Kaluarachchi, K., Borrmann, W., Duvvuri, S., Taegtmeier, H., Andreeff, M., 2010. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J. Clin. Invest.* 120, 142–156.
- Schieke, S.M., Phillips, D., Mccooy, J.P., Aponte, A.M., Shen, R.-F., Balaban, R.S., Finkel, T., 2006. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J. Biol. Chem.* 281, 27643–27652.
- Tynan, S.H., Lundeen, S.G., Allan, G.F., 2004. Cell type-specific bidirectional regulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) gene by estrogen. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 91, 225–239.
- Wang, Y., Ma, Y.-Y., Song, X.-L., Cai, H.-Y., Chen, J.-C., Song, L.-N., Yang, R., Lu, J., 2012. Upregulations of glucocorticoid-induced leucine zipper by hypoxia and glucocorticoid inhibit proinflammatory cytokines under hypoxic conditions in macrophages. *J. Immunol.* 188, 222–229.
- Zu, X.L., Guppy, M., 2004. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 459–465.



RÉSULTATS ARTICLE 2

RÉSUMÉ ARTICLE 2

« Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors »

Chez les patients atteints de mélanome présentant la mutation BRAF^{V600E}, le traitement aux inhibiteurs de BRAF (BRAFi) tel que le Vemurafenib s'est avéré efficace pour retarder la progression tumorale. Cependant, après plusieurs mois de traitements, la majorité des patients développent une résistance à cet inhibiteur et finissent par rechuter et développer à nouveau la maladie.

Dans ces cellules, la présence de l'oncogène BRAF^{V600E} permet l'activation constitutive de la voie MAPK, qui participe à la stimulation de l'activité glycolytique et à l'inhibition de la phosphorylation oxydative mitochondriale, et ce, même en normoxie. Dans des travaux précédents, notre laboratoire a montré dans des lignées de mélanome que le métabolisme de ces cellules était régulé par HIF-1. Ce facteur de transcription participe au remodelage du métabolisme, puisque l'inhibition de HIF-1 induit une inhibition de l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase 3 (PDK3). Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de la PDK3 par le dichloroacétate (DCA) permet d'augmenter la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS) et la production de ROS mitochondriaux, et l'utilisation de molécules pro-oxydantes tel que l'elesclomol permet d'induire une majoration de la production de ROS et de cibler les cellules de mélanome sensibles ou résistantes au Vemurafenib (Kluza J. et al., 2011). Nos différents travaux ont donc montré que le stress oxydatif mitochondrial représentait le talon d'Achille des cellules de mélanome devenues résistantes aux BRAFi (Corazao-Rozas P. et al., 2013).

Par la présente étude, nous avons montré que ces cellules remanient leur métabolisme et accumulent le facteur NRF2 afin d'induire une réponse anti-oxydante pour se protéger contre le stress oxydatif induit par les BRAFi. En effet, les cellules de mélanome résistantes présentent une dépendance au métabolisme OXPHOS et une addiction à la glutamine. Les cellules de mélanome résistantes présentent d'une part une augmentation de la captation du pyruvate au sein de leurs mitochondries, et d'autre part une augmentation de la formation *de novo* du glutamate afin d'augmenter le pool de glutathion. Par conséquent, l'utilisation du PEITC, un composé permettant une déplétion du glutathion, permet de resensibiliser les cellules de mélanome résistantes aux BRAFi au traitement au Vemurafenib.

ARTICLE

Open Access

Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors

Raeeka Khamari¹, Anne Trinh¹, Pierre Elliott Gabert¹, Paola Corazao-Rozas¹, Samuel Riveros-Cruz¹, Stephane Balayssac², Myriam Malet-Martino², Salim Dekiouk¹, Marie Joncquel Chevalier Curt³, Patrice Maboudou⁴, Guillaume Garçon⁵, Laura Ravasi⁶, Pierre Guerreschi¹, Laurent Mortier⁷, Bruno Quesnel^{1,8}, Philippe Marchetti^{1,9} and Jerome Kluza¹

Abstract

Targeted therapies as BRAF and MEK inhibitor combination have been approved as first-line treatment for BRAF-mutant melanoma. However, disease progression occurs in most of the patients within few months of therapy. Metabolic adaptations have been described in the context of acquired resistance to BRAF inhibitors (BRAFi). BRAFi-resistant melanomas are characterized by an increase of mitochondrial oxidative phosphorylation and are more prone to cell death induced by mitochondrial-targeting drugs. BRAFi-resistant melanomas also exhibit an enhancement of oxidative stress due to mitochondrial oxygen consumption increase. To understand the mechanisms responsible for survival of BRAFi-resistant melanoma cells in the context of oxidative stress, we have established a preclinical murine model that accurately recapitulates *in vivo* the acquisition of resistance to MAPK inhibitors including several BRAF or MEK inhibitors alone and in combination. Using mice model and melanoma cell lines generated from mice tumors, we have confirmed that the acquisition of resistance is associated with an increase in mitochondrial oxidative phosphorylation as well as the importance of glutamine metabolism. Moreover, we have demonstrated that BRAFi-resistant melanoma can adapt mitochondrial metabolism to support glucose-derived glutamate synthesis leading to increase in glutathione content. Besides, BRAFi-resistant melanoma exhibits a strong activation of NRF-2 pathway leading to increase in the pentose phosphate pathway, which is involved in the regeneration of reduced glutathione, and to increase in xCT expression, a component of the xc—amino acid transporter essential for the uptake of cystine required for intracellular glutathione synthesis. All these metabolic modifications sustain glutathione level and contribute to the intracellular redox balance to allow survival of BRAFi-resistant melanoma cells.

Introduction

Activating V600E/K mutations in the BRAF oncogene are found in over half of the patients with metastatic melanoma. These mutations confer constitutive activation

of BRAF kinase and drive oncogenic signaling through MAPK activation. Targeted therapies as BRAF and MEK inhibitors combination (e.g., the BRAF inhibitors vemurafenib and the MEK inhibitor trametinib) have revolutionized the treatment of patients leading to increase progression-free survival and overall survival. Unfortunately, disease progression occurs after a median of few months and in 80% of patients after 3 years of therapies¹. Immune checkpoint inhibitors (as PD-L1/PD-1 or CTLA-4 monoclonal antibodies) have also shown activity in

Correspondence: Jerome Kluza (jerome.kluza@inserm.fr)

¹Univ. Lille, INSERM, UMR-S1172 Jean Pierre Aubert Research Centre 59045 Lille, France

²Laboratoire SPCMB UMR CNRS 5068 Université Paul Sabatier 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France

Full list of author information is available at the end of the article

Raeeka Khamari, Anne Trinh contributed equally to this work

Jerome Kluza, Philippe Marchetti jointly supervised this work

Edited by A. Finazzi-Agrò

© The Author(s) 2018



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

some patients with BRAFV600E-mutant melanoma, but most of the patients progressed on this treatment. Clinical trials are actually evaluating combination of both MAPK-kinase inhibitors and PD-1/PD-L1 antagonists².

In the context of MAPK constitutive activation, mutant BRAF stimulates glycolytic activity and inhibits mitochondrial oxidative phosphorylation³. BRAF inhibition causes a decrease in ERK activation resulting in G1 phase cell cycle arrest and inducing endoplasmic reticulum (ER)-stress-mediated cell death^{4–6}. We and others have shown that MAPK inhibitors reverse also the metabolic phenotype by decreasing glycolytic activity and increasing mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) of BRAF-driven melanoma cells^{5,7,8}. These modifications of mitochondrial metabolism following MAPK inhibition could be considered as an adaptive response to compensate drug-induced glycolytic inhibition. In agreement with this observation, drugs repressing directly or indirectly mitochondrial oxidative metabolism favored cell death under BRAFi therapy^{5,9–13}.

Several mechanisms of acquired resistance to BRAFi have been identified, mostly mediated by MAPK pathway reactivation including mutations in NRAS and MEK oncogenes, BRAFV600E splice variants, and BRAF amplification or activation of alternative tumorigenic pathway. We and others have also shown that vemurafenib-resistant melanoma cells maintain an increase of mitochondrial oxidative phosphorylation even in absence of BRAFi^{9,10}. Marais and coll have shown BRAFi that resistant melanoma cells support mitochondrial respiration and ATP supply by sustaining TCA cycle metabolites levels using glutaminolysis¹⁰. Oxygen consumption increase leads to mitochondrial ROS overproduction through electron transfer chain and to enhancement of oxidative stress. As a weakness in spite of overall strength, we have demonstrated that BRAFi-resistant cells with increased endogenous ROS are more sensitive to cell death upon exposure to mitochondrial pro-oxidative agents⁹.

Here, we asked the question how BRAFi-resistant melanoma cells use metabolism to cope with ROS production and therefore to survive under oxidative stress. To understand the mechanisms leading to BRAFi-resistant melanoma cells survival in this context, we have generated mouse models bearing human BRAFV600E melanoma cells that mimic clinical relapse and acquired resistance to BRAF inhibitors.

Results

To generate in vivo melanoma model resistant to BRAFi, SCID mice were engrafted with A375 melanoma cells (Fig. 1a). When tumors reached 150 mm³, mice were divided into two groups. One group ($n = 20$) was treated with vemurafenib (300 mg kg⁻¹, bid) and the other one (n

= 5) was treated with vehicle only (PBS). In vemurafenib-treated mice, tumors have drastically reduced until to be undetectable at 30 days post treatment (Fig. 1b). At the opposite, tumors have exponentially increased in vehicle-treated mice. As observed in patients who relapsed after treatment, cancer cells are finally able to escape to anti-BRAF therapy and tumors have re-initiated growth in two mice. Then, mice have been killed and cancer cells have been isolated from tumors to generate three cell lines: A375-v and A375RIV1/A375RIV2 from vehicle-treated mice and vemurafenib-treated mice, respectively. As expected, clonogenic assays confirm that A375RIV1 and A375RIV2 cell lines were more resistant to vemurafenib than A375 or A375-v (Fig. 1c). To confirm the behavior of these cells in vivo, cell lines were engrafted in SCID mice and tumor volumes were periodically measured. As seen in Fig. 1d, A375 and A375-v tumors exhibited the same growth rate while A375RIV1 volume increased faster. Moreover, unlike A375 or A375-v engrafted mice, macroscopic and histological lung analysis showed the presence of many metastases in A375RIV1-engrafted mice indicating a more aggressive phenotype (Fig. 1e, f). Finally, A375RIV1 cell lines were also resistant to other BRAFi (dabrafenib) and MEK inhibitors (cobimetinib and trametinib) alone or in combination (Fig. 1g). Thus, we generated in vivo models for relapsed melanoma cells, which mimic the clinical process of melanoma in humans treated with BRAFi.

In previous work, we and others have observed an increase of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) in melanoma cell lines resistant to BRAFi^{9,10}. In agreement with our previous results, tumor biopsies from A375RIV1-engrafted mice also exhibited an increase in oxygen consumption compared to those from A375-v or A375-engrafted mice (Fig. 2a). Increase in OXPHOS activity was not associated with modification of mitochondrial content as judged by mtDNA quantification in resistant cells (Fig. 2b). Because the pyruvate dehydrogenase complex is a key modulator of mitochondrial activity through pyruvate oxidation in melanoma¹⁴, we studied its regulation by specific kinases, which results in inhibitory phosphorylation. No differences in the level of PDH phosphorylation at Ser293 and in PDK1/PDK3 expression were seen between A375-v and A375RIV1 (Fig. 2c). Moreover, the PDK inhibitor, DCA, increased OXPHOS to the same extent in both cell lines (Fig. 2c), suggesting that PDK/PDH axis per se cannot explain increased mitochondrial activity observed in resistant melanoma. Moreover, isolated mitochondria from A375RIV1 or A375-v tumors exhibited similar oxygen consumption rates regardless of the substrates (Fig. 2d). So we hypothesized that increase in OXPHOS found in melanoma cells resistant to BRAFi could be consecutive to glutamine oxidation as previously described by Marais

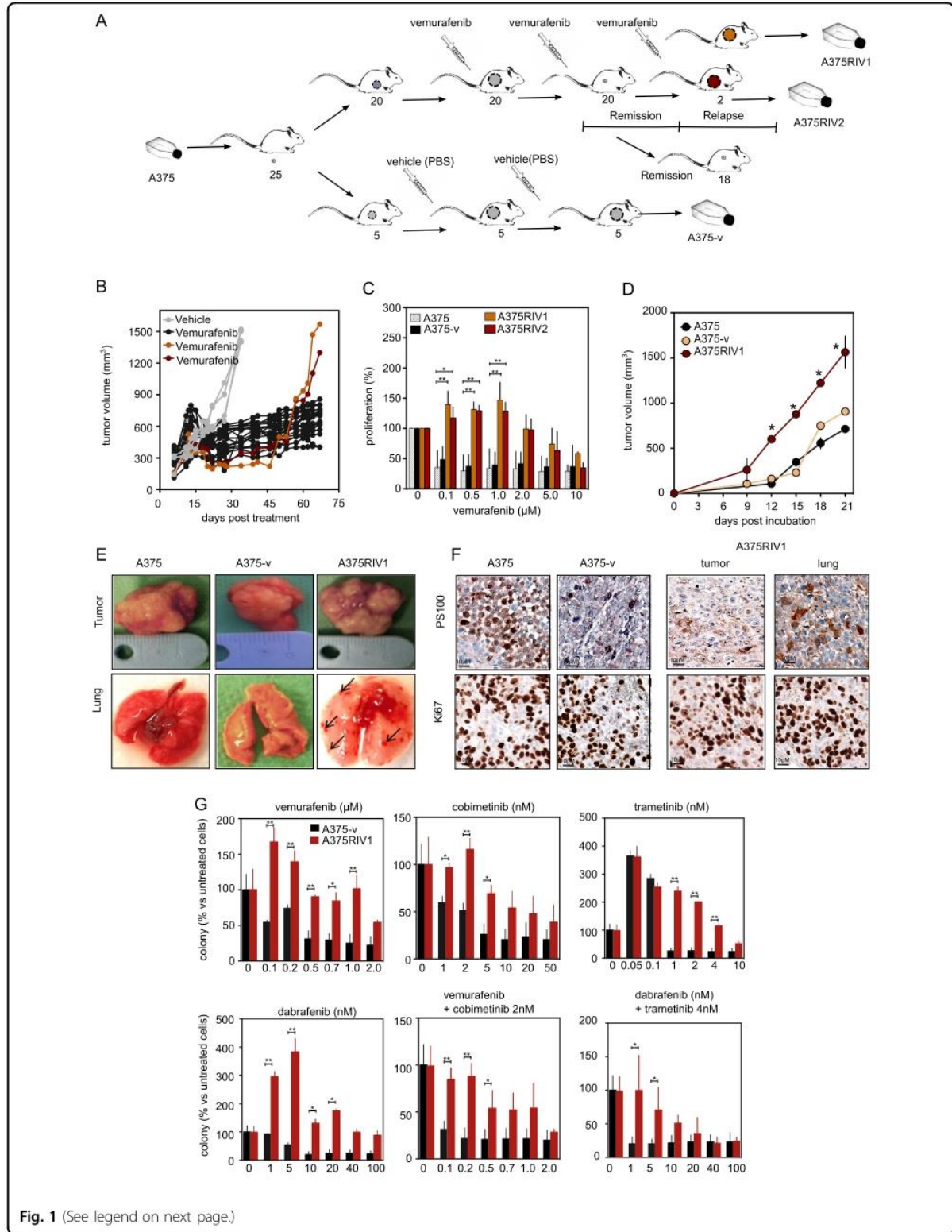


Fig. 1 (See legend on next page.)

(see figure on previous page)

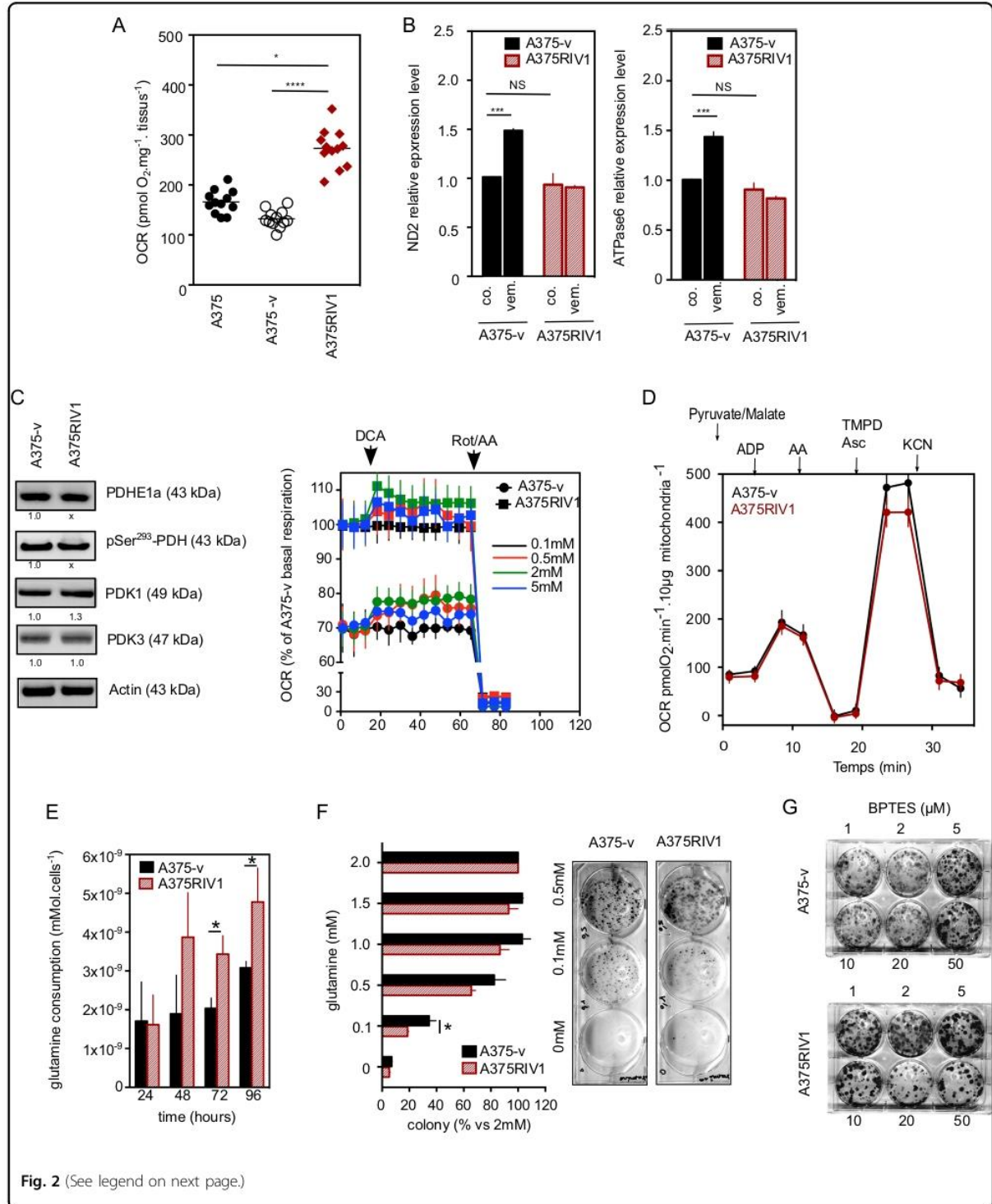
Fig. 1 Conception and characterization of MAPK-resistant BRAFV600E melanoma model from SCID mice. **a** Summary of the experimental procedure used to generate melanoma cell lines used in this study. Briefly, 25 SCID mice have been inoculated with A375 melanoma cells. Five mice were treated with vehicle only and killed when tumors have reached 1500 mm³. A375-v cells have been obtained after tumor dissociation from one of these tumors. Twenty other mice were treated with vemurafenib leading to a rapid tumor shrinkage. Forty days after the beginning of the treatment, two mice have exhibited tumor progression under vemurafenib therapy. Tumors have been extracted and have been dissociated to generate A375RIV1 and A375RIV2 cell lines. **b** Tumor progression of A375-injected mice treated with vehicle only ($n = 5$) or with vemurafenib as indicated in materials and method. **c** Proliferation of A375, A375-v, A375RIV1, and A375RIV2 cell lines exposed in vitro to vemurafenib at the indicated concentration for 72 h. The values represent the mean \pm SD of three independent experiments. Statistical analyses were performed by two-way ANOVA with a 95% interval of confidence followed by Bonferroni's post-test. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. **d** Tumor progression of A375, A375-v, and A375RIV1-injected mice (mean \pm SD; $n = 5$, statistical analyses were performed compared to A375 by two-way ANOVA with a 95% interval of confidence followed by Bonferroni's post-test. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$). **e** Representative macroscopic views illustrating lungs and primary tumors in A375, A375-v, and A375RIV1-injected mice. Arrows indicate metastasis. **f** Sections from the primary tumors of A375, A375-v, and A375RIV1-injected mice or from lung metastasis of A375RIV1-injected mice. Samples were stained with PS100 to confirm immuno-histological profile of melanoma or with Ki67 antibody to assess proliferation. **g** Colony-forming ability of A375-v and A375RIV1 treated with indicated doses of vemurafenib, cobimetinib, trametinib, dabrafenib, or combination of vemurafenib/cobimetinib or dabrafenib/trametinib for 7 days. The values represent the mean \pm SD of three independent experiments. Statistical analyses were performed by two-way ANOVA with a 95% interval of confidence followed by Bonferroni's post-test. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$

and coll¹⁰. Indeed, the resistant cells, A375RIV1, consumed more glutamine than their sensitive counterpart, A375-v, and were more sensitive to glutamine withdrawal or glutamine inhibition by BPTES confirming glutamine addiction for proliferation of melanoma cells resistant to BRAFi (Fig. 2e–g). Together, these results confirmed that mitochondrial metabolism is drastically modified in BRAFi-resistant cells. We then examined glucose metabolism in resistant cells (Fig. 3). Prior drug treatment, there was no difference in glucose uptake examined in vivo by PET-Scan (Fig. 3a) between A375-v and A375RIV1 tumors. At the opposite, we have observed in vemurafenib-treated mice a decrease of glucose uptake in A375-v but not in A375RIV1 tumors confirming resistant phenotype. The same results have been also obtained in vitro, confirming that this metabolic behavior is maintained in cell lines (Fig. 3b).

In order to go further, we have measured glycolytic activity in real time by measuring the extracellular acidification rate using the XF24e Seahorse apparatus (Fig. 3c). Interestingly, we observed that basal glycolytic activity is significantly reduced in A375RIV1 cells compared to A375-v. However, after treatment with the ATP-synthase inhibitor, oligomycin A, both cell lines increased glycolytic activity at the level of that of A375rho0⁵, a cell line deficient in OXPHOS, which relies mainly on glycolysis suggesting that glycolytic pathway is not altered in A375RIV1-resistant cells. Moreover, no obvious differences in the expression of key glycolytic enzymes were observed between A375-v and A375RIV1 cells (Fig. 3d). These results suggest that pyruvate derived from glycolysis could be redirected in mitochondria in BRAFi-resistant melanoma cells. In agreement with this hypothesis, A375RIV1 cells were more prone than A375-v to growth inhibition induced by UK5099, a well-known inhibitor of mitochondrial pyruvate carrier (Fig. 3e). This

result suggests that mitochondrial pyruvate metabolism could be important to support anabolism or survival pathway in A375RIV1 cells.

To get further insights into the metabolism of glucose-derived pyruvate, we quantified metabolites by NMR in A375-v and A375RIV1 growing in DMEM medium supplemented with U-¹³C-glucose (Figs. 4a and 5). ¹³C enrichment of nucleotides (XXP) from glucose was significantly higher in A375RIV1 than in A375-v, suggesting a more active pentose phosphate pathway in resistant cells. Conversely, ¹³C incorporation into lactate was decreased in A375RIV1 in agreement with results of Fig. 3c. A375RIV1 exhibited higher ¹³C accumulation of citrate, glutamate, and glutamine indicating an increase of glucose-derived pyruvate to feed TCA cycle. Besides, aspartic acid synthesized from oxaloacetate-derived TCA is decreased suggesting a downregulation of this pathway in favor of glutamate synthesis. Together, these results reveal unexpected metabolic complexity of resistant cells with glutamate synthesized de novo from glucose as prominent characteristic of melanoma resistant to BRAFi. Glutamate is directly utilized in the biosynthesis of glutathione, the major defense against oxidative stress in melanoma. As expected, GSH content was higher in A375RIV1 than in A375-v (Fig. 4b). As positive control, A375-v or A375RIV1 were treated with DL-buthionine-[S, R]-sulfoximine (BSO), a known GSH-depleting agent. To test if glucose-derived glutamate is involved in GSH synthesis, A375-v and A375RIV1 cells were grown in glutamine-free medium supplemented with glucose then GSH content was determined by flow cytometry after progressive depletion in GSH content induced by increasing concentration of *N*-ethyl-maleimide (NEM) (Fig. 4c). Irrespective of NEM concentrations, A375RIV1 maintained higher GSH content than A375-v in glutamine-free glucose medium, suggesting a



(see figure on previous page)

Fig. 2 MAPK-resistant melanoma exhibits OXPHOS dependency and glutamine addiction. **a** Oxygen consumption rate (OCR pmol O₂/min/mg tissues) from tumor biopsy obtained in A375, A375-v, and A375RIV1-injected mice (mean ± SD; *n* = 12, statistical analysis was performed by one-way ANOVA with a 95% interval of confidence followed by Bonferroni's post-test. **P* < 0.05 and ****P* < 0.005). **b** Analysis of relative mitochondrial DNA copy number in A375-v or A375RIV1 tumor biopsy by assessment of mtDNA-encoded ND2 RNA (left panel) or ATPase6 RNA. The transcripts level in each sample was normalized to that of ATPSynthB RNA. Mean ± SD; *n* = 3, statistical analyses were performed by two-way ANOVA with a 95% interval of confidence followed by Bonferroni's post-test. ****P* < 0.005). **c** Left panel: oxygen consumption rate (OCR pmol/min/20 000 cells) in A375-v or A375RIV1 cells. PDK inhibitor DCA (0.1, 0.5, 2, or 5 mM) has been injected when indicated (black arrow); right panel: immunoblotting of pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha (PDHE1a), phospho-serine 293 of PDHE1a, pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), and pyruvate dehydrogenase kinase 3 (PDK3) in A375-v cells compared to A375RIV1. Actin served as loading control. **d** Oxygen consumption rate (OCR pmol/min/10 μg mitochondria) of isolated mitochondria obtained from tumor of A375-v and A375RIV1-injected mice. Mitochondria have been incubated in a pyruvate/malate buffer and the following molecules have been injected when indicated: adenosine 5'-diphosphate sodium (ADP), antimycin A (AA), tetramethyl-p-phenylenediamine/ascorbate (TMPD/Asc), and potassium cyanide (KCN) (*n* = 3). **e** Glutamine consumption of A375-v or A375RIV1 cell lines growing for 24, 48, 72, or 96 h in full medium (mean ± SD; *n* = 3, statistical analyses were performed by two-way ANOVA with a 95% interval of confidence followed by Bonferroni's post-test. **P* < 0.05). **f** Colony-forming ability of A375-v and A375RIV1 growing in medium containing the indicated glutamine concentration for 7 days (mean ± SD; *n* = 3, statistical analyses were performed by two-way ANOVA with a 95% interval of confidence followed by Bonferroni's post-test. **P* < 0.05). **g** Colony-forming ability of A375-v and A375RIV1 exposed to glutaminase (GLS) inhibitor BPTES in full medium for 7 days. Pictures are representative of three independent experiments

predominant role of glucose-derived glutamate in GSH synthesis in BRAFi-resistant cells. GSH content seems to be important for A375RIV1 survival cells because PEITC¹⁵, an inhibitor of glutathione S-transferase, decreases vemurafenib-acquired resistance of A375RIV1 (Fig. 4d). Another way in which glutamate participates to glutathione biosynthesis is indirectly through facilitating the uptake of cystine via the xCT transporter, which is coupled to the efflux of glutamate. Using ¹²C-glucose, we have measured AA concentration in the medium (Fig. 4e). In agreement with Fig. 2e, we found a more important consumption of glutamine in the medium of A375RIV1 compared to A375-v. We have also measured an important increase of glutamate release in the medium of A375RIV1 and important consumption of cystine (Fig. 4e). This metabolic behavior seems to be important for A375RIV1 cells because sulfasalazine, an inhibitor of X_C⁻ glutamate/cystine exchange, inhibited preferentially the growth of A375RIV1 compared to A375-v (Fig. 4f). Together these results indicate that resistant cells use glucose-derived glutamate to support glutathione synthesis through several complementary pathways.

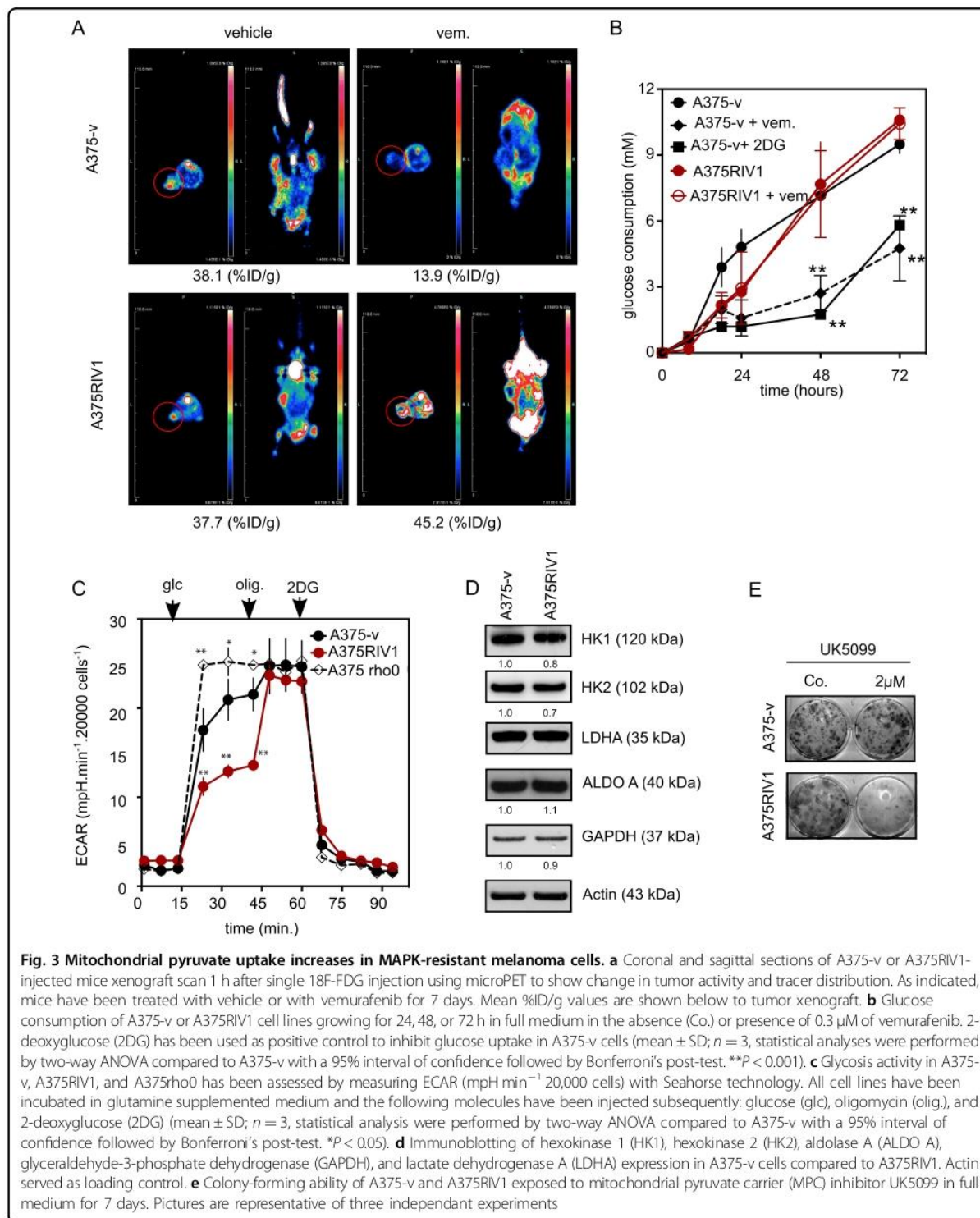
Also, consistent with this model is the observation that A375RIV1 overexpressed many antioxidant genes including those involved in GSH synthesis as xCT and GCLM, in GSH regeneration as glutathione peroxidase GPX1 and GPX2 and in NADPH production (Transaldolase A and Transketolase) (Fig. 6a). Since the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) is a transcription factor that regulates the expression of antioxidant response genes including those upregulated in A375RIV1 (Fig. 6a), we have first determined the nuclear levels of NRF2 (i.e., the active form) in both cell lines by immunofluorescence and western blot (Fig. 6b, c). As a positive control, A375-v or A375RIV1 were treated with BSO, known to induce NRF2 activation¹⁶. A375RIV1 exhibited

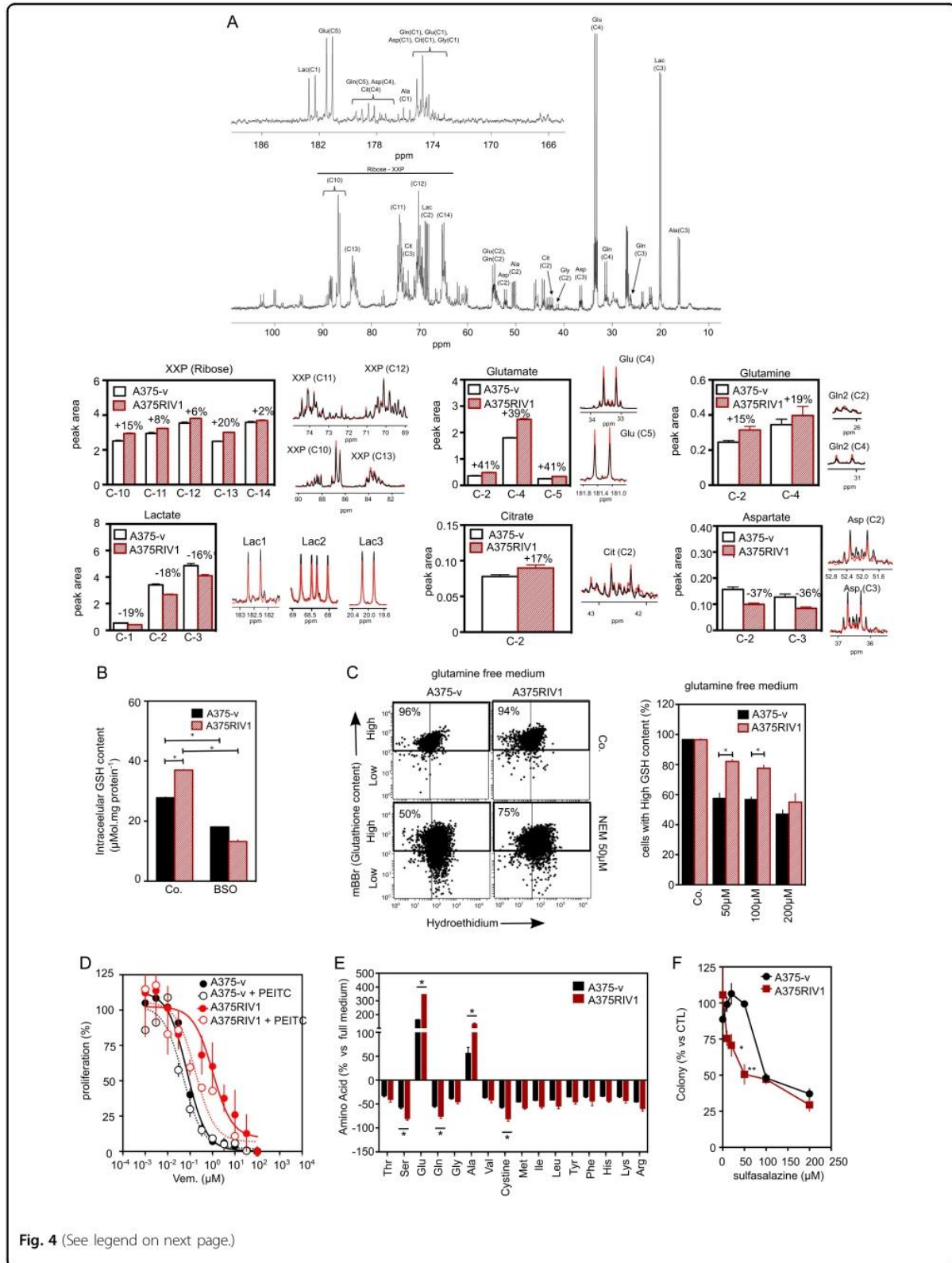
higher expression levels of NRF2 in the total cell lysates as well as in the nuclear fraction than A375-v. In addition, the knockdown of NRF2 by siRNA significantly decreased the protein expression of the NRF2 targets: xCT, XMOX1, TKT, and TALDO (Fig. 6c) as well as it increased ROS production in A375RIV1 (Fig. 6d). These results demonstrate that NRF2 contributes to support the antioxidant defense in BRAFi-resistant melanoma. Interestingly, NRF2 silencing partially reversed vemurafenib resistance of A375RIV1 cells as judged by clonogenic assay in Fig. 6e. In conclusion, all these results demonstrated that glucose-derived glutamate contributes to increase the antioxidant defense in BRAFi-resistant melanoma cells in an NRF2-dependent manner, contributing to the survival to anti-BRAF therapy.

Discussion

BRAFi-resistant melanoma cells are characterized by an increase in mitochondrial oxidative phosphorylation, which enhances the level of oxidative stress and renders them more sensitive to cell death induced by pro-oxidative drugs⁵. Here, we demonstrate that melanoma cells resistant to MAPK inhibitors rewire glucose metabolism and activate integrated NRF2-dependent antioxidant responses for protection against oxidative stress (Fig. 5).

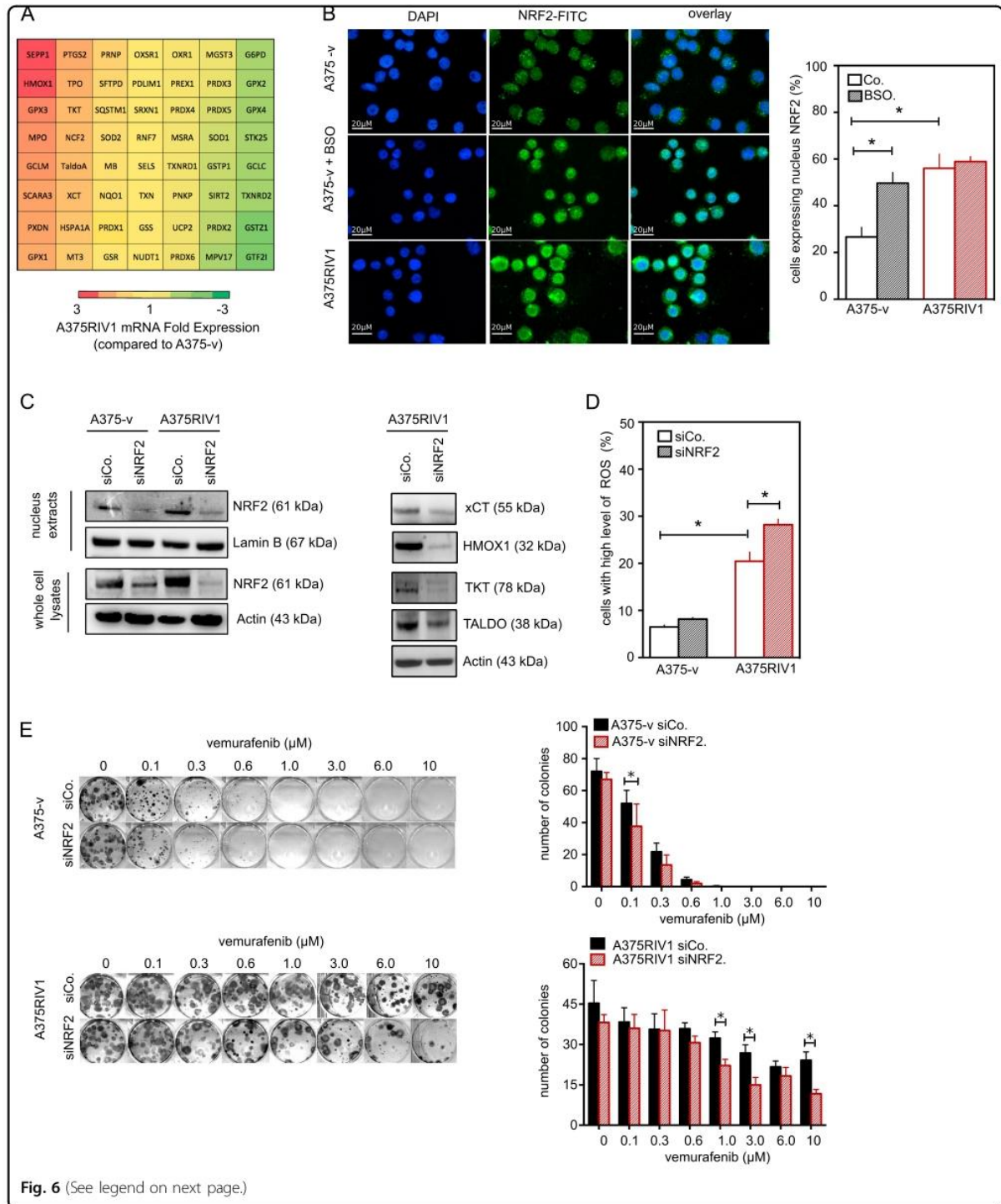
First, we established in vivo preclinical murine models that accurately recapitulate the acquisition of resistance to the BRAFi, vemurafenib. To model the emergence of vemurafenib resistance, we generated BRAF-mutated A375 cells resistant to vemurafenib (A375RIV1) using an in vivo long-term vemurafenib-treated-xenograft model (Fig. 1). As observed in patients¹⁷, mice-derived A375RIV1 have also acquired cross resistance to numerous MAPK inhibitors including the compounds dabrafenib, trametinib, cobimetinib alone, and in combination.





glutamate release, we found that resistant melanoma cells overexpressed xCT (*a.k.a.* SLC7a11), a component of cysteine/glutamate exchange transport (X_C^- system)

mediating cysteine entry into cell in exchange for glutamate. The activity of system X_C^- contributes to the maintenance of intracellular GSH levels²⁰. Thus, the



overexpression of xCT observed in BRAFi-resistant melanoma is in agreement with their higher GSH content.

Because xCT expression is controlled by the transcription factor NRF2 in various cancer cell lines²¹, we decided to measure expression levels of NRF2. In physiological conditions, NRF2 binds to its repressor protein Keap1 (Kelch ECH associating protein) and is subjected to continuous ubiquitination and proteosomal degradation. Under oxidative stress, conformation of Keap1 is modified leading to NRF2 release, which translocates to the nucleus then after heterodimerization with the Maf proteins bind to the antioxidant response element (ARE) of target genes. We demonstrated that A375 melanoma cells exhibited a significant level of nuclear NRF2 accumulation. This observation is in agreement with the fact that BRAF oncogenes activate the NRF2 antioxidant program²². Interestingly, NRF2 accumulation was even higher in BRAFi-resistant melanoma cells (Fig. 6b, c). The metabolic phenotype of BRAFi-resistant melanoma cells could be strongly influenced by NRF2 accumulation. Indeed, transcriptomic analysis has identified many NRF2 target genes, which are upregulated in BRAFi-resistant cells including genes implicated in iron sequestration (HMOX1), in the pentose phosphate pathway, and NADPH production (TKT and TALDO) as well as in GSH production and regeneration (GCLM and xCT). NRF-2 accumulation could be also implicate in increase of exogenous glutamine consumption as shown by Sayin et al.²³. Besides, NRF2 could also maintain mitochondrial metabolism in BRAFi-resistant melanoma cells for several reasons. First, it has been shown that the knockdown of NRF2 decreases basal mitochondrial respiration and spare respiratory capacity in numerous colon cancer cell lines²⁴. Second, NRF2 controls substrate availability for mitochondrial respiration²⁵. NRF2 affects the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation in mouse embryonic fibroblasts (MEF)²⁶. Mitochondrial oxidation of fatty acids (palmitic or hexanoic) is depressed in NRF2 knockout MEF and accelerated when NRF2 is constitutively active.

Finally, we decided to evaluate the role of glutathione metabolism in the BRAFi resistance context. First, we have used PEITC, a compound of the members of the isothiocyanate family. Its conjugation with glutathione is catalyzed by glutathione S-transferase, leading to a rapid depletion of glutathione¹⁵. We have shown that PEITC is able to resensitize to vemurafenib BRAFi-resistant melanoma cell lines confirming the important role of glutathione in their survival. But PEITC is also able to induce disruption of the mitochondrial electron transport complex I and to inhibit mitochondrial respiration in some cancer cells lines as leukemia cells²⁷, thereby by this mechanism it could also increase cytotoxicity of BRAFi as seen with other complex I inhibitors metformin or phenformin^{11,28}. To inhibit GSH metabolism, we have also used sulfasalazine, an xCT inhibitor; we found that this drug delay in vitro the growth of BRAFi-resistant melanoma. This FDA-approved drug is used in the treatment of inflammatory bowel disease, but preclinical study has also shown that this drug increases also chemosensitivity to multiple drugs²⁹. Erastin could be also another potential drug to increase BRAFi therapy, due to the fact that it is an X_C⁻ inhibitor and this compound exhibits greater lethality in cancer cells harboring mutations in HRAS, KRAS, or BRAF^{30,31}.

In conclusion, we found that BRAFi-resistant melanoma adapt their mitochondrial metabolism to favorize glucose-derived glutamate synthesis, cysteine uptake through xCT, and glutathione synthesis implicating NRF2 pathway. Glutathione level sustains survival of these cells in this oxidative stress condition. Drug targeting glutathione metabolism could be useful to delay the emergence of resistance to anti-MAPK therapy.

Materials and methods

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Vemurafenib, cobimetinib, trametinib,

(see figure on previous page)

Fig. 6 NRF2 promotes antioxidant response in MAPK-resistant melanoma. **a** mRNA expressions of genes implicated in oxidative stress status have been assessed by multiplex PCR in A375R1V1 compared to A375-v. **b** Immunofluorescence of NRF2 in A375-v and A375R1V1 cells. BSO has been used as positive control in A375-v to favorize NRF2 nuclear accumulation. DAPI staining has been used to visualize nucleus compartment. Left panel: representative pictures of three independent experiments. Right panel: percentage of A375-v or A375R1V1 treated or not with BSO exhibiting nuclear NRF2 labeling in nucleus. The values represent the mean \pm SD of three independent experiments. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA with a 95% interval of confidence followed by Bonferroni's post-test. * $P < 0.05$. **c** Left panel: immunoblotting of NRF2 in isolated nuclei or in whole-cells lysates of non-specific scramble control (SiCo) or NRF2 silencing (SiNRF2) cells. Actin or Lamin B served as loading control. Right panel: immunoblotting of anionic amino acid transporter light chain, xCT, or Slc7a11 (the specific subunit of system X_C⁻), Heme oxygenase 1 (HMOX1), transketolase (TKT), and transaldolase (TALDO) in si-control or si-NRF2 treated-A375R1V1 cells. Actin served as loading control. **d** ROS production in A375-v or A375R1V1 has been evaluated by flow cytometry after hydroethidium (HE) labeling in si-control or siNRF2-treated cells. **e** Left panel: colony-forming ability of A375-v and A375R1V1 grown in full medium and treated with vemurafenib as indicated for 10 days. Prior drug treatment, cells have been transfected with non-specific scramble control (SiCo) or with siRNA NRF2 (SiNRF2) as indicated. Representative pictures of three independent experiments. Right panel: the number of colonies has been counted for each condition and was indicated in the histogram. The values represent the mean \pm SD of three independent experiments. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA with a 95% interval of confidence followed by Bonferroni's post-test. * $P < 0.05$

and dabrafenib were from SelleckChem (Euromedex, Souffelweyersheim, France)

Cell lines

A375 human melanoma cell lines were purchased from the American Type Culture Collection. The original cells were short tandem repeat DNA profiled (IGNA, Nantes, France), were grown in bulk, and were never passaged for more than 6 weeks. A375 cell lines have been found to harbor BRAFV600E mutation. A375, A375-v, A375RIV1, and A375RIV2 were maintained in RPMI with 10% FCS. All cell lines were periodically tested for mycoplasma contamination.

Cells were transfected with siRNA targeting NRF2 (sc-37030, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or a non-targeting control siRNA (sc-37707). Transfections were performed in Opti-MEM (Invitrogen) using Lipofectamine plus (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

In vivo study

All procedures with animals were conducted according to the Institutional guidelines. Severe combined immunodeficient female mice (SCID), 6- to 8-week-old, under isoflurane anesthesia were injected with 2×10^6 A375 cells, mixed (1:1 volume) with BD Matrigel Basement Membrane Matrix. When tumors reached 100–250 mm³, the two groups were divided randomly ($n = 25$) and mice were treated with saline solution or with vemurafenib administered by oral gavage (75 mg/kg/d). [¹⁸F]FDG PET scans have been realized as described previously³².

Histology

Tumor specimens were stained with H&E. For in situ determination of cell proliferation, sections were analyzed with an antibody to Ki67. Stainings with antibodies against the highly characterized melanoma markers S100B have been used to confirm cellular pattern of melanoma³³.

Clonogenic assay and proliferation

Clonogenic assay was realized with cells (500/well) seeded into 6-well plates and treated with indicated doses of drug in culture medium. After 7 days of culture, colonies were stained with crystal violet, digital images were taken, then colonies were de-stained in acetic acid (30%) before densitometric quantification with the SAFAS UVMc2 spectrophotometer (Safas Monaco).

Cell proliferation was determined by cell numbers recorded after being seeded, using CyQuant direct proliferation kit from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Glucose and glutamine measurements

Glucose was measured in the extracellular medium using a SYNCHRON LX20 Clinical system (Beckman

Coulter, Fullerton, CA USA). Glutamine was measured using glutamine colorimetric assay kit (BioVision) following the manufacturer's instructions.

Immunoblotting

Cell lysates were prepared as described previously³⁴ then 20 µg proteins were separated on a 4–12% SDS-PAGE then transferred to nitrocellulose membrane. After blocking for 1 h in 10% milk in TBS Tween buffer, membranes were probed with antibodies as described in Supplementary Table 1. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies from Rockland Immunochemicals Inc. (Limerick, PA) were used at 1:2000 for 1 h then detection was carried out by enhanced chemoluminescence.

Assessment of oxygen consumption and glycolysis activity

Respiratory capacity and glycolytic activity of cells were performed with the Seahorse XF24e Extracellular Flux Analyser (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA) on attached cells as described⁹. Briefly, 2×10^4 cells/well were seeded in XF24 V7 microplates for 24 h before drug treatment. To determine oxygen consumption rate (OCR), cells were resuspended in DMEM (D5030, Sigma-Aldrich) with L-glutamine (2 mM) and D-glucose (10 mM) and the following drugs were added: 1 µM oligomycin, 0.25–0.5 µM FCCP, 1 µM rotenone, and 1 µM antimycin A. To determine extracellular acidification rate (ECAR), cells were resuspended in glucose-free DMEM (D5030, Sigma-Aldrich) with L-glutamine (2 mM) and the following compounds were added: D-glucose (10 mM), oligomycin (1 µM), and 2DG (10 mM).

¹³C NMR isotopomer profiling after treatment of cells with [U-¹³C]-glucose

A375-v and A375RIV1 cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing [U-¹³C]-glucose (10 mM). Metabolites were extracted³⁵ and redissolved in 550 µl of phosphate buffer (0.2 M; D₂O) at pH 7.4. 1D ¹³C NMR experiments were acquired with power-gated proton decoupling (3.1 kHz, Waltz-16) at 298 K on a Bruker Avance 500 equipped with a 5-mm cryoprobe. Acquisition parameters were as follow: relaxation delay 2 s, acquisition time 0.93 s, spectral width 35.2 kHz (280 ppm), and number of scans 20 K. ¹³C NMR spectra were processed using the Bruker TopSpin software 3.1, integrated with the KnowItAll® software (BIO-RAD) and normalized using the external standard and the amount of proteins in the sample as previously described³⁵.

Amino acid measurements

Amino acids concentration assay (µmol/l) was performed by high-performance liquid chromatography (Shimadzu C18 column, Kyoto, Japan)—tandem mass

spectrometry (AB Sciex 3200 Qtrap, Framingham, MA) using the aTRAQ kit for amino acid analysis of physiological fluids (AB Sciex). Acquisition in the mass spectrometer was achieved by multiple reaction monitoring. Data recording and analysis were performed with Analyst software, v.1.6 (AB Sciex).

Glutathione status

Glutathione status (i.e., glutathione disulfide, GSSG/reduced glutathione, GSH) was determined in cell pellets by using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, as published³⁶.

Cytofluorometric analysis

Evaluation of cell viability was performed with propidium iodide staining (5 µg/ml, 15 min, 4 °C) (P4864, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Changes in glutathione content were analyzed with the monobromobimane (100 nM, 30 min, 37 °C) (M1378, ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY). Detection of ROS was determined using hydroethidium probe (2.5 µM, 30 min, 37 °C) (D1168, ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY). Fluorescences were analyzed on a FACS LSR cytofluorometer (Beckton Dickinson).

PCR analysis

Quantitative detection of mRNA was performed by real-time PCR with RT² Profiler™ PCR Array Human Oxidative Stress (PAHS-065Z) using the Lightcycler 480 detector (Roche Applied Science, Mannheim Germany). Data analysis is based on QIAGEN Web software using the $\Delta\Delta CT$ method with normalization of the raw data to either housekeeping genes.

Mitochondrial DNA (mtDNA) relative copies number was assessed by measuring RNA level relative of mtDNA-encoded ND2 gene expression or ATPase6 gene expression. All samples have been normalized by nuclear DNA-encoded ATPsynthB RNA (reference genes). The comparative CT method was used for relative quantification of gene expression. Differences in the CT values (dCT) of the transcript of interest and reference genes were used to determine the relative expression of the gene in each sample³⁷.

Microscopic imaging

For confocal microscopy, cells were grown on coverslips and then stained with anti-NRF2 (NRF2 C-20 SC722, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Immediately before examination, cells were counterstained with DAPI (D1306, ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY). Before experiments, cells were seeded on 24 mm glass coverslip for 24 h before microscopic analysis (Leica DMR, Heidelberg, Germany). The confocal microscope was equipped with a 488 nm Argon laser,

561-nm diode-pumped solid-state laser and a 405-nm ultraviolet laser. Images were acquired using an oil ×40 Plan-NEOFLUAR objective (1.3 NA) and an oil ×63 Plan-APOCHROMAT objective (1.4 NA).

Statistical analysis

Statistics were performed with GraphPad Prism® version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data are presented as the mean ± SD. Differences between measurements in groups were determined by Student's *t* test, a one-way ANOVA or two-way ANOVA with Bonferroni post-test analysis as indicated. $P \leq 0.05$ was considered significant with $P \leq 0.05$ indicated with (*), $P \leq 0.01$ with (**), $P \leq 0.001$ with (***)

Acknowledgements

We thank Clemence Gumez, Delphine Fontaine, Marie-Adélaïde Bout, Laurence George, and Alain Kerckhove et Magali Defevre for technical help. We thank Nathalie Jouy and Emilie Floquet (Flow Core Facility of Bioimaging Center of Lille) for their technical assistance. This work received a financial support from INSERM, UNIVERSITE DE LILLE II, Ligue contre le Cancer (Comité du Nord, Comité de l'Aisne) (to P.M. and J.K.) and a special financial support from the Association pour l'Etude des Anomalies Congénitales Neurodev of Pr. B. Poupard (to P.G. and P.M.). A.T. is a recipient of a CHRU Lille-Région Haut de France fellowship. R.K. is a recipient of the University of Lille fellowship.

Author details

¹Univ. Lille, INSERM, UMR-S1172 Jean Pierre Aubert Research Centre 59045 Lille, France. ²Laboratoire SPCMB UMR CNRS 5068 Université Paul Sabatier 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France. ³Department of Biochemistry and Molecular Biology CHU Lille Lille, France. ⁴Centre de Biologie-Pathologie-Génétique CHU Lille Lille, France. ⁵EA4483-IMPECS, Institut Pasteur de Lille, Univ. Lille CHU Lille Lille, France. ⁶In Vivo Preclinical Imaging Facility, IFR 114 - University of Lille, Nord of France CHU Lille Lille, France. ⁷Université Lille, INSERM Unité 1189 CHU Lille Lille, France. ⁸Service des Maladies du Sang CHU Lille F-59000 Lille, France. ⁹Centre de Biologie-Pathologie-Génétique Banque de Tissus et UF8793 CHU Lille Lille, France

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

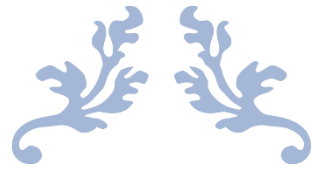
Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0340-4>.

Received: 23 November 2017 Accepted: 18 January 2018
Published online: 27 February 2018

References

- Long, G. V. et al. Overall survival and durable responses in patients with BRAF V600-mutant metastatic melanoma receiving dabrafenib combined with trametinib. *J. Clin. Oncol.* **34**, 871–878 (2016).
- Luke, J. J., Flaherty, K. T., Ribas, A. & Long, G. V. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 463–482 (2017).
- Hag, R. et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* **23**, 302–315 (2013).
- Beck, D. et al. Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAFV600E melanoma cells. *Sci. Signal.* **6**, ra7 (2013).

5. Corazao-Rozas, P. et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors. *Oncotarget* **7**, 39473–39485 (2016).
6. Jiang, C. C. et al. Apoptosis of human melanoma cells induced by inhibition of BRAFV600E involves preferential splicing of bimS. *Cell Death Dis.* **1**, e69 (2010).
7. Parmenter, T. J. et al. Response of BRAF-mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. *Cancer Discov.* **4**, 423–433 (2014).
8. Delgado-Goni, T. et al. The BRAF inhibitor vemurafenib activates mitochondrial metabolism and inhibits hyperpolarized pyruvate-lactate exchange in BRAF mutant human melanoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 2987–2999 (2016).
9. Corazao-Rozas, P. et al. Mitochondrial oxidative stress is the achilles' heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget* **4**, 1986–1998 (2013).
10. Baenke, F. et al. Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. *Mol. Oncol.* **10**, 73–84 (2016).
11. Trotta, A. P. et al. Disruption of mitochondrial electron transport chain function potentiates the pro-apoptotic effects of MAPK inhibition. *J. Biol. Chem.* **292**, 11727–11739 (2017).
12. Zhang, G. et al. Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *J. Clin. Invest.* **126**, 1834–1856 (2016).
13. Strohecker, A. M. & White, E. Targeting mitochondrial metabolism by inhibiting autophagy in BRAF-driven cancers. *Cancer Discov.* **4**, 4766–772 (2014).
14. Kluz, J. et al. Inactivation of the HIF-1 α /PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants. *Cancer Res.* **72**, 5035–5047 (2012).
15. Kumari, V. et al. Irreversible inhibition of glutathione S-transferase by phenethyl isothiocyanate (PEITC), a dietary cancer chemopreventive phytochemical. *PLoS ONE* **11**, e0163821 (2016).
16. Roh, J.-L., Jang, H., Kim, E. H. & Shin, D. Targeting of the glutathione, thioredoxin, and Nrf2 antioxidant systems in head and neck cancer. *Antioxid. Redox Signal.* **27**, 106–114 (2017).
17. Salama, A. K. S. & Flaherty, K. T. BRAF in melanoma: current strategies and future directions. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4326–4334 (2013).
18. Tardito, S. et al. Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1556–1668 (2015).
19. Krall, A. S. & Christofk, H. R. Rethinking glutamine addiction. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1515–1517 (2015).
20. Sasaki, H. et al. Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 44765–44771 (2002).
21. Habib, E., Linher-Melville, K., Lin, H.-X. & Singh, G. Expression of xCT and activity of system xc⁻ are regulated by NRF2 in human breast cancer cells in response to oxidative stress. *Redox Biol.* **5**, 33–42 (2015).
22. DeNicola, G. M. et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106–109 (2011).
23. Sayin, V. I. et al. Activation of the NRF2 antioxidant program generates an imbalance in central carbon metabolism in cancer. *eLife* **6**, e28083 (2017).
24. Jung, K.-A., Lee, S. & Kwak, M.-K. NFE2L2/NRF2 activity is linked to mitochondria and AMP-activated protein kinase signaling in cancers through miR-181c/mitochondria-encoded cytochrome c oxidase regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **27**, 945–961 (2017).
25. Holmström, K. M. et al. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. *Biol. Open* **2**, 761–770 (2013).
26. Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Zhang, Y., Abramov, A. Y. & Dinkova-Kostova, A. T. Nrf2 affects the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation. *Biochem. J.* **457**, 415–424 (2014).
27. Chen, G., Chen, Z., Hu, Y. & Huang, P. Inhibition of mitochondrial respiration and rapid depletion of mitochondrial glutathione by β -phenethyl isothiocyanate: mechanisms for anti-leukemia activity. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 2911–2291 (2011).
28. Yuan, P. et al. Phenformin enhances the therapeutic benefit of BRAFV600E inhibition in melanoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 18226–18231 (2013).
29. Huang, Y., Dai, Z., Barbacioru, C. & Sadée, W. Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.* **65**, 7446–7454 (2005).
30. Yagoda, N. et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* **447**, 865–869 (2007).
31. Bhutia, Y. D., Babu, E., Ramachandran, S. & Ganapathy, V. Amino acid transporters in cancer and their relevance to "glutamine addiction": novel targets for the design of a new class of anticancer drugs. *Cancer Res.* **75**, 1782–1788 (2015).
32. Carret-Rebillat, A.-S. et al. Neuroinflammation and A β accumulation linked to systemic inflammation are decreased by genetic PKR down-regulation. *Sci. Rep.* **5**, 8489 (2015).
33. Ohsie, S. J., Sarantopoulos, G. P., Cochran, A. J. & Binder, S. W. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J. Cutan. Pathol.* **35**, 433–444 (2008).
34. Kluz, J. et al. Exploiting mitochondrial dysfunction for effective elimination of imatinib-resistant leukemic cells. *PLoS ONE* **6**, e21924 (2011).
35. Cruz, T. et al. in *Identification and Data Processing Methods in Metabolomics* ch. Future Science Group: London, UK, **10**, 140–153 (2015).
36. McMennamin, M. E., Himmelfarb, J. & Nolin, T. D. Simultaneous analysis of multiple aminothiols in human plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **877**, 3274–3281 (2009).
37. Suissa, S. et al. Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication. *PLoS Genet.* **5**, e1000474 (2009).



RÉSULTATS ARTICLE 3

RÉSUMÉ ARTICLE 3

« Antimetabolic cooperativity with the FDA-approved Kidrolase and tyrosine kinase inhibitor to eradicate CML stem cell »

Le développement d'inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) ciblant BCR-Abl tel que l'Imatinib a permis de changer le pronostic des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC), en transformant une maladie autrefois mortelle en une maladie chronique. L'inhibition de BCR-Abl par l'Imatinib est efficace pour induire de puissants effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques, en partie due à l'inhibition de leur l'activité glycolytique (Gottschalk S et al., 2004). Cependant, bien que les traitements aux TKI soit efficaces, certaines cellules leucémiques peuvent échapper aux traitements, et après une certaine période de temps, accumuler des mutations et proliférer à nouveau. Il a été montré que la persistance de cellules souches leucémiques (CSL) durant la maladie minimale résiduelle était l'une des causes de ces rechutes, puisque ces cellules présentent des capacités d'auto-renouveau importantes ainsi qu'une sensibilité moindre à l'Imatinib. Par ailleurs, de nombreux travaux suggèrent que le métabolisme serait également impliqué dans la persistance des cellules leucémiques. En effet, lors d'une inhibition de l'activité glycoyrique par les TKI, les cellules de LMC sont capables de remodeler leur métabolisme vers la phosphorylation oxydative mitochondriale, qui devient alors essentielle à leur survie. Les TKI induisent ainsi une altération de l'état métabolique des cellules leucémiques, les rendant sensibles au ciblage mitochondrial. Il a été montré qu'une inhibition du métabolisme mitochondrial par l'oligomycine A permet de potentialiser les effets de l'Imatinib (Alvarez-Calderon F et al., 2015). D'autres auteurs ont montré l'importance des substrats mitochondriaux dans la survie de ces cellules, notamment la glutamine. L'inhibition de la captation de la glutamine par siRNA de la glutamine GLS1 ou par des composés chimiques tels que le BPTES ou la L-Asparaginase s'est avérée efficace pour affecter la survie de cellules de leucémie myéloïde (Jacque N et al., 2015).

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer si l'inhibition du métabolisme du glucose et de la glutamine, par l'Imatinib et la Kidrolase (L-Asparaginase) respectivement, permettait d'éliminer les cellules leucémiques persistant sous Imatinib seule. Après avoir confirmé les effets métaboliques induits par ces deux médicaments, nous avons alors montré que l'association de l'Imatinib et de la Kidrolase était efficace pour affecter la survie des cellules leucémiques dans différents modèles de résistance aux TKI *in vitro* et *ex vivo* : (1) dans un contexte de microenvironnement tumoral, (2) dans un modèle de dormance tumoral, (3) dans des cellules leucémiques immatures CD34⁺. Ces résultats sont encourageants et montrent que le ciblage du métabolisme mitochondrial en association avec des thérapies ciblées pourrait constituer une stratégie thérapeutique en induisant une coopération anti-métabolique afin d'éliminer les cellules leucémiques sensibles et persistantes.

ANTIMETABOLIC COOPERATIVITY WITH THE FDA-APPROVED KIDROLASE AND TYROSINE KINASE INHIBITOR TO ERADICATE CML STEM CELL

Anne Trinh*, Raeeka Khamari*, François-Xavier Mahon **, Béatrice Turcq **, Didier Bouscary⁺, Quentin Fovez*, Patrice Maboudou⁺⁺, William Laine*, Salim Dekioug*, Thierry Idziorek*, Bruno Quesnel*, Jérôme Kluza * and Philippe Marchetti* ⁺⁺

JK and PM contributed equally to this work

* Univ. Lille, Inserm, CHU Lille UMR-S 1172 F – 59000 Lille France

** Institut Bergonié, Université de Bordeaux, Inserm, U1218 ACTION F – 33076 Bordeaux, France

⁺ Univ. Paris Descartes, Institut Cochin, Inserm, U1016 F – 75014 Paris France

⁺⁺ Centre de Bio-Pathologie, Banque de Tissus, CHU Lille, France

Running title: Targeting mitochondrial metabolism and glycolysis to eradicate stem-like CML cells

Corresponding author: Prof. Philippe MARCHETTI

MD, PhD

INSERM UMR-S- 1172 Faculté de médecine, IRCL

1, place Verdun F- 59045 Lille Cedex France

E-mail: philippe.marchetti@inserm.fr

Abbreviations : CML (chronic myeloid leukemia), TKI (tyrosine kinase inhibitors), BCR-Abl (B Cell Receptor-Abelson), LSC (leukemic stem cell)

This work received a financial support from INSERM, UNIVERSITE DE LILLE, Ligue contre le Cancer (to PM and JK), a special financial support from the Association pour l'Etude des Anomalies Congénitales Neurodev of Pr. B. Poupard (to PM). AT is a recipient of a CHRU Lille-Région Nord-Pas de Calais fellowship.

Abstract:

Inhibitors of BCR-ABL, such as imatinib, are actively used for the treatment of chronic myeloid leukemia (CML). Unfortunately, these treatments do not eradicate stem-like CML cells. Other therapeutic options are necessary to kill stem-like CML cells and to avoid disease relapse. Recent studies indicate that metabolic network is integrated to oncogenic signaling in CML. In this study we investigated the metabolic pathways responsible for CML surviving to imatinib exposure and its potential therapeutic utility to improve the efficacy of imatinib against stem-like CML cells. Although inhibition of BCR-ABL by imatinib suppressed glycolysis, compensatory glutamine-dependent mitochondrial oxidation supported ATP synthesis and cell survival. Conversely, glutamine metabolism was inhibited by L-asparaginases such as Kidrolase in multiple types of myeloid leukemias without inducing predominant cell death. Moreover, clinically relevant *in vitro* concentrations of imatinib render CML cells susceptible to Kidrolase. Indeed, the combination of imatinib with Kidrolase reactivates the intrinsic apoptotic pathway leading to efficient cell death in CML cell lines, primary CD34⁺ stem-like CML patient samples and *ex vivo* in a mouse model of leukemia dormancy. Thus, targeting glutamine metabolism with the FDA-approved drug, Kidrolase in combination with Imatinib that suppress glycolysis represents an effective and widely applicable therapeutic strategy for eradicating stem-like CML cells.

Introduction

With the development of tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy, the outcome of chronic myeloid leukemia (CML) patients has changed drastically. Unfortunately, TKI, such as imatinib mesylate and other two or third generation BCR-ABL inhibitors, target preferentially differentiated cells and leave some of the leukemic stem cells (LSC) alive {Corbin:2011jg, Redner:2010gt}. Indeed, a fraction of LSC can survive independently of BCR-ABL signaling and thus are totally insensitive to imatinib {Corbin:2011jg}. The inability of TKI to kill LSC and/ or progenitor cells is at the origin of acquired resistance, frequent relapses and also ask the question of when to stop TKI for CML treatment {Laneville:2018cm}. Thus, strategies to improve the efficacy of TKI against LSC in CML are needed.

Cancer cell metabolism has opened up a new avenue in cancer treatment because it appears possible to target specific metabolic features of cancer cells providing a potential therapeutic window. Indeed, many oncogenes and oncogenic pathways that drive cancer development also drive metabolism. Classically, it is assumed that cancer metabolism is dependent on glycolysis that is predominant even in normoxic conditions (a phenomenon also called the Warburg effect). Thus, the aberrant activation of the MAPK pathway via the BRAFV600E mutation increases glucose uptake and glycolysis to allow intense cell proliferation (for review {Marchetti:2014ud, Marchetti:2018if}). Consistent activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway by BCR-ABL also increases glucose metabolism in leukemic cells {Kim:2005de}{Barnes:2005jt}. Given these conditions, it is not surprising that the exposure to oncogenic “driver” inhibitors such as BRAFV600E inhibitors (for review {Marchetti:2014ud, Marchetti:2018if}) or BCR-ABL inhibitors (Serkova) dramatically reduce glucose uptake and glycolysis to promote cell cycle arrest.

However, it has become evident that cancer metabolism cannot be resumed to the Warburg effect and represents a more complex network linking metabolism of glucose and oxidation of others nutrients such as glutamine. Thus, numerous evidence indicates that mitochondrial oxidative metabolic pathways have a crucial role in cancer development particularly to compensate for glucose deprivation. Interestingly, the dependence on mitochondrial oxidative metabolism permits cells to avoid cell death induced by MAPK inhibitors {Marchetti:2018if} or TKI {AlvarezCalderon:2015iz}. Moreover, CML stem cells are particularly sensitive to mitochondrial oxidative metabolism inhibitors {Kuntz:2017cz}. Thus, one interesting therapeutic strategy in cancer could be the combination of molecular-targeted drugs with antiglycolytic activities and inhibitors of the compensatory mitochondrial oxidative pathways thereby creating an “antimetabolic cooperativity” {Marchetti:2015dp}. Herein, our objective was to develop a pre-clinical proof of concept of antimetabolic cooperativity against CML stem cells. We demonstrated that the combination of Kidrolase, a L- asparaginase used to inhibit the mitochondrial oxidative pathway with Imatinib posses antimetabolic cooperativity and acts synergistically to eradicate stem-like CML cells *in vitro* and *ex vivo*.

Keys: synthetic lethality, metabolic addiction, LSC; metabolic stress

Materials and methods

Chemicals

Imatinib mesylate was purchased from Sigma-Aldrich, nilotinib and dasatinib were purchased from Selleckchem. Stock solution of 10 mM were prepared in sterile DMSO and stored at -20°C. Kidrolase and Erwinase were provided by CHU Lille, stored at 4°C and diluted extemporaneously in PBS. CB-839 was kindly provided by Pr. Didier Bouscary (CHU Paris, France).

[¹³C₆] Glucose and [¹³C₅] Glutamine were obtained from Professor Bart Ghesquière of Metabolomics Expertise Center, VIB Center for Cancer Biology (CCB), VIB, Leuven, Belgium.

Patients samples

CML samples were blood or bone marrow samples obtained from individuals in chronic or acute phase CML recruited from the Department of Haematology (Lille CHU, France), with informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and approval of the institutional ethical committee (CPP Lille). Normal samples were obtained from umbilical cord blood. CD34+ cells were isolated using the EasySep™ Human CD34 Positive Selection Kit II (Stemcell Technologies).

Cytapheresis of CML patients were kindly provided by Pr. François-Xavier Mahon (CHU Bordeaux, France) and stored in nitrogen vapor. Samples were thawed in fetal calf serum supplemented with DNase I 1X and washed with a solution of PBS-EDTA 2 mM. Peripheral blood mononuclear cells were isolated using human Pancoll separating solutions (PAN-Biotech).

The whole cells or CD34-isolated cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, and a growth factor cocktail containing 10 ng/ml of interleukins (IL)-3, (IL)-6, (IL)-7 and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), 5 ng/ml of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and 25 ng/ml of stem cell factor (SCF) (PeproTech).

Cell lines

The leukemic DA1-3b cell line was generated by stable transfection of BCR-Abl (Vereecque et al., 1999). The DA1-3b/C3H mouse model of tumor dormancy and isolation of tumor cells d60 and d365 have been described previously (Saudemont et al., 2002 ; Saudemont et al., 2004 ; Saudemont et al., 2005). DA1-3b, DA1-3b/d60 and DA1-3b/d365 leukemic cells were grown at 37°C and 5% CO₂ in DMEM medium (Gibco-BRL, Life Technologies SARL, Cergy-Pontoise, France) containing 25 mM glucose supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco-BRL), 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate (Gibco-BRL) and 0.1mM MEM non essential amino-acids (Thermo Fisher Scientific). K562, KCL-22 and KU812 cell lines were grown in the same conditions in RPMI medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum and 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml

streptomycin. MS-5 mesenchymal cells were grown in α -MEM medium w/o nucleosides (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum, 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 2 mM pyruvate.

For cell death analysis of normoxic and hypoxic conditions, cells were placed in incubators containing 37°C, 90% humidity, 5% CO₂, 20% O₂ for normoxia or 1% O₂ for hypoxia.

OCR and ECAR measurement, determination of cellular ATP

Extracellular acidification rate measurements (ECAR) and oxygen consumption rate (OCR) were measured using the Seahorse XF24 analyzer (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA). Seahorse XF24 microplates were pre-coated with Corning™ Cell-Tak (Fisher Scientific). Cells were suspended in medium containing DMEM (D5030, Sigma-Aldrich) with L-glutamine (2mM) and NaCl (32 mM) for glycolysis, or L-glutamine (2mM), glucose (10 mM) and pyruvate (1 mM) for oxygen consumption, and seeded at 150 000 cells/100 μ l/well for cell lines and 250 000 cells/100 μ l/well for primary cells. Cells were left to adhere by two successive centrifugation at low speed (650 rpm, then 450 rpm), and the microplate was left to stabilized for at least 20 min at 37°C in CO₂-free incubator, after that 400 μ l of warm medium were added to each well. Measurement of ECAR was done at baseline and after injections of the following molecules: D-glucose (10 mM), oligomycin A (1 μ M), an ATP synthase inhibitor, and 2-deoxy-glucose (2-DG, 10 mM), a competitive inhibitor of glucose. For OCR measurement, the following molecules were added : oligomycin A (1 μ M), FCCP (0.25-0.5 μ M), rotenone (1 μ M) and antimycin A (1 μ M).

For cellular ATP measurement, cells were seeded at 20 000 cells/100 μ l for cell lines or 100 000 cells/100 μ l for primary cells. After indicated time of treatments, Celltiter Glow Assay kit (Promega) was used according to the manufacturer's procedures.

Clonogenic assay

Cell proliferation was determined using cell counter Beckman counter or by cell numbers recorded after being seeded, using CyQuant direct proliferation kit from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Clonogenic assay was realized with cells seeded into 35mm petri dish in semi-solid methylcellulose medium (Methocult™ M3231 for murin cells or Methocult™ H4230 for human cells, Stemcell Technologies). Cells were treated with the drugs for 72 hrs and centrifugated. Pellet was resuspended in Iscove's modified Dulbecco medium (Lonza) supplemented with 2% fetal calf serum and 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin at 10 000 cells/ml, and cell suspension was added to methylcellulose medium (1000 cells/1ml/dish) and left at 37°C and 5% CO₂. Colony forming efficiency was determined after 7 days using inverted microscope Leica DMI8 (Leica Microsystems) and quantified using Image J software.

Cytofluorometric analysis

Evaluation of cell viability was performed by determining percent of sub-G1 cells with propidium iodide staining (50 µg per ml, 30 min) (P4864, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or by annexin V-FITC (0.45 µg per sample, 10 min) (Biolegend), annexin V-APC (0.45 µg per sample, 10 min) (Biolegend), sytox blue (1µM, 10 min) (Thermo Fisher Scientific), sytox red (5 nM, 10 min) (Thermo Fisher Scientific), all incubated at room temperature.

The CD34/CD38 profile of cells was analyzed in one single tube containing the following molecules: for human cells CD34 ECD (clone 581, Beckman Coulter), CD38 APC (clone HIT2, Biolegend), CD45 BUV395 (clone HI30, BD Biosciences), for murin cells CD34 PE (clone MEC14.7, Biolegend), CD38 APC (clone 90, Biolegend), CD45.2 Brilliant violet 421 (clone 104, Biolegend).

Mitochondrial content, mitochondrial membrane potential and mitochondrial ROS production were assessed by MitoTracker Green (125 nM, 30 min, 37°C) (Thermo Fisher Scientific), MitoTracker Deep Red (125 nM, 30 min, 37°C) (Thermo Fisher Scientific) and Mitosox (2.5 µM, 30 min, 37°C) (Thermo Fisher Scientific) stainings respectively.

For cell proliferation analysis, cells were probed with CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher Scientific).

Fluorescence levels following cellular staining were analyzed by FACS LSR Fortessa X20 (Becton Dickinson).

Metabolite flux

Two hundred thousand cells were supplemented with media containing uniformly labelled ¹³C-glucose (25 mM) or ¹³C-glutamine (2 mM) for 24 hrs. Cells were rinsed with ice-cold 0.9% NaCl solution and metabolites were extracted by adding 250 µl of a 50-30-20 solution (methanol-acetonitrile 10 mM-Tris.HCl pH 9.4) to the cells. Plates were then incubated for 3 min on ice. Cells were transferred to an eppendorf tube before centrifugation at 20.000 x g for 10 min at 4°C Supernatants were then transferred to a fresh tube and stored at -80°C, and pellets were used for BCA/protein assay to normalize each conditions to the same cell number. Separation of metabolites prior to Mass Spectrometry (MS) measurement was performed using a Dionex UltiMate 3000 LC System (Thermo Scientific) coupled to a Q Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific) operating in negative ion mode. Practically, 15 µl of the cellular extract was injected on a C18 column (Aquility UPLC®HSS T3 1.8µm 2.1x100mm) and the following gradient was performed by solvent A (H₂O, 10mM Tributyl-Amine, 15mM acetic acid) and solvent B (100% Methanol). Chromatographic separation was achieved with a flowrate of 0.250ml/min and the following gradient elution profile: 0min, 0%B; 2min, 0%B; 7min, 37%B; 14min, 41%B; 26min, 100%B; 30min, 100%B; 31min, 0%B; 40min, 0%B. The column was placed at 40°C throughout the analysis. The MS operated both in full scan mode (m/z range: 70-1050)

using a spray voltage of 4.9 kV, capillary temperature of 320°C, sheath gas at 50.0, auxiliary gas at 10.0. The AGC target was set at 3e6 using a resolution of 140.000, with a maximum IT fill time of 512 ms. Data collection was performed using the Xcalibur software (Thermo Scientific).

Immunoblot analysis

Cell lysates were prepared as described previously (Kluza J et al., Plos One 2011) then 20 µg proteins were separated on a 4–12% SDS- PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. After blocking for 1 h in 10% milk in TBS Tween buffer or Bovin Serum Albumine according to manufacturer's recommendations, membranes were then probed with antibodies (1:1000 for primary antibodies and 1:2000 for secondary antibodies) as described in Supplementary Table 1. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies from Rockland Immu- nochemicals Inc. (Limerick, PA) were used at 1:2000 for 1 h then detection was carried out by enhanced chemoluminescence.

Real-time quantitative reverse transcription

Quantitative detection of mRNA was performed by real-time PCR using the Lightcycler 480 detector (Roche Applied Science, Mannheim Germany) as previously published (Kluza et al., 2011). The transcript levels in triplicates were compared using the Pfaffl method after normalization to those of β -tubulin.

Amino acid measurements

Amino acids concentration assay (µmol/l) was per- formed by high-performance liquid chromatography (Shimadzu C18 column, Kyoto, Japan) - tandem mass spectrometry (AB Sciex 3200 Qtrap, Framingham, MA) using the aTRAQ kit for amino acid analysis of physio- logical fluids (AB Sciex). Acquisition in the mass spec- trometer was achieved by multiple reaction monitoring. Data recording and analysis were performed with Analyst software, v.1.6 (AB Sciex).

Statistical analysis

Results were analysed using GraphPad Prism® version 8.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The student's t-test was used to compare data sets. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results:

Metabolic organization of CML involves both glycolysis and glutamine-dependent mitochondrial OXPHOS. We first compared the metabolism of DA1-3b leukemic cells expressing BCR-ABL to the isogenic cell line DA1 that did not express BCR-ABL (Fig. 1A and 1B). There was a significant increase in both glycolysis (as judged by ECAR and genes expression) (Fig. 1A) as well as mitochondrial respiration (Fig. 1B) in cells transfected with BCR-ABL compared with control cells. In BCR-ABL-expressing DA1-3b cells, the mitochondrial respiration was largely sustained by glutamine (Fig. 1C) indicating that CML cells consume both glucose and glutamine. In the presence of glutamine and glucose, DA1-3b exhibited the highest proliferative rates (Fig. 1D). Under conditions of glucose or glutamine deprivation, DA1-3b cells were still able to proliferate although at a lower rate than in conditions with both nutrients (Fig. 1D). Glucose or glutamine starvation did not induce obvious increase in cell death but promoted G0/G1 cell cycle arrest (Fig. 1D). This result is consistent with the observation that inhibition of either glycolysis with 2DG or of mitochondrial respiration with oligomycin A was insufficient to totally deplete DA1-3b (Fig. 1F, left panel) or primary CD34+ leukemic (Fig. 1F, right panel) cells in ATP (Fig 1F). This is probably due to the development of compensatory mechanisms to prevent energy collapse. These results suggest that CML cells possess metabolic flexibility to survive periods of carbon sources deprivation. Finally, only the inhibition of the two metabolic pathways depleted cells in ATP and was able to kill BCR-ABL expressing cells. Together, these results strongly suggest only the depletion of both carbon sources, glucose and glutamine, are required for CML killing.

Upon Imatinib exposure BCR-ABL+ cells are dependent on mitochondrial metabolism for survival.

Previous studies have shown that imatinib displays a sustained inhibitory effect on glucose uptake and glycolysis through a reduction in the expression of key proteins such as GLUT-1 or PKM2 *{Barnes:2005jt, Shinohara:2016kv}*. In the current study, we examined specifically metabolism of leukemic cells that survive to imatinib exposure at sub-lethal (Supplemental Fig), but clinical relevant anti-proliferative concentrations *{Gottschalk:2004fv}*. To this end, we performed metabolic flux analysis using ¹³C-labeled glucose in CML cells treated with vehicle or imatinib for 24 hours before the incubation with labeled glucose. Cells treated with imatinib displayed important impairment of glucose uptake and glycolysis as judged by the decrease in labeled glycolytic intermediates and labeled lactate (Fig. 2A). Besides, it was accompanied by a reduction in the glucose flux through the nonoxidative pentose phosphate pathway (Fig. 2A). In agreement with the inhibition of glucose uptake and lactate production (Fig. 2B), we also observed a decrease in glycolysis-associated protein expression (Fig. 2C), as well as a decrease in ECAR in BCR-ABL+ leukemic cells exposed to imatinib (Fig. 2D, left panel) or to other clinical BCR-ABL inhibitors (Fig. 2D, right panel). Despite the decrease in glycolysis, imatinib exposure did not deplete in the high-energy molecule, ATP indicating that cells that

survive to imatinib can maintain energy state in the absence of efficient glycolysis (Fig. 2E). This situation is compatible with the maintenance of mitochondrial metabolism in spite of imatinib exposure, despite a slight decrease in basal OCR under TKI treatment (Fig. 2F). Indeed, the subpopulation of cells that survived in the presence of imatinib for 7 days, which is enriched in progenitors, presented high level of mitochondrial metabolism as determined by their mitochondrial potential and the overproduction of mitochondrial ROS (Fig. 2G) To explore whether glutamine was used to fuel mitochondrial activity, we cultured cells in L-[13C5] glutamine in the presence or absence of imatinib and analyzed intracellular metabolites by 13C NMR. As shown in Figure 2G, cells that survive to imatinib continued to use glutamine to produce TCA intermediates OAA, in the absence of efficient glycolysis (Fig. 2A). Thus, we observed that leukemic cells exposed to imatinib relied on glutamine-dependent mitochondrial activity to survive. Indeed, these cells became highly sensitive to the addition of the ATP synthase inhibitor, oligomycin A, used at concentration that inhibited mitochondrial respiration (Fig. 2I) or to the withdrawal of glutamine but not asparagine (Fig. 2J). Thus, to survive to imatinib, BCR-ABL+ cells require glutamine-derived carbon that maintains the TCA cycle in the absence of glycolysis.

L-asparaginases inhibit glutamine metabolism and reduce leukemic cell growth but are insufficient to eradicate BCR-ABL+ cells.

We have previously demonstrated that targeting glutamine metabolism has potential anti leukemic effects on myeloid leukemia cells *{Willems:2013kx, Jacque:2015fs}*. Therefore, we sought to target glutamine addiction in imatinib-surviving BCR-ABL+ cells. L-asparaginases (*e.g.* the *E.coli-asparaginase*, Kidrolase) are used to treat pediatric and adult forms of acute lymphoblastic leukemia. These therapeutically relevant components are able to deaminate L-asparagine into aspartate. These enzymes also deplete glutamine and the antileukemic activity correlates with their ability to deplete extra cellular asparagine better than glutamine at lower dose, and to deplete both amino acids at higher dose *{Pieters R et al., 2012}*. Consequently, we studied the metabolic effects of the FDA-approved Kidrolase in BCR-ABL + leukemic cells (Fig.3). In conditions that deplete extracellular glutamine and asparagine (Fig.3A), the flux experiment indicates that L-asparaginase depleted the anaplerotic flux of glutamine into the TCA in BCR-ABL+ cells (Fig. 3B). This was accompanied with a significant reduction in OCR (Fig. 3C) confirming that glutamine is a major energy source to fuel mitochondrial respiration in BCR-ABL+ cells. As a result of mitochondrial inhibition, Kidrolase displayed strong antiproliferative effects without predominant cytotoxic activity in BCR-ABL+ cells (Fig. 3). This absence of important cell death in BCR-ABL+ cells was compatible with the maintenance of high ATP level in Kidrolase-treated cells (Fig. 3E). Strikingly, L-asparaginase activated intracellular glycolytic flux and ECAR in BCR-ABL+ cells (Fig. 3F). Next, we tested whether the increase of glycolysis upon Kidrolase treatment allows leukemic cells to cope with metabolic stress. We found that the compensatory increase in glycolysis supported the survival of cells exposed to Kidrolase since

inhibition of glycolysis with 2DG synergized with Kidrolase in inducing BCR-ABL+ cell death (Fig. 3G). To determine whether the sensitivity to Kidrolase is a general feature of leukemic cells, we tested a large panel of BCR-ABL + or - leukemic myeloid cell lines. The antileukemic effects of Kidrolase were dose dependent and occurred in all cell lines tested. However, the antileukemic responses were highly heterogeneous in term of cell death observed up to 72h (Supplemental Fig3). Accordingly, we discovered an inverse correlation between glycolysis and kidrolase-induced leukemic cell death (Fig. 3I and supplemental Fig. 3). Thus, the FDA-approved glutamine inhibitor kidrolase hinders glutamine-dependent mitochondrial metabolism but are insufficient to eradicate BCR-ABL+ cells due to glycolytic compensation.

Dual treatment with Imatinib and Kidrolase significantly induces death of BCR-ABL+ leukemic cells.

Given the metabolic flexibility of BCR-ABL+ cells observed above, we hypothesized that the combination of Imatinib and Kidrolase could be of therapeutical interest blocking both glycolysis and mitochondrial metabolism. Metabolic flux analyses indicate that cells treated with the combination of imatinib and kidrolase caused much more impairment of the carbon flux into the TCA cycle, than either drug alone (Fig.4A). The combination of drugs also impeded the glycolytic flux with efficiency (Fig. 4A). In BCR-ABL+ cell lines, L-asparaginases such as Kidrolase or Erwinase, synergized with imatinib to induce cell death (Fig. 4B). The combination of imatinib with kidrolase enhanced cell death by potentiating the intrinsic pathway of apoptosis through the downregulation of Bcl-2 and Bcl-XL protein levels and Bim upregulation (Fig. 4C). The combination of Kidrolase and Imatinib exhibited the most pronounced killing effect in comparison to the association of Kidrolase and other anti-leukemic drugs (Fig.4D). Kidrolase acted in synergy with imatinib in BCR-ABL + leukemia cells even when cells are cultured on the MS5 stroma (Fig. 4E) or in hypoxic conditions (Fig. 4F), a situation known to protect leukemia from the effects of L-asparaginase *{Iwamoto:2007kw}*. These result suggest that imatinib plus kidrolase elicit death synergistically in BCR-ABL + leukemic cells.

Imatinib synergized with Kidrolase to eradicate leukemia-initiating cells in CML patients

Next, we explored the potential of the synergistic combination of Imatinib plus Kidrolase against subpopulations of relapse-inducing cells. We first studied the effect of drug association on long-term persistent BCR-ABL+ cells originated from a mouse model of *in vivo* leukemia dormancy *{Saudemont:2004co}*. In our model, the DA1-3b/d60 and DA1-3b/d365 cells were derived from the BCR-ABL + DA1-3b cells injected in mice and isolated after 2 months or 1 year of tumor dormancy, respectively *{Saudemont:2007gf}* (Fig. 5.A). Persistent-leukemic DA1-3b/d60 and DA1-3b/d365 cells were completely refractory to Kidrolase monotherapy and also partially resistant to treatment with imatinib (Fig. 5B). However, the combination of the two drugs eradicated long-term persistent cells as judged by the induction of apoptosis (annexin V staining) and the loss of colony-forming potential.

Indeed, kidrolase in combination with imatinib reduced colony formation of DA1-3b cells by more than 90 % compared to imatinib alone (Fig. 5C).

Then, we assessed the *ex vivo* effects of Kidrolase plus imatinib in different CD34 and CD38 subpopulations of primary CML cells (n=2 ; Fig. 5D) and in primary CML CD34+ progenitor cells from newly diagnosed patients (n=7 ; Fig. 5E). We show that the killing effect was more pronounced on the stem cell-enriched CD34+ subpopulation as compared to more differentiated CML cells (Fig. 5D). Furthermore, the combination of the two drugs is effective to significantly decrease viability of CD34+ cells from newly diagnosed patients compared to individual treatment (Fig. 5E). Importantly, the combination had no effect on CD34+ progenitor cells from healthy individuals (n=3 ; Fig. 5D).

Thus, the combined use of Imatinib and kidrolase synergistically increase cytotoxicity selectively in CML stem cells.

Discussion

We characterized the metabolic effects of the FDA-approved drug kidrolase in association with TKI in myeloid leukemia and demonstrated that they displayed synergistic antimetabolic effects that eradicate stem-like CML cells. It is well established that TKI such as imatinib possess potent anti-Warburg effect. Imatinib efficiently hampers glucose metabolism through the reduction of GLUT-1 surface localization {Barnes:2005jt}, inhibition of BCR-ABL-mediated PKM2 phosphorylation or the modulation of PKM isoforms {Shinohara:2016kv}. However, inhibition of glycolysis alone is often insufficient to eradicate cells due to compensatory activating metabolic pathways {Marchetti:2015dp}. Upon imatinib exposure, mitochondrial oxidative metabolism is maintained at high levels due to fatty acid {Shinohara:2016kv} and/or glutamine oxidation (Fig 2). This suggests that remaining TKI-tolerant cells become addicted to mitochondrial activity for survival {Kuntz:2017cz}. In agreement with our results, mitochondrial metabolism is spared by FLT3^{ITD} TK inhibitors in myeloid cells {Gallipoli:2018dn}. The mechanisms that result from a metabolic shift toward oxidative metabolism remain largely unknown. However, we and others {Gallipoli:2018dn} have observed an significant increase in mitochondrial mass upon TKI exposure suggesting important changes in mitochondrial biogenesis. As a consequence of mitochondrial addiction, TKI-tolerant cells were highly sensitive to the antileukemia effects of mitochondrial targeting drugs. Myeloid leukemia present numerous mitochondrial-druggable targets {Farge:2017kg}. Thus, the CPT1 (carnitine O-palmitoyltransferase 1) inhibitors that reduce fatty acid oxidation and mitochondrial OXPHOS decreased significantly the number of quiescent leukemia progenitor cells {Samudio:2010bc}. The combination of mitochondrial drugs and TKI consists in a rational approach that considers complementary mechanisms of action as the therapeutic aim. TKI and mitochondrial inhibitors address the two compensatory aspects of the metabolism, glycolysis and mitochondrial oxidation that neither monotherapy can achieve alone to kill leukemia cells. Several preclinical studies evidenced that TKI, such as inhibitors of FLT3^{ITD} can synergize with mitochondrial inhibitors leading to potent antileukemia effects {Gallipoli:2018dn, Gregory:2017ke, Gregory:2019fz, AlvarezCalderon:2015iz}. Interestingly, inhibition of the mitochondrial “booster” STAT3, {Eiring:2014bo} or of mitochondrial translation {Kuntz:2017cz} synergize with BCR-ABL inhibitor in CML. Here, we completed the frame including the inhibition of glutamine-dependent mitochondrial metabolism. Genetic and pharmacological inhibition of the first enzyme in glutamine metabolism is synthetically lethal with FLT3-ITD-TKI in myeloid leukemia cells {Gallipoli:2018dn}. This effect seems related to the depletion of glutathione, enhancement of mitochondrial oxidative stress resulting in leukemia cell death {Gregory:2018ke}. We have used L-asparaginase to deplete extracellular glutamine and therefore mitochondrial metabolism. To best translate *in vitro* results into clinical application, we have chosen the existing drug FDA-approved drug Kidrolase. However, asparaginase use in the clinic is associated with a number of dose-dependent toxicities {Koprivnikar J et al., 2017}. When combined with TKI, L-asparaginase should be less toxic since exposure to BCR-ABL inhibitors specifically increases the sensitivity of BCR-ABL+

cells to mitochondrial targeting drugs (results and *{AlvarezCalderon:2015iz}*). As demonstrated (Fig. 3A), L-asparaginase depleted the extracellular AA, glutamine and asparagine. Several studies uncovered a crucial role of asparagine in cancer cell growth and proliferation *{Krall:2016}* as well as cell survival to glutamine deprivation *{Zhang:2014ii}*. Thus, asparagine is required for anabolism and cell proliferation in the absence of glutamine *{Pavlova:2018ho}*. For these reasons, the synergistic effect of L-Asparaginase observed here is probably based on the depletion of both extracellular asparagine and glutamine. It is noteworthy that LSC relies on AA including glutamine and glutamate to maintain OXPHOS for survival *{Jones:2018ko}*.

Targeting mitochondrial metabolism has been proposed as a therapeutic approach against leukemic stem cells *{Lagadinou:2013kw, Kuntz:2017cz, Skrtic:2011ft}*. Recently a therapeutic drug combination targeting mitochondrial metabolism has demonstrated efficacy against LSC in patients with AML *{Pollyea:2018cf}*. Accordingly, we have shown that both glycolysis and glutamine-dependent mitochondrial metabolism had to be impaired to eradicate LSC. Targeting compensatory pathways of glutamine metabolism in CML-like stem cells can improve the efficacy of cancer treatments that impair glucose utilization. Thus, we have provided pre-clinical evidence that the antimetabolic cooperativity by the combination of oncogene tyrosine kinase inhibitors and mitochondrial inhibitors constitutes a novel interesting therapeutic approach to eradicate LSC.

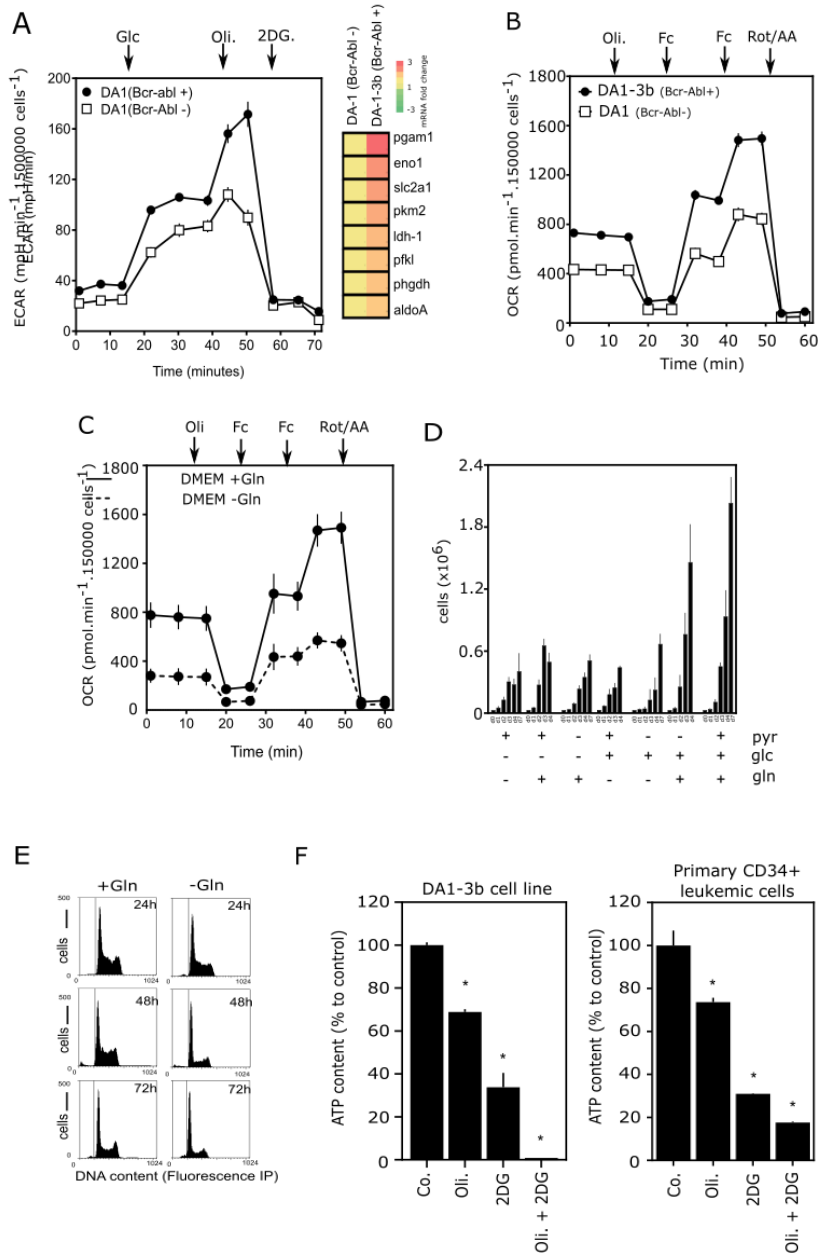


Figure 1 – Glucose and mitochondrial respiration through glutamine metabolism are necessary for optimal metabolism and cell proliferation in CML cells. Glycolytic activity (A, left panel) and mitochondrial respiration (B) of BCR-Abl⁺ (DA1-3b) and BCR-Abl⁻ (DA1) were measured using Seahorse XF24 extracellular flux analyzer after the injection of indicated drugs. (A) Glycolysis enzyme mRNA expression was quantified by RT-qPCR (right panel). (C) DA1-3b leukemic cells were incubated in medium supplemented or not with glutamine for 24 hrs and oxygen consumption rate (OCR) was then measured. (D) DA1-3b cells were cultured in medium with or without glutamine. After 24, 48 and 72 hrs, cell death was determined by measuring sub-G1 population using propidium iodide staining. (E) DA1-3b cells (left panel) and primary CD34⁺ leukemic cells isolated from CML patient blood (right panel) were treated with oligomycin A (1 μM), 2-DG (10 mM) and a combination of the two molecules for 4 hrs. ATP content was measured by luminescence.

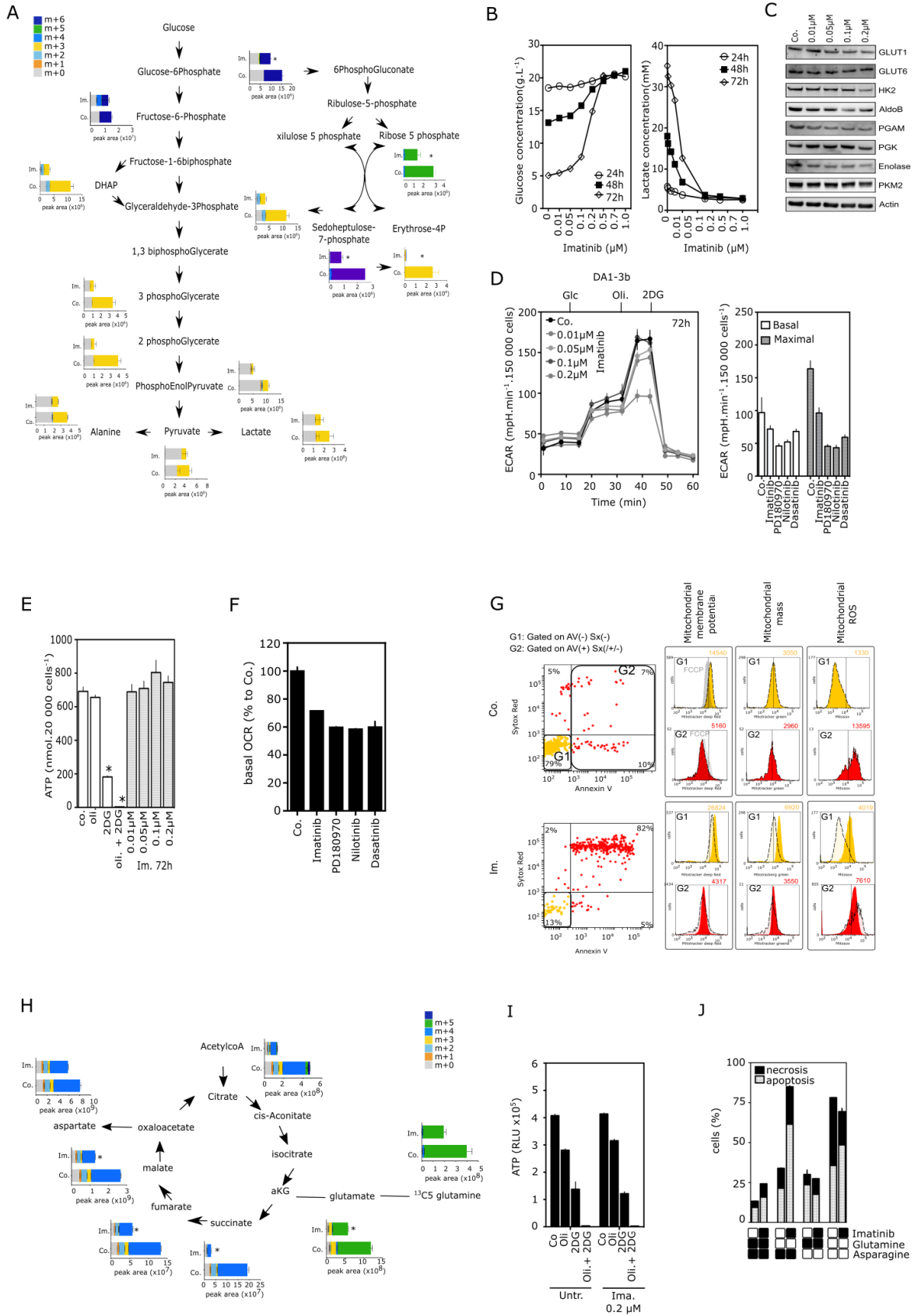
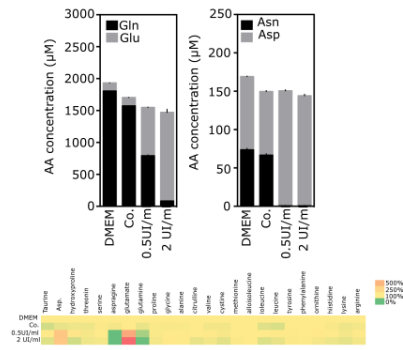
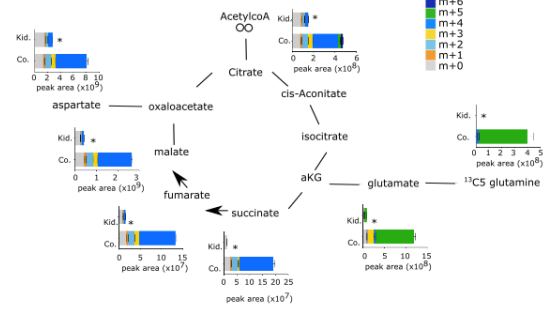


Figure 2 – BCR-Abl+ cells exhibit mitochondrial addiction and glutamine dependency under TKI exposure. (A) Levels of glycolysis intermediates have been measured by LC-MS analysis in DA1-3b cells treated with Kidrolase 0.5 UI/ml for 24h and grown in media containing U-13C6 glucose (mean \pm SD, n=3, *p=0.05). (B) Glucose (left panel) and lactate (right panel) concentrations were determined after 24, 48 and 72 hrs of Imatinib treatment (0.01-1 μ M). (C) DA1-3b cells were treated with Imatinib (0.01 – 0.2 μ M) for 72 hrs and glycolytic enzymes expression, as indicated, was measured by immunoblotting. (D) Variations of glycolytic activity was determined after addition of inhibitors (Glc for glucose, Oli for oligomycin A, 2DG for 2-deoxy-glucose) using Seahorse XF24 extracellular flux analyzer (left panel). Leukemic cells were treated by TKI of BCR-Abl (Imatinib 0.2 μ M, PD180970 0.01 μ M, Nilotinib 5 nM, Dasatinib 2 nM) for 24 hrs, and basal and maximal ECAR (right panel). (E) DA1-3b leukemic cells were treated with Imatinib (0.01-0.2 μ M) for 72 hrs, and oligomycin A and 2-DG (4 hrs treatment) were set as controls. ATP levels was then measured by luminescence. (F) DA1-3b leukemic cells were treated by TKI as indicated and basal OCR was measured. (G) DA1-3b cells were untreated or treated by Imatinib (0.5 μ M) for 48 hrs. Mitochondrial membrane potential, mitochondrial mass and mitochondrial ROS production were measured in living (yellow histograms) and dead (red histograms) cells using flow cytometry analysis of mitotracker deep red, mitotracker green and mitosox red stainings respectively, and annexin V and sytox stainings. (H) Variations of TCA cycle intermediates levels have been measured by LC-MS analysis in DA1-3b cells grown in media containing U-13C5 glutamine and treated with Imatinib (0.2 μ M), Kidrolase (0.5 UI/ml) or a combination of the two drugs for 24 hrs (mean \pm SD, n=3, *p=0.05). (I) ATP content of DA1-3b cells treated by Imatinib 0.2 μ M for 24 hrs, and oligomycin (1 μ M) and 2-DG (10 mM) for 4 hrs was determined by luminescence. (J) DA1-3b cells were cultured in medium containing a combination of Imatinib (0.5 μ M), glutamine (2 mM) and asparagine (4 mM) for 48 hrs. Necrosis and apoptosis were determined by flow cytometry analysis of Annexin V and Sytox blue staining.

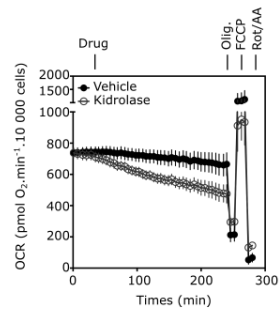
A



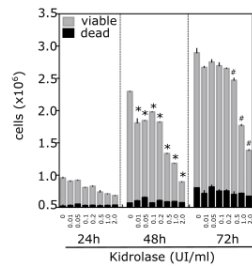
B



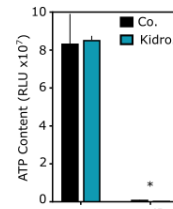
C



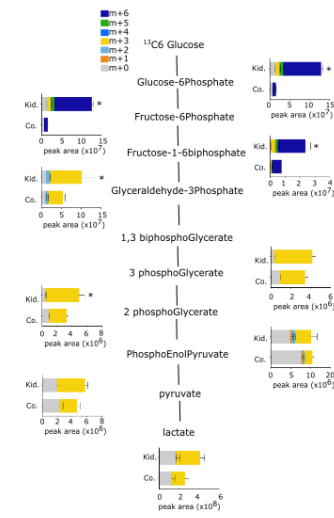
D



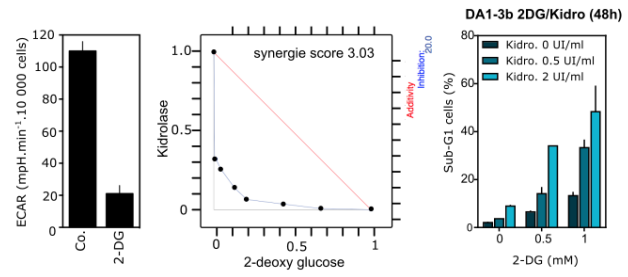
E



F



G



H

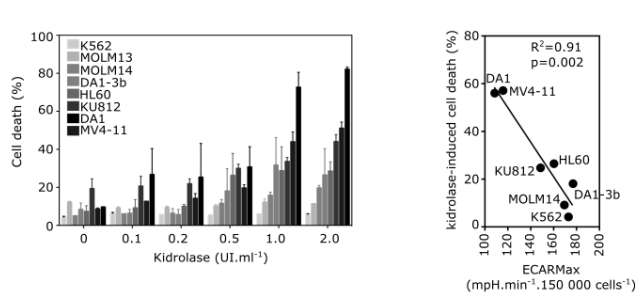


Figure 3 – Myeloid leukemic cells are able to survive to Kidrolase-induced glutamine depletion through glycolysis.

(A) DA1-3b cells were cultured in medium containing Kidrolase for 24 hrs. Cells were centrifugated, supernatant was removed and amino acids concentration as indicated was measured by HPLC/MS. (B) Variations of TCA cycle intermediates levels have been measured by LC-MS analysis in DA1-3b cells grown in media containing U-13C₅ glutamine and treated with Imatinib (0.2 μ M), Kidrolase (0.5 UI/ml) or a combination of the two drugs for 24 hrs (mean \pm SD, n=3, *p=0.05). (C) Variations of mitochondrial respiration in DA1-3b cells have been assessed by measuring OCR with Seahorse technology. The following molecules have been injected subsequently : drug (Kidrolase or vehicle control), oligomycin (Olig.), FCCP and rotenone/antimycine A (Rot/AA). (D) Dose-response of cell proliferation and cell death (PI staining) in DA1-3b cells treated by Kidrolase (0-2 UI/ml) was determined at 24, 48 and 72hrs (mean \pm SD, n = 3, *p < 0.05). (E) Intracellular ATP level of DA1-3b cells exposed to oligomycin (olig.), 2-deoxy-glucose (2DG) or a combination of the two inhibitors for 4 hrs, with or without 72 hrs pre-incubation with Kidrolase (1 UI/ml). (F) Levels of glycolysis intermediates have been measured by LC-MS analysis in DA1-3b cells treated with Kidrolase 0.5 UI/ml for 24h and grown in media containing U-13C₆ glucose (mean \pm SD, n=3, *p=0.05). (G) Effect of 2-DG on basal glycolytic activity of DA1-3b cells (left panel). DA1-3b cells were cultured with combination of 2-DG (0.033 – 100 mM) and Kidrolase (0.00033 – 10 UI/ml) for 72h and cell proliferation inhibition was quantified by fluorescence using CyQUANT Cell Proliferation Assay. The response of the combination was compared with its single agents against the widely used Loewe model for drug-with-itself dose additivity using Chalice software and presented as an isobologram (middle panel). Cell death upon 48 hrs exposure to the two drugs has been assessed by cytometric analysis of PI staining (right panel). (H) Cell death measurement of different myeloid cell lines after 48 hrs exposure to Kidrolase (0-2 UI/ml) assessed by PI cytometric analysis of PI staining (left panel). Correlation between maximal glycolytic activity (ECAR Max) and cell death induced by 48 hrs Kidrolase treatment of 8 myeloid leukemic cell lines (*<p=0.002, R²=0.91).

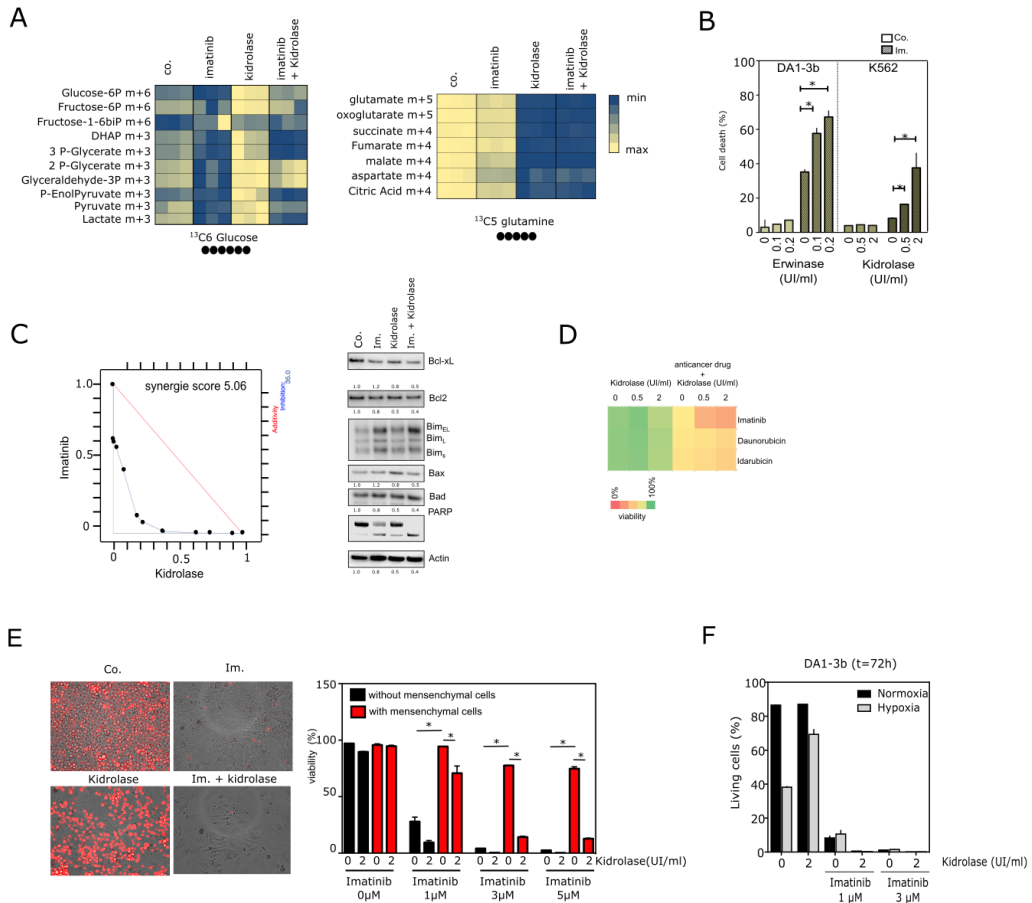
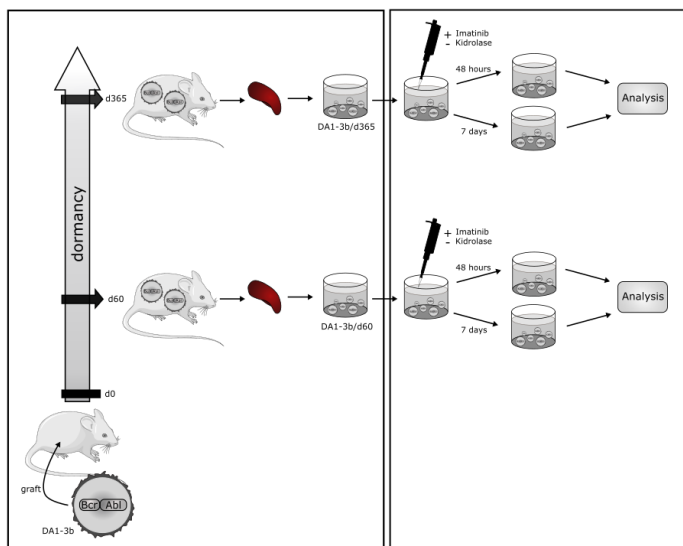
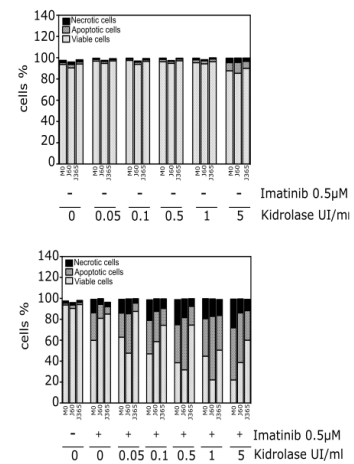


Figure 4 – Imatinib and Kidrolase drug combination is effective to target glycolysis and mitochondrial metabolism and to induce cytotoxic effects. (A) Levels of glycolysis (left panel) and TCA cycle (right panel) intermediates have been measured by LC-MS analysis in DA1-3b cells treated with Imatinib (0.2 μ M) and Kidrolase (0.5 UI/ml) for 24h and grown in media containing U- $^{13}\text{C}_6$ glucose (left panel) or U- $^{13}\text{C}_5$ glutamine (right panel) (n=3). (B) Determination of DA1-3b and K562 cell death after 48hrs exposure to Imatinib (0.5 μ M) and Kidrolase or Erwinase treatments as indicated. (C) DA1-3b cells were cultured with combination of Imatinib (0.0001 – 100 μ M) and Kidrolase (0.00033 – 10 UI/ml) for 72h and cell proliferation inhibition was quantified by fluorescence using CyQUANT Cell Proliferation Assay (left panel). Immunoblotting of pro- and anti-apoptotic proteins (as indicated) in DA1-3b cells treated with Imatinib (0.5 μ M), Kidrolase (2 UI/ml) or a combination of the 2 drugs for 24 hrs (right panel). (D) DA1-3b cells were treated by a combination of Kidrolase and anticancer drugs (Imatinib 0.5 μ M, Daunorubicin 0.01 μ M, Idarubicin 0.001 μ M) for 48 hrs and viability was assessed by cytometric analysis of annexin V and Sytox stainings (D) Phase-contrast analysis of DA1-3b cells transfected with DsRed co-cultured with MS-5 mesenchymal cells and treated by Imatinib (3 μ M) and Kidrolase (2 UI/ml) for 7 days (left panel). Determination of DA1-3b viability in simple culture or in co-culture with mesenchymal cells after 48hrs treatments with Imatinib (1-5 μ M) and Kidrolase (2 UI/ml) (right panel). (F) DA1-3b and K562 cell lines were exposed to Imatinib and Kidrolase treatments in normoxia or hypoxia for 72 hrs. Viability was assessed by flow cytometry stainings of Annexin V and sytox blue stainings (n=3).

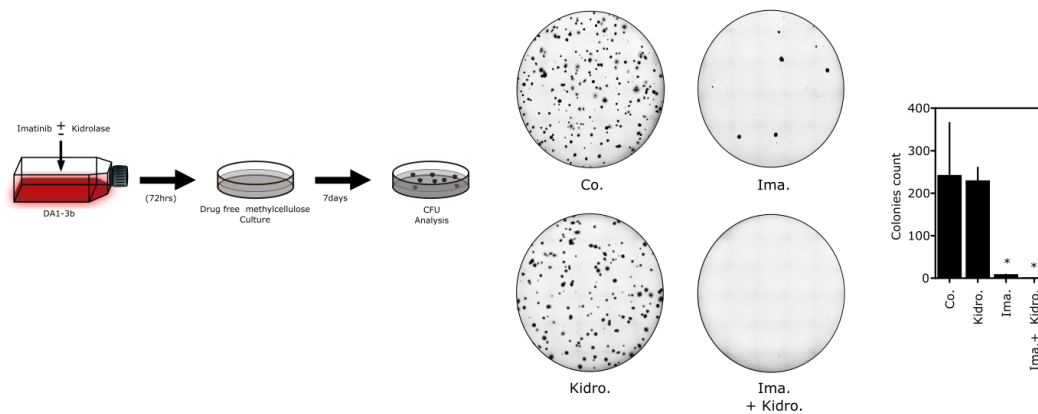
A Set-up of tumoral dormancy model *In vitro* treatments



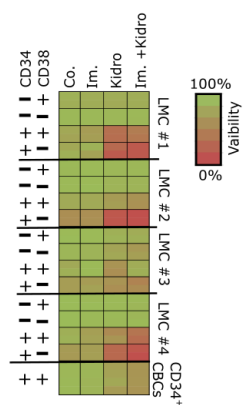
B



C



D



E

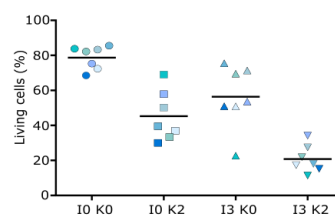
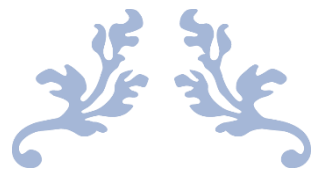


Figure 5 – TKI and L-Asparaginase combination increases chemosensitivity in different models of TKI resistance. (A) Schematic representation of tumor dormancy model set up and treatments on leukemic dormant cells d60 and d365. (B) DA1-3b, DA1-3b/d60 and DA1-3b/d365 cells were treated by Imatinib and Kidrolase for 48 hrs and cell death was assessed using flow cytometry analysis of annexin V and PI stainings. (C) Schematic representation of colony forming cell (CFC) assay set up (see materials and methods for more details) (left panel). DA1-3b cells were treated in vitro with Imatinib (1 μ M) and Kidrolase (2 UI/ml) for 72 hrs. Cells were then seeded in semi-solid medium and left to incubate for 7 more days. Images representative of 3 experiments are shown (middle panel). The clonogenic potential of leukemic cells after undergoing treatments are shown by colonies count (right panel). (D) Assessment of CD34 and CD38 primary leukemic cell sub-population viability from CML patients (n=2) and CD34⁺ progenitors from cord blood cells (CBCs) (n=3), after 48hrs exposure to Imatinib (3 μ M) and Kidrolase (2 UI/ml) treatments. (E) Viability of CD34⁺ cells isolated from CML patient cytopheresis treated with Imatinib and Kidrolase for 48 hrs (n=7).

Supplemental data

	Antibodies	Indicated	References
Glycolytic enzymes	GLUT1	GLUT1	SC-377228
	GLUT6	GLUT6	SC-48171
	Hexokinase 2	HK2	28675
	Aldolase B	Aldo B	SC-393278
	Phosphoglycerate mutase	PGAM	SC-67756
	Phosphoglycerate kinase	PGK	SC-23805
	Enolase	Enolase	SC-31857
	Pyruvate kinase M2	PKM2	31985
Normalization	Actin	Actin	SC-47778
Anti and pro-apoptotic proteins	Bcl-XL	Bcl-XL	SC-1041
	Bcl-2	Bcl-2	SC-783
	BIM	BIM-EL	28195
		BIM-L	
		BIM-S	
	Bax	Bax	SC-493
	Bad	Bad	SC-7869
	PARP-1	PARP-1	SC-8007

Table 1 – List of glycolytic enzymes, anti- and pro-apoptotic proteins antibodies for immunoblotting.



ARTICLE 4

RÉSUMÉ ARTICLE 4

Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors

En plus de son influence sur la survie, la croissance, la prolifération, l'invasion et la métastase, le métabolisme des cellules cancéreuses permet d'influencer les réponses cellulaires aux thérapies ciblées. Dans cet article, nous avons revu les avancées récentes mettant en lumière les effets métaboliques des inhibiteurs de BRAF et de MEK dans le mélanome, et avons discuté des possibles mécanismes impliqués dans la manière dont le métabolisme influence la mort cellulaire de cellules de mélanome et la résistance aux inhibiteurs de RAF et de MEK. Nous avons également souligné quelles sont les perspectives thérapeutiques en termes de combinaisons innovantes de médicaments.

Les différents travaux publiés montrent que les BRAFi et MEKi inhibent la glycolyse aérobie et induisent de hauts niveaux de stress métaboliques conduisant à la mort cellulaire par apoptose dans les cellules de mélanome BRAF mutées. Une augmentation du métabolisme mitochondrial est alors nécessaire pour survivre aux inhibiteurs de la voie MAPK/ERK et la sous-population de cellules survivant à ces inhibiteurs est caractérisée par un phénotype OXPHOS mitochondrial. Par conséquent, l'utilisation d'inhibiteurs mitochondriaux pourrait être combinée à des inhibiteurs oncogéniques de la voie MAPK/ERK afin d'améliorer l'efficacité des thérapies ciblées.

Puisque le métabolisme est un composant clé de la réponse de cellules de mélanome aux BRAFi et MEKi, le ciblage mitochondrial pourrait offrir de nouvelles approches thérapeutiques pour pallier à l'addiction mitochondriale qui limite l'efficacité des BRAFi et MEKi. Ces approches thérapeutiques pourraient être rapidement applicables dans des situations cliniques.



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - General Subjects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen

Review

Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors



Philippe Marchetti^{a,b,c,*}, Anne Trinh^{a,b}, Raeeeka Khamari^{a,b}, Jerome Kluza^{a,b}

^a Inserm UMR-S 1172, Faculté de Médecine, Université de Lille, 1, Place Verdun, 59045 Cedex, France

^b SIRIC ONCOLILLE, France

^c Banque de Tissus Centre Hospitalier Régional et Universitaire CHRU Lille, Lille Cedex, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Synthetic lethality
Mitochondria
Targeted therapy
Stem cell
Dormancy
Dormant cells
Persistent cells

ABSTRACT

Background: Besides its influence on survival, growth, proliferation, invasion and metastasis, cancer cell metabolism also greatly influences the cellular responses to molecular-targeted therapies.

Scope of the review: To review the recent advances in elucidating the metabolic effects of BRAF and MEK inhibitors (clinical inhibitors of the MAPK/ERK pathway) in melanoma and discuss the underlying mechanisms involved in the way metabolism can influence melanoma cell death and resistance to BRAF and MEK inhibitors. We also underlined the therapeutic perspectives in terms of innovative drug combinations.

Major conclusion: BRAF and MEK inhibitors inhibit aerobic glycolysis and induce high levels of metabolic stress leading to effective cell death by apoptosis in BRAF-mutated cancer cells. An increase in mitochondrial metabolism is required to survive to MAPK/ERK pathway inhibitors and the sub-population of cells that survives to these inhibitors are characterized by mitochondrial OXPHOS phenotype. Consequently, mitochondrial inhibition could be combined with oncogenic “drivers” inhibitors of the MAPK/ERK pathway for improving the efficacy of molecular-targeted therapy.

General significance: Metabolism is a key component of the melanoma response to BRAF and/or MEK inhibitors. Mitochondrial targeting may offer novel therapeutic approaches to overwhelm the mitochondrial addiction that limits the efficacy of BRAF and/or MEK inhibitors. These therapeutic approaches might be quickly applicable to the clinical situation.

1. Introduction: heterogeneity and adaptability of cancer cell metabolism

One prominent characteristic of cancer cell metabolism is the wide heterogeneity of metabolic phenotypes encountered in tumors. In the last decades, the analyses of cancer cell metabolism showed that glucose was the major fuel for cancer cell proliferation confirming Otto Warburg's observations in the 50's [1]. Beyond this classic glycolytic phenotype, various primary cancer cells as well as cancer cell lines show additions to other carbon sources such as glutamine or fatty acid. In numerous cancer cells, glutamine and fatty acid are oxidized in mitochondria for energy production and/or anabolism defining a mitochondrial **oxidative** (or OXPHOS) phenotype in addition to the

original glycolytic phenotype.

Another remarkable feature is the fact that the metabolic profile of cancer cell is a dynamic one [2]. Furthermore, cancer progression from the primary neoplasm to metastasis needs mitochondrial metabolism [3,4]. That means that metabolic networks change constantly to adapt cancer cells to external signals (harsh conditions including hypoxia or nutrient deprivation of the tumor microenvironment) and internal signals (mostly the aberrant signaling regulated by oncogenes and/or tumor suppressors). As a result, metabolic rheostats such as the hypoxia-inducing transcription factor-1 alpha (HIF-1 α) [5] and the AMP-activated protein kinase (AMPK) [6] are activated to balance glycolysis and mitochondrial activity in response to anabolic and energetic needs. Thus, the metabolism is integrated to the regulatory networks that drive

Abbreviations: MAPK, mitogen-activated protein kinase; BRAF, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1; MEK, mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; HIF-1 α , hypoxia inducible factor 1 alpha; AMPK, AMP activated protein kinase; LDHA, lactate dehydrogenase A; MITF, microphthalmia-associated transcription factor; PGC1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; PDK, pyruvate dehydrogenase kinase; DRP-1, dynamin-related protein 1; FDG, 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose; PET/CT, positron emission tomography and x-ray computed tomography; ER, endoplasmic reticulum; UPR, unfolded protein response; LKB1, liver kinase B1; ULK1, Unc-51 like autophagy activating kinase; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; NMR, nuclear magnetic resonance; EGFR, epidermal growth factor receptor; COT, cancer Osaka thyroid; JARID 1B, Jumonji AT-rich interactive domain 1B; PI3K, Phosphatidylinositol 3-kinase

* Corresponding author at: IRCL - INSERM UMR S-1172, 1, Place Verdun, F-59045 Lille Cedex, France.

E-mail address: philippe.marchetti@inserm.fr (P. Marchetti).

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.01.018>

Received 27 September 2017; Received in revised form 19 January 2018; Accepted 23 January 2018
0304-4165/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

cancer cell fate decisions leading to survival, proliferation or death.

2. The MAPK/ERK pathway adapts cell metabolism to promote growth and proliferation

The underlying genetic background largely contributes to the determination of the metabolic profile that influences cancer cell fate (for review [7]). Oncogenic mutation reprograms cellular metabolism to sustain cell survival, a high rate of cellular growth and proliferation regardless of external conditions. There are striking evidence that oncogenic drivers impose a distinct metabolic signature of cancer cells to meet energetic and anabolic demands of cell growth and intense proliferation. Numerous driver mutations have been identified in melanoma including BRAF, NRAS, KIT, GNAQ, GNA11, NF1 and telomerase [8]. Most of them activate the RAF-MEK-ERK signaling pathway (designed MAPK/ERK pathway), one of the best described mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade in melanoma [9]. Mutationally activated B-RAF, such as the mutant BRAFV600E, is present in approximately 50% of melanoma cases and in a lower percentage in several solid tumors [10]. The presence of the BRAFV600E mutation leads constitutively to the phosphorylation of the dual-specificity kinases MEK1 and MEK2, driving ERK1 and ERK2 activation to promote cell growth and proliferation.

Interestingly, the activation of the MAPK/ERK pathway significantly increases the expression of glucose transporters as well as numerous glycolytic genes, resulting in a classical glycolytic phenotype providing substrates required to build new cells (for review see [9,11]). Ectopic overexpression of BRAFV600E increases the expression of metabolic genes including those coding lactate dehydrogenase A (LDHA), the key enzyme for the final step of the aerobic glycolysis and pentose phosphate pathway enzymes [12]. The mechanisms responsible for the way mutated BRAF elicits aerobic glycolysis involve the control glycolytic genes expression by combining three transcription factors including HIF-1 α , Myc and MondoA [1,13]. In this cellular context, many glycolysis intermediates are used as building blocks to support macromolecule synthesis.

Besides the increase in aerobic glycolysis, mutated BRAF also actively represses mitochondrial OXPHOS *via* several mechanisms. It is well established that a subset of melanoma tumors, expressing the melanocyte lineage factor MITF that drives the expression of PGC1 α (the central co-activator of mitochondrial biogenesis) is characterized by higher rates of mitochondrial OXPHOS [2,14]. Oncogenic BRAF mutants negatively control the MITF-PGC1 α axis and thus decrease the mitochondrial oxidative metabolism [3,4,15]. Another distinct mechanism responsible for the low mitochondrial oxidation in BRAF mutated cells is the expression of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK). Indeed, BRAF mutated melanoma cells are characterized by a high level of HIF-1 α expression and its downstream target PDK [5,16,17]. It is well known that the HIF-1 α /PDK axis acts as a crucial inhibitor of mitochondrial function in melanoma since PDK strictly controls the pyruvate dehydrogenase (PDH) activity, *i.e.* the mitochondrial gatekeeper for oxidation of glucose-derived pyruvate [9,17]. In addition, a key feature of BRAF mutated cancers is the disruption of mitochondrial dynamics. Thus, aberrant activation of the MAPK/ERK signaling pathway increases the expression and phosphorylation-dependent activity of the dynamin related-protein 1 (DRP-1) leading to mitochondrial fission and decreased respiration [7,18,19]. Apart from the metabolic effects described above, oncogenic BRAF also promotes the synthesis of the ketone body acetoacetate, through the expression of the ketogenic enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase. Interestingly, acetoacetate favors the BRAFV600E/MEK interaction and activation of ERK, thereby creating a positive feedback loop stimulating proliferation [9,20].

Given the aforementioned evidence of the influence of oncogenic MAPK/ERK signaling pathway on the metabolic switch from mitochondrial OXPHOS to glycolysis *i.e.* the Warburg effect, it is not

surprising that metabolism influenced by MAPK/ERK pathways clinical inhibitors (*i.e.* molecular-targeted therapies such as BRAF and/or MEK inhibitors). In addition, the metabolic profile of cancer cells can also influence the cellular responses to molecular-targeted therapies.

In this review, we addressed the recent developments on (i) the metabolic stress induced by MAPK/ERK pathway inhibitors, (ii) the metabolic signature of cancer cells resistant to MAPK inhibitors (iii) and finally we focused on the perspective of innovative drug combinations able to induce anti-metabolic cooperativity and eventually kill cancer cells in this context.

3. BRAF and MEK inhibitors promote metabolic stress mediated-apoptosis

Drugs that target the MAPK/ERK pathway have profoundly changed the landscape of melanoma therapy [10,21]. Selective inhibitors of the BRAF mutant protein alone (such as vemurafenib (PLX4032) and dabrafenib (GSK2118436)) or inhibitors of its downstream kinase, MEK, (*e.g.* MEK inhibitors, cobimetinib, trametinib, selumetinib) are effective in slowing the progression of BRAF V600E mutant melanomas, which are strictly dependent on the MAPK/ERK pathway for growth and survival. As previously demonstrated, BRAF mutant inhibitors decrease glucose uptake and the subsequent glycolysis, a situation correlated with the inhibition of the MAPK/ERK cascade [9,22] [11,13]. MEK inhibitors also reduce lactate production mainly through the inhibition of Hexokinase 2 in BRAF mutated melanoma [12,23]. In fact, it seems reasonable to think that the inhibition of glucose metabolism could be an effective response to BRAF or MEK inhibitors. Indeed, there is a positive correlation between the degree of glycolysis dependence and sensitivity to BRAF or MEK inhibition *in vitro* [17,24]. Consistently, the respiration-incompetent variant cell lines (*a.k.a.* ρ^0 cells), which largely depend on aerobic glycolysis for survival [25], exhibit increased sensitivity to BRAF and MEK inhibition [17,24]. Furthermore, the positron emission tomography-computed tomography with fluorine 18 (^{18}F) fluorodeoxyglucose (FDG PET/CT) imaging, routinely used in oncology practice, allows the *in vivo* quantification of glucose metabolism in tumors. FDG-PET/CT imaging done before and after treatment with BRAF and MEK inhibitors highlights that glucose uptake inhibition occurs shortly after starting therapy and that glycolysis inhibition is correlated with a good prognosis for patients with BRAF mutant melanomas [26]. Altogether these results suggest that glycolysis inhibition could contribute to the anticancer effects of BRAF and/or MEK inhibitors.

There is increasing evidence that, similarly to other antineoplastic drugs, BRAF and MEK inhibitors induce high levels of metabolic stress characterized by glycolysis inhibition reducing the growth and viability of cells that usually require glucose to proliferate [27]. Mechanistically, the reduction in glucose uptake and glycolysis appears to be related to the decrease in cell volume, a direct consequence of the inhibition of protein translation induced by BRAF inhibition [22]. Interestingly, BRAF inhibitors not only regulate glucose metabolism but also affects glycine, myo-inositol, and lipid metabolism [28].

In cancer cells, stresses elicited by kinase inhibitors coexist with different intensities and interact with each other to form a complex network of signaling pathways, culminating in cell death under the influence of the cell context. The mechanisms involved in the way stress conditions can cooperate to kill cells upon kinase inhibition remain largely unknown. It seems plausible that the inhibition of glucose uptake and glycolysis mediated by oncogenic kinase inhibitors could lead to intense energy stress. However, the energy crisis promoted by kinase inhibitors is often less severe than expected. Thus, BRAF inhibition does not result in an extreme energy drop as evidenced by the sustained level of ATP in melanoma cells exposed to vemurafenib [29]. Overall, it seems that this energetic compromise does not play a crucial role in the initiation of cell death induced by kinase inhibitors. The absence of energetic collapse suggests the existence of compensatory pathways for the loss of glucose-dependent ATP production in cancer cells exposed to

kinase inhibitors (see below).

As previously demonstrated, the inhibition of oncogenic MAPK/ERK cascade triggers ER stress and subsequently activates the Unfolded Protein Response (UPR), which, if stress persists, results in cell death. Since inhibition of glycolysis with 2DG induces endoplasmic reticulum (ER) stress and subsequent mitochondrial-dependent apoptosis [30] one might be tempted to speculate that BRAF and MEK inhibitors activate ER stress through the induction of low glucose conditions. Indeed, non-selective multiple kinase inhibitors, as well as BRAF and MEK inhibitors, are potent inducers of ER stress-mediated apoptosis [17,31,32]. BRAF and MEK inhibitors mainly activate the PERK/eIF2 α pathway, one of the three branches of the UPR, contributing to the initiation of the BIM-dependent mitochondrial apoptotic pathway [17,32]. Overall, MAPK/ERK cascade inhibitors might inhibit glycolysis and then induce ER stress, which in turn could lead to cell death by apoptosis. Alternatively, MAPK/ERK signaling pathways inhibitors could increase the cytosolic concentrations of calcium, a potential trigger for ER stress, leading to apoptosis [32].

4. Mitochondrial oxidative phenotype and cytoprotective autophagy allow cancer cells to survive in the presence of BRAF and MEK inhibitors

Upon inhibition of the MAPK/ERK signaling pathway, only few cells undergo apoptosis and most of the remaining cells survive and enter cell cycle arrest. These drug-persistent cells may be prone to acquiring resistance by giving cancer cells the time to develop and accumulate mutations. This observation raises this fundamental question: How cells that persist in the presence of BRAF and MEK inhibitors can survive the inhibition of glycolysis and subsequent metabolic stress? At least two non-exclusive possibilities might explain this survival mechanism: the occurrence of cytoprotective autophagy and the mitochondrial oxidative phenotype of drug-tolerant cells.

4.1. Cytoprotective autophagy

In melanoma, ER stress induced by BRAF inhibitors does not always promote cell death, but it can also mediate cytoprotective autophagy [33]. Thus, upon exposure to BRAF inhibitors, quickly the BRAF mutants bind to the ER gatekeeper GRP78 activating a PERK-dependent stress response and thereby causing cytoprotective autophagy. This cytoprotective response can be seen as a potential adaptive resistance mechanism to BRAF and MEK inhibitors [33].

Moreover, various stress sensors that detect cellular stresses induced by oncogenic kinase inhibitors could also activate protective signals and induce autophagy. One crucial sensor of cellular stresses elicited by oncogenic kinase inhibitors is determined by the Liver kinase B (LKB1)/AMPK pathway, which is activated by energy drop and other stressful stimuli including oxidative stress. Thus, once activated the AMPK shifts the metabolic conditions from anabolism to catabolic processes (reviewed in [34]). The oncoprotein BRAFV600E suppresses AMPK activity through ERK-dependent phosphorylation of LKB1 at S325 and S428 sites. This inhibition of the LKB1/AMPK pathway by BRAFV600E is critical for melanoma cell growth and proliferation [35]. Pharmacological inhibition of BRAFV600E relieves the negative feedback regulation on LKB1 and thereby provides “metabolic rescue” by activating compensatory signals including glycolysis increase and cytoprotective autophagy. Thus, as previously shown BRAF inhibition fully activates the AMPK contributing to the survival of BRAFV600E colorectal carcinoma [36] as well as melanoma [37]. Upon exposure to BRAF inhibitors, the AMPK stimulates autophagy by inhibiting mTORC1 at the level of Raptor or directly by the phosphorylation of ULK1, which is an autophagy initiation kinase [36]. Thus, autophagy could constitute a compensatory cytoprotective pathway contributing to the survival of cancer cells exposed to kinase inhibitors.

4.2. Mitochondrial oxidative phenotype

A high dependence on mitochondrial oxidative metabolism [38] could also explain how cancer cells survive to glycolysis inhibition induced by BRAF and MEK inhibitors. It is well established that cells that survive to the pharmacological and genetic inhibition of BRAF or MEK display a mitochondrial oxidative phenotype. This metabolic profile can be considered as an attempt to maintain ATP level and escape cell death despite glycolysis inhibition [12,15,17,39,40]. In addition, NMR spectroscopy studies performed on melanoma cells exposed to BRAF inhibitors, showed that mitochondria re-route pyruvate to the anaplerotic flux via pyruvate carboxylase activity [28]. In these conditions, the mitochondrial phenotype confers a selective growth advantage under metabolic stress conditions [28].

One proposed mechanism underlying the mitochondrial phenotype encountered in drug-tolerant cells is the enhancement of mitochondrial content per cell [15,17]. Elevation of mitochondrial biogenesis due to the inhibition of the MAPK/ERK signaling pathway is a complex process that can be dependent or independent from the transcriptional co-activator, PGC1 α [15,17]. It is well established that in human melanoma cells, a fraction of cells with high MITF and of PGC1 α expression shows intrinsically little dependence on the glycolytic pathway and, conversely relies on mitochondrial metabolism for ATP production [14], possibly through the oxidation of substrates such as glutamine and/or fatty acid [41]. BRAF inhibitors up-regulate the MITF/PGC1 α axis, which in turn activates mitochondrial biogenesis, as well as an oxidative phosphorylation gene program and thereby mitochondrial activity [15]. Apart from its metabolic functions, PGC1 α activates an integrin pathway to suppress melanoma metastasis [42]. Inhibition of BRAF signaling can also alter mitochondrial dynamics resulting in mitochondrial fusion through the loss of the mitochondrial fission factor, DRP-1, a situation characterized by high OXPHOS activity [18]. Another sensible hypothesis is that mitochondria that survive BRAF and MEK inhibitors have a higher oxidative activity. Elevation in mitochondrial oxidation of pyruvate has been documented in melanoma treated with BRAF inhibitors [28]. It is well known that calcium transfer to mitochondria up-regulates oxidative phosphorylation through the activation of several mitochondrial oxidative enzymes [43]. Thus, as a consequence of ER stress, when exposed to BRAF and MEK inhibitors, it triggers a calcium release from ER toward the mitochondrial matrix [17].

Overall, this mitochondrial oxidative phenotype represents the major metabolic profile observed with inhibitors of the MAPK/ERK pathway, which permits cells to avoid cell death [44].

5. The preexisting mitochondrial oxidative phenotype characterizes cells that are resistant to BRAF and MEK inhibitors

Despite the impressive initial responses to MAPK/ERK pathway inhibitors [45], virtually all patients with BRAF mutation relapse because of the acquired resistance to such treatments. Major resistance mechanisms include the occurrence of secondary mutations and/or amplification of several elements of the MAPK/ERK signaling pathway. Thus, NRAS and MEK mutations bypass this inhibition via the activation of receptor tyrosine kinases (e.g., EGFR) and COT, mutant BRAF amplification or alternative splicing [46]. Interestingly, acquired resistant cells present with a high mitochondrial activity and display a high level of glucose uptake and glycolysis, probably due to the reactivation of the MAPK/ERK signaling pathway [13,39]. However, resistant melanoma cells are more dependent on the mitochondrial oxidation of glutamine than on glycolysis for survival and proliferation [47]. Recently, it has been demonstrated that melanoma cells with acquired resistance to BRAF inhibitors remain addicted to the long non-coding RNA SAMMSON that favors mitochondrial OXPHOS [48]. Cells resistant to BRAF inhibitors also produce more ROS, generated as an unavoidable by-product of high mitochondrial activity [5,28,39,49]. Interestingly,

Table 1
Promising mitochondrial druggable targets in cancer resistant to inhibitors of MAPK/ERK pathway.

Mitochondrial targets	Drugs (Phase of development)	Resulting effects on mitochondrial activity	Models	Anticancer effects on stem cells and/or resistant cells	Reference
Electron transport chain	Elesclomol (Clinical trials)	Production of mitochondrial ROS by inhibition of the electron transport flux	- Acquired resistant melanoma cell lines <i>in vitro</i> and in SCID mouse xenografts - Patient-derived xenograft models	Reduction in proliferation and apoptosis in cells resistant to BRAF inhibitor	[17,39]
Electron Transport chain complexes I, II and V	Honokiol (Pre-clinical data)	-Reduction of oxidative phosphorylation and ATP synthesis -Mitochondrial fusion and bioenergetics	Slow-cycling JARID1B high subpopulation of melanoma cells intrinsically resistant to BRAF inhibitors Tested in combination with BRAF inhibitor in BRAF mutant melanoma cell lines	ROS-mediated cell killing n.d.	[55] [40]
Mitochondrial HSP 90	Gamitrinib (Pre-clinical data)	Inhibition of mitochondrial biogenesis	Tested alone or in combination with BRAF inhibitor in melanoma cell lines <i>in vitro</i> and in mouse xenografts -Patient-derived xenograft models	Delays growth of BRAF-mutated melanoma intrinsically resistant to MAPK inhibitors and a subset of acquired resistant BRAF mutant melanoma n.d.	[51] [57]
Electron transport chain complex I	BAY 87–2243 (Pre-clinical data)	Production of mitochondrial ROS by complex I inhibition	Tested in combination with BRAF inhibitor in BRAF mutant melanoma mouse xenografts and patient-derived melanoma mouse models.	n.d.	
Electron transport chain complex I	Phenformin (a biguanide related to metformin) (clinical trials)	Reduction of oxidative phosphorylation and ATP synthesis	Tested in combination with BRAF inhibitors in slow-cycling JARID1B high subpopulation of melanoma cells intrinsically resistant to BRAF inhibitors and in mouse xenografts	Induces cell death and delays the emergence of acquired resistance to BRAF inhibitors	[58] [52]
Electron transport chain complex V	Oligomycin (Pre-clinical data)	Inhibition of ATP synthesis	Tested in combination with BRAF inhibitors in slow-cycling JARID1B high subpopulation of melanoma cells intrinsically resistant to BRAF inhibitors and in mouse xenografts	Induces cell death and delays the emergence of acquired resistance to BRAF inhibitors	[52]
Mitochondrial Redox	Mito-CP and Mito-Q (Preclinical data)	Mitochondrial membrane disruption and ROS production	Tested alone in BRAF-mutated melanoma cell lines <i>in vitro</i> and in mouse xenografts	Induce apoptotic cell death	[56]

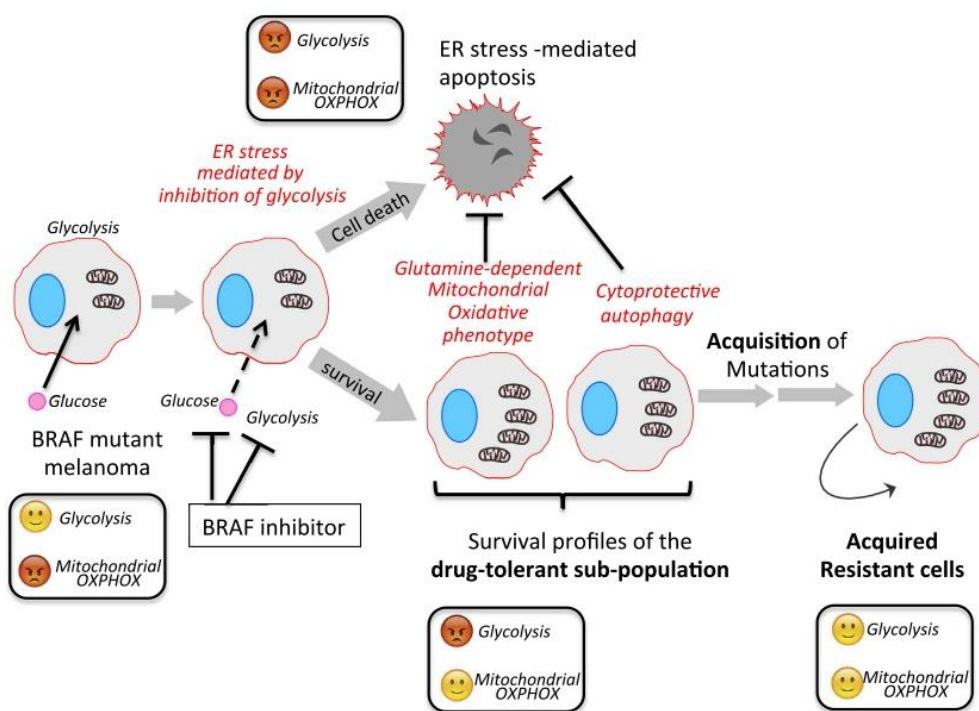


Fig. 1. Model summarizing cell fate and metabolic phenotype regulated by inhibitors of the MAPK/ERK pathway in cancer cells (see text for details).

the mitochondrial oxidative phenotype characterizes resistant cells regardless of the underlying resistance mechanisms [39].

The positive correlation between mitochondrial activity and resistance to MAPK inhibitors brings up two hypotheses: Firstly this metabolic oxidative profile exists prior to treatment with MAPK inhibitors and results from the selection of a pre-existing metabolic state, or the metabolic phenotype results from an adaptive process in response to drug exposure. In support of the selection of a pre-existing metabolic state, melanoma cells that were exposed to drugs and thus are intrinsically resistant to BRAF inhibitors, either alone or in combination with MEK inhibitors present a classic mitochondrial oxidative phenotype [14,50,51]. These cells are characterized by an increased PGC1 α activity resulting in increased mitochondrial mass and overall mitochondrial function [14,50,51]. In line with this, the subpopulation of BRAF-mutated melanoma cells characterized by the expression of the H3K4 demethylase, JARID1B is resistant to BRAF inhibitors [52,53]. The JARID1B high cells possess a slow-cycling “stem cell-like” phenotype and, in terms of metabolism, up-regulate many mitochondrial enzymes making them addicted to mitochondrial OXPHOS for survival. Exposure to BRAF inhibitors enriches melanoma cells in the JARID1B high cells [52]. It appears that the major mechanism resulting in the enrichment of JARID1B high cells is likely a selection process of the pre-existing sub-population with mitochondrial phenotype. Likewise, the genetic ablation of mutant KRAS in a mouse model of pancreatic cancer also selected a subpopulation of “stem cells” that were dependent on mitochondrial activity for survival [54]. Overall, numerous evidence suggest that the mitochondrial oxidative profile is a pre-resistant state selected by inhibitors of the MAPK/ERK pathway although an adaptive process based on a treatment-induced metabolic shift toward mitochondrial oxidative metabolism, cannot be completely ruled out [52].

6. Therapeutic consequences: combination of mitochondrial targeting drugs with MAPK/ERK pathway inhibitors

The mitochondrial addiction of drug-tolerant and/or resistant

subpopulation for survival is a therapeutic opportunity that could be harnessed at two different levels.

Firstly, the mitochondrial oxidative profile of cells resistant to MAPK/ERK pathway inhibitors makes them vulnerable to numerous mitochondrial-targeting drugs. Several and recent studies showed encouraging data supporting this hypothesis (see Table 1 and reviewed recently in [44]). Given the diverse resistance mechanisms to MAPK/ERK pathway inhibition (see above), the identification of mitochondria as a single “drug” target against cancer cells with intrinsic and acquired resistance to MAPK inhibitors, regardless of the mechanisms, may represent a therapeutic advance with potent clinical implications [55]. Numerous drugs directly inhibit mitochondrial activity for killing cancer cells [44]. These include inhibitors of the mitochondrial redox balance [56], inhibitors of mitochondrial translation, inhibitors of mitochondrial enzymes controlling the oxidation of fatty acid or glutamine, inhibitors of mitochondrial electron transport chain [57] and of ATP synthase. However, most of these drugs are not easily translatable to the clinical situation because of their lack of specificity for cancer cells.

Secondly, mitochondrial inhibitors in combination BRAF and/or MEK inhibitors may help curtail the emergence of cancer cells resistant to MAPK/ERK pathway inhibitors. The disruption of mitochondrial functions sensitizes melanoma cells exposed to BRAF and MEK inhibitors [48]. The current approach to improve MAPK/ERK pathway inhibitors involves combining them with mitochondrial targeting drugs to eradicate cancer cells and also decrease the development of drug resistance. The scientific rationale for such a combination is based on the fact that each drug acts on different aspects of the metabolic network. As previously described, MAPK/ERK pathway inhibitors inhibit glycolysis leading to cell death in the sensitive subpopulation of cells, whereas the remaining cells become addicted to mitochondrial activity for survival. Mitochondrial addiction leaves the remaining subpopulation of cells highly sensitive to the anticancer effects of mitochondrial targeting drugs. Thus, these two classes of drugs address the complementary aspects of the metabolism (glycolysis and mitochondrial

oxidation) that neither drug can achieve alone to achieve cell death. Consequently, one of the theoretical benefits of such combination is to overcome the lack of specificity for cancer cells in mitochondrial inhibitors. When combined with MAPK/ERK pathway inhibitors, mitochondrial-targeted drugs should be less toxic since exposure to BRAF and MEK inhibitors specifically increase the sensitivity of BRAF-mutated cells to mitochondrial targeting drugs. Many preclinical studies evidenced that BRAF inhibitors and mitochondrial inhibitors can produce additive or synergistic responses leading to potent anticancer effects [44]. Interestingly, the combination of the mitochondrial complex I, phenformin inhibitor and BRAF inhibitors reduces the emergence of acquired resistance in BRAF mutated melanoma cells as shown in long-term *in vitro* resistance development assays by the reduced growth of resistant colonies and delayed onset of resistance to BRAF inhibitors [58]. The recent development of new mitochondrial drugs targeting different aspects of the mitochondrial metabolism in cancer cells (such as glutaminolysis inhibitors) offers new possibilities for combination drug therapy [59]. Overall, mitochondrial targeting is a promising approach for cancer treatment especially when used in combination with MAPK/ERK pathway inhibitors.

7. Current challenges and perspectives

Compelling evidence obtained from *in vitro* studies and preclinical cancer models demonstrated the pivotal role of metabolic pathways in supporting cancer cell death and survival in response to BRAF and MEK inhibitors. Fig. 1 sums up the current view of how metabolism controls cancer cell fate upon exposure to MAPK/ERK pathway inhibitors. Based on these findings, mitochondria may be a source of new targets for therapeutic interventions notably when combined with BRAF and MEK inhibitors. However, many of the mechanisms involved in these pathways remain unknown. Furthermore, the role of metabolism might not be confined to the response to MAPK/ERK pathway inhibitors. As previously shown mitochondrial metabolism drives tolerance to small molecule inhibitors of PI3K [60]. Therefore, it is important to continue our efforts in order to understand and identify new targets whose inhibition could improve the response to molecular-targeted therapies and overcome the emerging resistance to anticancer drugs.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

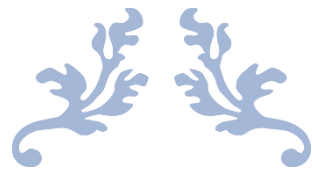
Acknowledgments

This study was supported by INSERM, Université de Lille, SIRIC ONCOLILLE, Ligue contre le Cancer Comité du Nord (7FI12469RPL) (to PM), and by the Association pour l'Etude des Anomalies Congénitales Neurodev funded by Dr. B. Poupard (to PM).

References

- [1] O. Warburg, On the origin of cancer cells, *Science* 123 (1956) 309–314.
- [2] A. Strickaert, M. Saiselet, G. Dom, X. De Deken, J.E. Dumont, O. Feron, P. Sonveaux, C. Maenhaut, Cancer heterogeneity is not compatible with one unique cancer cell metabolic map, *Oncogene* 36 (2017) 2637–2642.
- [3] P.E. Porporato, V.L. Payen, J. Pérez-Escuredo, C.J. De Saedeleer, P. Danhier, T. Copetti, et al., A mitochondrial switch promotes tumor metastasis, *Cell Rep.* 8 (2014) 754–766.
- [4] M.F. Rodrigues, E. Obre, F.H.M. de Melo, G.C. Santos, A. Galina, M.G. Jasiulionis, et al., Enhanced OXPHOS, glutaminolysis and β -oxidation constitute the metastatic phenotype of melanoma cells, *Biochem. J.* 473 (2016) 703–715.
- [5] J. Kluzza, P. Corazao Rozas, Y. Touil, M. Jendoubi, C. Maire, P. Guerreschi, et al., Inactivation of the HIF-1 α /PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants, *Cancer Res.* 72 (2012) 5035–5047.
- [6] R.J. Kishon, C.E. Barnes, A.G. Nichols, S. Cohen, V.A. Gerriets, P.J. Siska, et al., AMPK is essential to balance glycolysis and mitochondrial metabolism to control T-ALL cell stress and survival, *Cell Metab.* 23 (2016) 649–662.
- [7] C.B. Thompson, W. Palm, Reexamining how cancer cells exploit the Body's metabolic resources, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 81 (2017) 67–72.
- [8] E. Shtivelman, M.Q.A. Davies, P. Hwu, J. Yang, M. Lotem, M. Oren, et al., Pathways and therapeutic targets in melanoma, *Oncotarget* 5 (2014) 1701–1752.
- [9] P. Marchetti, P. Guerreschi, J. Kluzza, L. Mortier, Metabolic features of melanoma: a gold mine of new therapeutic targets? *Curr. Cancer Drug Targets* 14 (2014) 357–370.
- [10] H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, et al., Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature* 417 (2002) 949–954.
- [11] M. Hosseini, Z. Kasraian, H.R. Rezvani, Energy metabolism in skin cancers: a therapeutic perspective, *Biochim. Biophys. Acta* 1858 (2017) 712–722.
- [12] A. Hall, K.D. Meyle, M.K. Lange, M. Klima, M. Sanderhoff, C. Dahl, et al., Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the V600EBRAF oncogene, *Oncotarget* 4 (2013) 584–599.
- [13] T.J. Parmenter, M. Kleinschmidt, K.M. Kinross, S.T. Bond, J. Li, M.R. Kaadige, et al., Response of BRAF-mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis, *Cancer Discov.* 4 (2014) 423–433.
- [14] F. Vazquez, J.-H. Lim, H. Chim, K. Bhalla, G. Girnun, K. Pierce, et al., PGC1 α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress, *Cancer Cell* 23 (2013) 287–301.
- [15] R. Haq, J. Shoaq, P. Andreu-Perez, S. Yokoyama, H. Edelman, G.C. Rowe, et al., Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF, *Cancer Cell* 23 (2013) 302–315.
- [16] S.M. Kumar, H. Yu, R. Edwards, L. Chen, S. Kazianis, P. Brafford, et al., Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1 α expression in melanoma, *Cancer Res.* 67 (2007) 3177–3184.
- [17] P. Corazao Rozas, P. Guerreschi, F. André, P.-E. Gabert, S. Lancel, S. Dekioux, et al., Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors, *Oncotarget* 7 (2016) 39473–39485.
- [18] M.N. Serasinghe, S.Y. Wieder, T.T. Renault, R. Elkholi, J.J. Ascioia, J.L. Yao, et al., Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors, *Mol. Cell* 57 (2015) 521–536.
- [19] J.A. Kashatus, A. Nascimento, L.J. Myers, A. Sher, F.L. Byrne, K.L. Hoehn, et al., Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth, *Mol. Cell* 57 (2015) 537–551.
- [20] H.-B. Kang, J. Fan, R. Lin, S. Elf, Q. Ji, L. Zhao, et al., Metabolic rewiring by oncogenic BRAF V600E links Ketogenesis pathway to BRAF-MEK1 signaling, *Mol. Cell* 59 (2015) 345–358.
- [21] J.J. Luke, K.T. Flaherty, A. Ribas, G.V. Long, Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14 (2017) 463–482.
- [22] N. Theodosakis, M.A. Held, A. Marzuka-Alcala, K.M. Meeth, G. Micevic, G.V. Long, R.A. Scolyer, D.F. Stern, M.W. Bosenberg, BRAF inhibition decreases cellular glucose uptake in melanoma in association with reduction in cell volume, *Mol. Cancer Ther.* 14 (2015) 1680–1692.
- [23] M. Falck Miniotis, V. Arunan, T.R. Eykyn, R. Marais, P. Workman, M.O. Leach, et al., MEK1/2 inhibition decreases lactate in BRAF-driven human cancer cells, *Cancer Res.* 73 (2013) 4039–4049.
- [24] K.N. Hardeman, C. Peng, B.B. Paudel, C.T. Meyer, T. Luong, D.R. Tyson, et al., Dependence on glycolysis sensitizes BRAF-mutated melanomas for increased response to targeted BRAF inhibition, *Sci. Rep.* 7 (2017) 42604.
- [25] P. Marchetti, N. Zamzami, S.A. Susin, P.X. Petit, G. Kroemer, Apoptosis of cells lacking mitochondrial DNA, *Apoptosis* 1 (1996) 119–125.
- [26] R.J. Schmitt, S.M. Kreidler, D.H. Glueck, R.N. Amaria, R. Gonzalez, K. Lewis, et al., Correlation between early 18F-FDG PET/CT response to BRAF and MEK inhibition and survival in patients with BRAF-mutant metastatic melanoma, *Nucl. Med. Commun.* 37 (2016) 122–128.
- [27] V.M. Gohil, S.A. Sheth, R. Nilsson, A.P. Wojtovich, J.H. Lee, F. Perocchi, et al., Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis, *Nat. Biotechnol.* 28 (2010) 249–255.
- [28] T. Delgado-Goni, M.F. Miniotis, S. Wantuch, H.G. Parkes, R. Marais, P. Workman, M.O. Leach, M. Belouche-Babari, The BRAF inhibitor vemurafenib activates mitochondrial metabolism and inhibits hyperpolarized pyruvate-lactate exchange in BRAF-mutant human melanoma cells, *Mol. Cancer Ther.* 17 (2016) 2987–2999.
- [29] C. Abildgaard, C. Dahl, A.L. Basse, T. Ma, P. Guldborg, Bioenergetic modulation with dichloroacetate reduces the growth of melanoma cells and potentiates their response to BRAFV600E inhibition, *J. Transl. Med.* 12 (2014) 247.
- [30] O. Zagorodna, S.M. Martin, D.T. Rutkowski, T. Kuwana, D.R. Spitz, C.M. Knudson, 2-Deoxyglucose-induced toxicity is regulated by Bcl-2 family members and is enhanced by antagonizing Bcl-2 in lymphoma cell lines, *Oncogene* 31 (2012) 2738–2749.
- [31] M. Rahmani, E.M. Davis, T.R. Crabtree, J.R. Habibi, T.K. Nguyen, P. Dent, et al., The kinase inhibitor sorafenib induces cell death through a process involving induction of endoplasmic reticulum stress, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 5499–5513.
- [32] D. Beck, H. Niessner, K.S.M. Smalley, K. Flaherty, K.H.T. Paraiso, C. Busch, et al., Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAFV600E melanoma cells, *Sci. Signal.* 6 (2013) ra7.
- [33] X.-H. Ma, S.-F. Piao, S. Dey, Q. McAffee, G. Karakousis, J. Villanueva, et al., Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 1406–1417.
- [34] L. Iommarini, A. Ghelli, G. Gasparre, A.M. Porcelli, Mitochondrial metabolism and energy sensing in tumor progression, *Biochim. Biophys. Acta* 1858 (2017) 582–590.
- [35] G.M. Fischer, Y.N. Vashisht Gopal, J.L. McQuade, W. Peng, R.J. DeBerardinis, M.A. Davies, Metabolic strategies of melanoma cells: mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications, *Mol. Cell* 116 (2009) 237–247.

- [36] T. Sueda, D. Sakai, K. Kawamoto, M. Konno, N. Nishida, J. Koseki, et al., BRAF V600E inhibition stimulates AMP-activated protein kinase-mediated autophagy in colorectal cancer cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 18949.
- [37] S. Sanduja, Y. Feng, R.A. Mathis, E.S. Sokol, F. Reinhardt, R. Halaban, et al., AMPK promotes tolerance to Ras pathway inhibition by activating autophagy, *Oncogene* 35 (2016) 5295–5303.
- [38] V. De Rosa, F. Iommelli, M. Monti, R. Fonti, G. Votta, M.P. Stoppelli, et al., Reversal of Warburg effect and reactivation of oxidative phosphorylation by differential inhibition of EGFR signaling pathways in non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 21 (2015) 5110–5120.
- [39] P. Corazao Rozas, P. Guerreschi, M. Jendoubi, F. André, A. Jonneaux, C. Scalbert, et al., Mitochondrial oxidative stress is the Achilles' heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor, *Oncotarget* 4 (2013) 1986–1998.
- [40] A.P. Trotta, J.D. Gelles, M.N. Serasinghe, P. Loi, J.L. Arbiser, J.E. Chipuk, Disruption of mitochondrial electron transport chain function potentiates the proapoptotic effects of MAPK inhibition, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 11727–11739.
- [41] Z. Tan, X. Luo, L. Xiao, M. Tang, A.M. Bode, Z. Dong, et al., The role of PGC1 α in cancer metabolism and its therapeutic implications, *Mol. Cancer Ther.* 15 (2016) 774–782.
- [42] C. Luo, J.-H. Lim, Y. Lee, S.R. Granter, A. Thomas, F. Vazquez, H.R. Widlund, P. Puigserver, A PGC1 α -mediated transcriptional axis suppresses melanoma metastasis, *Nature* 537 (2016) 422–426.
- [43] C. Cárdenas, M. Müller, A. McNeal, A. Lovy, F. Jaña, G. Bustos, et al., Selective vulnerability of cancer cells by inhibition of Ca(2+) transfer from endoplasmic reticulum to mitochondria, *Cell Rep.* 14 (2016) 2313–2324.
- [44] P. Marchetti, P. Guerreschi, L. Mortier, J. Kluz, Integration of mitochondrial targeting for molecular cancer therapeutics, *Int. J. Cell Biol.* 2015 (2015) 283145.
- [45] E. Simeone, A.M. Grimaldi, L. Festino, V. Vanella, M. Palla, P.A. Ascierto, Combination treatment of patients with BRAF-mutant melanoma: a new standard of care, *BioDrugs* 31 (2017) 51–61.
- [46] T. Amaral, T. Sinnberg, F. Meier, C. Krepler, M. Levesque, H. Niessner, C. Garbe, MAPK pathway in melanoma part II-secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition, *Eur. J. Cancer* 73 (2017) 93–101.
- [47] F. Baenke, B. Chaneton, M. Smith, N. Van Den Broek, K. Hogan, H. Tang, et al., Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells, *Mol. Oncol.* 10 (2016) 73–84.
- [48] E. Leucci, R. Vendramin, M. Spinazzi, P. Laurette, M. Fiers, J. Wouters, et al., Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON, *Nature* 531 (2016) 518–522.
- [49] G. Cesi, G. Walbrecq, A. Zimmer, S. Kreis, C. Haan, ROS production induced by BRAF inhibitor treatment rewires metabolic processes affecting cell growth of melanoma cells, *Mol. Cancer* 16 (2017) 102.
- [50] Y.N.V. Gopal, H. Rizos, G. Chen, W. Deng, D.T. Frederick, Z.A. Cooper, et al., Inhibition of mTORC1/2 overcomes resistance to MAPK pathway inhibitors mediated by PGC1 α and oxidative phosphorylation in melanoma, *Cancer Res.* 74 (2014) 7037–7047.
- [51] G. Zhang, D.T. Frederick, L. Wu, Z. Wei, C. Krepler, S. Srinivasan, et al., Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors, *J. Clin. Invest.* 126 (2016) 1834–1856.
- [52] A. Roesch, A. Vultur, I. Bogeski, H. Wang, K.M. Zimmermann, D. Speicher, et al., Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells, *Cancer Cell* 23 (2013) 811–825.
- [53] I. Zubrilov, O. Sagi-Assif, S. Izraely, T. Meshel, S. Ben-Menahem, R. Ginat, et al., Vemurafenib resistance selects for highly malignant brain and lung-metastasizing melanoma cells, *Cancer Lett.* 361 (2015) 86–96.
- [54] A. Viale, P. Pettazzoni, C.A. Lyssiotis, H. Ying, N. Sánchez, M. Marchesini, et al., Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function, *Nature* 514 (2014) 628–632.
- [55] M. Cierlitz, H. Chauvistré, I. Bogeski, X. Zhang, A. Hauschild, M. Herlyn, et al., Mitochondrial oxidative stress as a novel therapeutic target to overcome intrinsic drug resistance in melanoma cell subpopulations, *Exp. Dermatol.* 24 (2015) 155–157.
- [56] S.-K. Hong, D. Starenki, P.-K. Wu, J.-I. Park, Suppression of B-RafV600E melanoma cell survival by targeting mitochondria using triphenyl-phosphonium-conjugated nitroxide or ubiquinone, *Cancer Biol. Ther.* 18 (2017) 106–114.
- [57] L. Schöckel, A. Glasauer, F. Basit, K. Bitschar, H. Truong, G. Erdmann, et al., Targeting mitochondrial complex I using BAY 87-2243 reduces melanoma tumor growth, *Cancer Metab.* (2015) 1–16.
- [58] P. Yuan, K. Ito, R. Pérez-Lorenzo, C. Del Guzzo, J.H. Lee, C.-H. Shen, et al., Phenformin enhances the therapeutic benefit of BRAF(V600E) inhibition in melanoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 18226–18231.
- [59] B.J. Altman, Z.E. Stine, C.V. Dang, From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* 16 (2016) 619–634.
- [60] J.C. Ghosh, M.D. Siegelin, V. Vaira, A. Favarsani, M. Tavecchio, Y.C. Chae, et al., Adaptive mitochondrial reprogramming and resistance to PI3K therapy, *J. Natl. Cancer Inst.* 107 (2015).



DISCUSSION

En 1956, Otto Warburg avait montré que les cellules cancéreuses utilisent la glycolyse pour leur métabolisme, et ce même en présence d'O₂, un mécanisme qui sera connu sous le nom d'effet Warburg ou de glycolyse aérobie. Il avait alors émis l'hypothèse que cette observation pouvait être due à un dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial (Warburg O, 1956). De nombreux travaux ont à ce jour montré que le métabolisme mitochondrial était toujours fonctionnel, et qu'il contribuait activement aux différentes caractéristiques tumorigéniques citées par Hanahan et Weinberg, telle que la prolifération, la survie (Hanahan D et Weinberg RA, 2011).

L'apparition de thérapies ciblées a révolutionné les traitements des cancers présentant des oncogènes pouvant être ciblés, en partie en induisant des effets anti-métaboliques conduisant à la mort cellulaire. Cependant, bien qu'efficaces contre les cellules proliférantes, les thérapies ciblées telles que le Vemurafenib dans le mélanome muté BRAF^{V600E} ou l'Imatinib dans la LMC, échouent à éliminer toutes les cellules cancéreuses. La persistance des cellules cancéreuses sous traitements anticancéreux, notamment les cellules souches cancéreuses telle que la sous-population JARID1B^{hi} cyclant lentement dans le mélanome (Roesch A et al., 2013), représente une problématique primordiale, puisqu'elles peuvent perdurer chez l'hôte pendant plusieurs mois, voire années, accumuler des mutations et proliférer à nouveau, induisant des rechutes chez les patients. Dans les LMC, en dépit de l'inhibition de l'activité de BCR-Abl, les CSLs restent insensibles à l'Imatinib (Corbin AS et al., 2011).

Le ciblage des CSCs représente donc un enjeu thérapeutique majeur, et de nombreux travaux ont évalué l'implication du métabolisme dans la persistance et la résistance de ces cellules aux différents traitements anticancéreux. Nos travaux ont montré le rôle essentiel du métabolisme mitochondrial dans la survie des cellules cancéreuses, au travers de la lutte contre le stress réticulaire et le stress oxydant pour survivre, mais également dans la lutte contre le stress nutritif induit par les thérapies ciblées, en utilisant des voies métaboliques compensatoires.

Afin de déterminer comment cibler les failles métaboliques des cellules cancéreuses sous traitements anticancéreux, il est donc important de comprendre dans un premier temps par quels mécanismes les cellules cancéreuses échappent aux traitements.

1. Cibler les dysfonctions mitochondriales pour cibler les cellules cancéreuses

Dans des modèles de cancers présentant des *oncogene drivers* tels que le mélanome muté BRAF^{V600E} et la LMC BCR-Abl⁺, notre équipe et d'autres ont montré l'implication du métabolisme mitochondrial dans la survie des cellules cancéreuses sous thérapies ciblées. Dans des conditions non traitées, la majorité des cellules cancéreuses présentent un phénotype Warburg, *i.e* une glycolyse aérobie leur permettant de proliférer de manière anarchique. Dans le cas du mélanome, la présence de BRAFV600E permet de stimuler l'activité glycolytique et d'inhiber l'O₂PHOS mitochondrial (Trinh A et al., 2018).

Dans la majorité des cellules de mélanome, le traitement aux BRAFi conduit à l'inhibition de la glycolyse et de l'OXPPOS mitochondrial, à un stress réticulaire et à une apoptose mitochondriale subséquente (Corazao-Rozas P et al., 2016). Cependant, certaines cellules peuvent continuer de proliférer et de survivre sous BRAFi au travers du métabolisme oxydatif mitochondrial, notamment au travers d'une addiction à la glutamine (Baenke F et al., 2016), mais également grâce à un mécanisme de résistance adaptatif impliquant une autophagie cytoprotective (Mahon XH et al., 2014). Il a été montré que la présence de cette sous-population OXPPOS tolérante aux BRAFi participe aux rechutes chez les patients, puisqu'après l'acquisition d'un certain nombre de mutations secondaires, ces cellules peuvent à nouveau proliférer (Amaral T et al., 2017). L'apparition de mutations permet alors à ces cellules de devenir insensibles aux BRAFi, et ces cellules sont capables de se reposer sur la glycolyse et l'OXPPOS mitochondrial pour leur métabolisme (**figure 36**) (revue par Marchetti P et al., 2018).

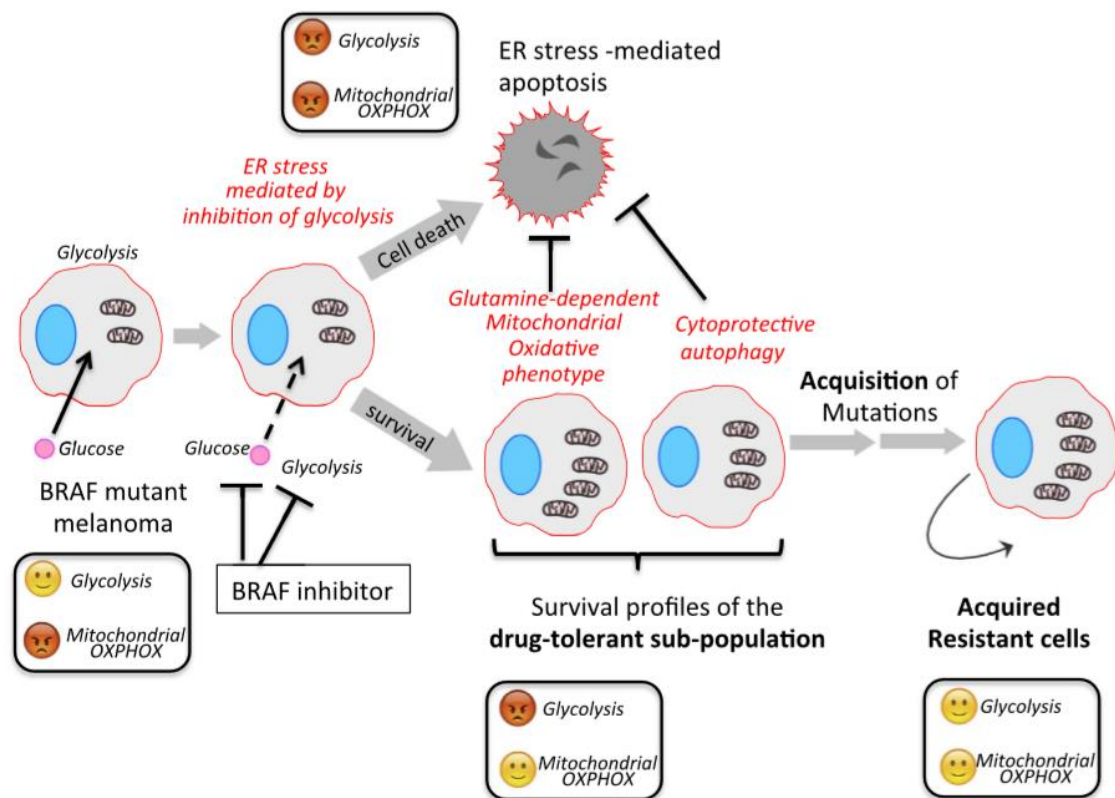


Figure 36 – Modèle résumant le devenir et le phénotype métabolique sous MAPKi dans les cellules cancéreuses (d'après Marchetti P et al., 2018).

L'une des questions pouvant être soulevée est l'origine de la sous-population OXPPOS : est-elle préexistante ou est-elle sélectionnée par les MAPKi ? De nombreux travaux suggèrent que cette population serait issue de la sélection d'un état métabolique pré-existant. Des auteurs ont montré qu'une sous-population de cellules de mélanome présentent une augmentation de l'expression du facteur de transcription MITF permettant la surexpression de la protéine PGC-1 α impliquée dans la

biogénèse mitochondriale. Ces cellules montrent par ailleurs une augmentation de la production d'ATP d'origine mitochondriale et une amélioration du mécanisme de détoxification des ROS leur permettant de survivre dans des conditions de stress oxydatif. A l'inverse, les cellules ne surexprimant pas PGC-1 α sont davantage glycolytiques et sensibles aux agents pro-oxydants (Vazquez F et al., 2013).

D'autres auteurs ont montré qu'une sous-population cyclant lentement et caractérisée par la surexpression de la déméthylase JARID1B (JARID1B^{high}) présente une augmentation du phénotype OXPHOS. L'inhibition de la respiration mitochondriale permet de pallier à la résistance aux traitements anticancéreux tels que le Vemurafenib ou la Cisplatine, indépendamment du génotype du mélanome. Les auteurs ont alors suggéré qu'un blocage de la respiration mitochondriale permettrait de cibler et de sensibiliser les cellules JARID1B^{high} aux thérapies anticancéreuses, et d'éviter l'émergence de cette population (Roesch A et al., 2013).

Notre équipe a montré dans des lignées de mélanome que le métabolisme de ces cellules était régulé par HIF-1 et qu'il participait au remodelage du métabolisme. L'inhibition de l'expression de HIF-1 conduit à une inhibition de l'expression de la PDK3, résultant alors en une augmentation de l'OXPHOS mitochondrial et une augmentation de la production subséquente de ROS mitochondriaux. En outre, l'utilisation de molécules pro-oxydantes tel que l'elesclomol s'est révélé efficace pour induire une majoration de la production de ROS et affecter la survie des cellules de mélanome sensibles ou résistantes au Vemurafenib (Kluza J. et al., 2011). Dans ce contexte, le stress oxydatif mitochondrial représente le talon d'Achille des cellules de mélanome devenues résistantes aux BRAFi (Corzaao-Rozas P. et al., 2013).

Afin de résister au stress métabolique induit par certains traitements, les cellules cancéreuses sont capables de se reposer sur des voies métaboliques compensatoires. Notamment, dans certains cas, le glucose et la glutamine sont capables de se compenser l'un l'autre afin de maintenir un cycle de Krebs fonctionnel. Par exemple, dans un modèle de gliome, des cellules SFxL ont été générées à partir de cellules de gliome SF188 infectées par un vecteur rétroviral afin d'induire la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-XL. Lors de la privation en glucose, les cellules de gliome sont capables de former de l'ACoA par carboxylation réductive à partir de la glutamine : l' α -KG est carboxylé par l'enzyme IDH afin de produire de l'isocitrate/citrate, puis clivé pour générer de l'AOA et de l'ACoA. Les auteurs montrent que lors du blocage du transport mitochondrial du pyruvate par inhibition du MPC, les cellules de gliome sont capables de maintenir le cycle de Krebs grâce à la glutaminolyse de manière dépendante au GDH (Yang C et al., 2014).

Des auteurs ont montré dans des échantillons *in vitro* et *ex vivo* de leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) pédiatrique que la tigecycline, un antibiotique approuvé par la *Food and Drug Administration*

(FDA) inhibant la traduction mitochondriale, était efficace pour réduire significativement la survie et la croissance clonogénique des progéniteurs leucémiques CD34⁺ et de lymphocytes primaires en comparaison de cellules hématopoïétiques normales. Ils expliquent cette différence par une augmentation de la biogenèse et de la respiration mitochondriale des cellules de LAL en comparaison de cellules hématopoïétiques normales, ce qui les rend davantage sensible à la tigecycline. Les auteurs montrent également que l'utilisation de ce médicament permet de sensibiliser les cellules de LAL aux chimiothérapies telles que la doxorubicine ou la vincristine, augmentant ainsi leur efficacité (Fu X et al., 2017).

Notre équipe a montré que les cellules de LAM surexprimant la protéine GILZ redirigent leur métabolisme vers un métabolisme oxydatif mitochondrial (**André et al., 2016**). Par ailleurs, il a été montré qu'une production de ROS exacerbée et un niveau de stress oxydatif élevé induit des altérations biochimiques pouvant participer à la croissance des cellules tumorales. De ce fait, ces cellules seraient aussi davantage sensibles aux molécules ciblant la mitochondrie et ayant une activité pro-oxydative. L'utilisation de l'elesclomol, un médicament ciblant l'ETC (Blackman RK et al., 2012) et induisant l'apoptose au travers d'un stress oxydatif (Kirshner JR et al., 2017), permet d'augmenter les niveaux de ROS au-delà du seuil induisant la mort cellulaire des cellules leucémiques (André F et al., 2017). Ce médicament a également reçu une autorisation de la FDA dans le cadre du mélanome métastatique.

Nous avons également montré que sous thérapies ciblées, un très faible nombre de cellules de LMC est capable de subsister sous traitement et est caractérisé par une augmentation du métabolisme mitochondrial, qui se traduit par une augmentation de la production de ROS mitochondriaux, du potentiel de membrane mitochondrial et de la masse mitochondriale. Après retrait de l'Imatinib, cette sous-population persistante conserve son potentiel clonogénique et est capable de proliférer à nouveau (**Trinh A et al., article en cours**).

Afin de cibler les mécanismes mitochondriaux impliqués dans la persistance ou la résistance des cellules cancéreuses, de nombreux inhibiteurs mitochondriaux ont été testés dans différents types de cancers et leurs effets anticancéreux ont été évalués (**tableau 7**) (revue par Marchetti P et al., 2015).

Mitochondrial targets	Drugs (phase of development)	Mechanisms of action	Resulting effects on mitochondrial activity	Anticancer effects	Cancer types
CPT1 carnitine O-palmitoyltransferase 1	Etomoxir (clinical trials)	CPT1 inhibitor: inhibits mitochondrial import of FA	Reduction in FA oxidation and OXPHOS	(i) Reduces viability of leukemia stem cell (ii) Potentiates the effects of chemotherapy	AML
IDH2 mutant	AGI-6780 (clinical trials)	(R140Q) IDH2 mutant inhibitor: reduces TCA flux (reverse and forward) and lipid biosynthesis	Reduction in the accumulation of the oncometabolite, R-2-hydroxyglutarate (2-HG)	Promotion of the differentiation of leukemic blasts	AML
Complex V or FO-F1 ATPase	Oligomycin A (preclinical data)	Inhibitor of the FO subunit	(i) Inhibition of ATP synthesis and reduction of electron flux through the ETC (ii) Induction of ROS and MPTP?	(i) Loss of viability (ii) Inhibits the formation of spheroids	Several tumors including breast cancer
Electron transport chain	Elesclomol (clinical trials)	Inhibitor of the ETC by picking up electrons to the ETC	Inhibition of the electron transport flux and promoting ROS production	Reduction in proliferation and induction of apoptotic cell death Kills cancer stem cells (50-100 times more potent in mammospheres than in isolated cells)	Melanoma including those resistant to BRAF mutant inhibitors
	(i) Rotenone (preclinical data)	(i) CI inhibitor	Decreases OXPHOS and mitochondrial oxidative metabolism		Breast cancer
NADH: ubiquinone oxidoreductase or complex I	(ii) Metformin or phenformin (a biguanide related to metformin) (clinical trials)	(ii) Concentrates into mitochondrial matrix and also possesses systemic effects (diabetes drugs) and also AMPK activators. Phenformin is a more potent mitochondrial inhibitor than metformin	Reduction of oxidative phosphorylation and ATP synthesis	(i) Inhibition of cell proliferation and inducing cell death (ii) Decreasing the risk of cancer	Leukemia and several solid tumors
Ubiquinol: cytochrome c oxidoreductase or complex III	Phenethyl isothiocyanate (PEITC)	CIII inhibitor	Decreases OXPHOS and induces ROS overproduction	Kills cancer cells	Prostate cancer
Pyruvate dehydrogenase kinase	Dichloroacetate (DCA) (clinical trials)	PDK isoenzymes inhibitor increases PDH activity (and reduces glycolytic pathways?)	Increase in pyruvate oxidation, OXPHOS, resulting in ROS overproduction		Melanoma, sorafenib resistant hepatocarcinoma, glioblastoma, and other tumors
Glutaminase	(i) 968 (ii) BPTES [bis-2-(5-phenyl-acetamido-1,2,4-thiadiazoyl-2-yl)ethyl sulfide] (preclinical data) (iii) CB-839 (preclinical data and clinical trials)	Inhibit mitochondrial glutaminase and conversion of glutamine in glutamate	Reduce the glutamine metabolism in mitochondria	Block cell growth and invasion	Breast cancer, glioblastoma, and other tumors CB-839 is a selective glutaminase inhibitor currently in phase I clinical trials
Mitochondrial translation	Tigecycline (preclinical) and other mitochondrially targeted antibiotics	Antimicrobial inhibits mitochondrial protein translation	Suppress mitochondrial biogenesis and respiration	Loss of viability	Selectively kill AML stem cells Tumor initiating cells from several cancer cell types
ANT	PENAO (4-(N-(S-penicillaminylacetyl)amino) phenylarsonous acid) (clinical trials)	Inactivate ANT by oxidation of Cys residues	Induce MPTP and ROS	Loss of viability	Breast cancer

Tableau 7 – Exemples de molécules ciblant le métabolisme mitochondrial et leur implication dans différents cancers. De nombreuses molécules permettent de cibler le métabolisme mitochondrial des cellules cancéreuses, induisant une inhibition de la prolifération ou une diminution de la viabilité cellulaire (d’après Marchetti P et al., 2015).

2. La coopérativité anti-métabolique : combinaison innovante de thérapies ciblées et de molécules ciblant le métabolisme pour éradiquer les cellules persistantes

L’apparition des thérapies ciblées a permis de révolutionner le traitement des patients dans certains types de cancer, mais les résistances intrinsèques et l’acquisition de résistance aux traitements restent une limite majeure à l’efficacité de ces traitements. Par ailleurs, de nombreux articles montrent que, bien que les thérapies ciblées induisent des effets anti-métaboliques participant à leur efficacité,

certaines cellules cancéreuses sont capables d'induire des mécanismes compensatoires et de moduler leur métabolisme vers d'autres voies afin de survivre et de produire de l'énergie. Par conséquent, cibler ces mécanismes compensatoires afin d'induire une coopérativité anti-métabolique est une stratégie émergente pour cibler le métabolisme énergétique et éradiquer les cellules cancéreuses persistantes.

2.1. L'association de thérapies ciblées et d'inhibiteurs du métabolisme

2.1.1. Thérapies ciblées et inhibiteurs de la mitochondrie

Alvarez-Calderon et collègues ont montré que sous TKI, le métabolisme mitochondrial devient essentiel pour la survie des cellules leucémiques persistantes. Notamment, la DLAT, une enzyme limitante du complexe de la PDH permettant l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie, semble jouer un rôle clé puisque son inhibition permet de sensibiliser les cellules de LMC à l'Imatinib. Dans des modèles de LMC et de LAM FLT3^{ITD}, les TKI induisent une altération de l'état métabolique des cellules les rendant sensibles au ciblage mitochondrial. Ainsi, la combinaison de TKI et de l'oligomycine A permet d'induire une forte augmentation de la production de ROS, de dommages de l'ADN et de la mort cellulaire (Alvarez-Calderon F et al., 2015). D'autres auteurs ont montré que sous traitement aux TKI, les cellules de LMC se reposent sur le métabolisme OXPHOS pour leur survie. Ainsi, l'association de TKI et de la tigecycline s'est avérée efficace pour inhiber la traduction des protéines mitochondriales et éradiquer les CSL sélectivement, *in vitro* et *in vivo* (Kuntz EM et al., 2017).

Notre équipe a montré que dans le mélanome muté BRAF^{V600E} métastatique, l'activité glycolytique était favorisée par une surexpression de la kinase PDK3. L'inhibition de PDK3 par le dichloroacétate s'est révélée efficace pour augmenter l'activité de la PDH, augmenter l'activité OXPHOS et la production de ROS. En outre, l'association du DCA avec l'elesclomol, un médicament pro-oxydant, permet de diminuer la prolifération et d'augmenter la mort cellulaire des cellules de mélanome résistantes aux BRAFi (Kluza J et al., 2012).

Par ailleurs, l'un des risques majeurs des patients atteints de mélanome est de développer des métastases cérébrales, rendant ainsi difficile la disponibilité des BRAFi de par la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), mais également de l'acquisition de mutations intrinsèques et acquises. Des auteurs ont montré que l'utilisation de β -sitostérol, un stérol végétal pouvant passer la BHE, permettait de cibler le complexe I de l'ETC, de réduire la respiration mitochondriale et d'induire un stress oxydatif conduisant à la mort cellulaire de cellules de mélanome métastatique cérébral sans affecter les cellules normales. Ils montrent également que la combinaison du β -sitostérol avec le Vemurafenib permettait de pallier à la résistance aux BRAFi, et pourrait être utilisé comme adjuvant aux thérapies aux BRAFi (Sundstrøm et al., 2019).

Dans d'autres modèles de cancer pulmonaire et de cancer gastrique dépendants de RTK, des auteurs ont montré que le traitement des cellules cancéreuses à des TKI de l'EGFR (Lapatinib, Gefinitib, Erlotinib) ou de ALK (TAE684) induit une augmentation de l'expression des protéines Bcl-2 et Bcl-XL. La combinaison de l'ABT-263 avec ces TKI permet par conséquent d'induire des effets synergiques sur la réduction de la viabilité et de la capacité de formation de colonies (Jin J et al., 2017).

2.1.2. Thérapies ciblées et inhibiteurs du métabolisme des acides gras

Des auteurs ont montré que les cellules de mélanome mutées BRAF^{V600E} traitées aux BRAFi présentent une diminution de la lipogenèse induite par SREBP-1. Cependant, les cellules résistantes aux BRAFi sont capables de restaurer ce processus en induisant une saturation des lipides, ce qui protège les cellules de mélanome des dommages oxydants et de la peroxydation lipidique. Dans un modèle de souris PDX MEL006 répondant peu aux BRAFi, des cellules de mélanome BRAF^{V600E} ont été xénotransplantées et les souris ont été traitées par un inhibiteur de SREBP-1, le fatostatin, et le Vemurafenib. Les résultats ont montré que l'inhibition de la lipogenèse induite par SREBP-1 et de BRAF^{V600E} permet d'induire un meilleur effet anti-tumoral *in vivo* que les monothérapies, en augmentant la poly-insaturation et la peroxydation des lipides membranaires (Talebi A et al., 2018).

Dans la LMC, bien que l'Imatinib supprime l'activité glycolytique des cellules leucémiques, les cellules persistantes sont capables d'activer des mécanismes compensatoires au travers de l'oxydation des acides gras, en augmentant l'expression du transporteur CPT1C. Par ailleurs, le traitement à l'Imatinib ne permet d'inhiber que la phosphorylation de BCR-Abl, alors que l'inhibition du métabolisme des acides gras par l'AIC-47 ou l'Etomoxir permet d'inhiber l'expression de la protéine même et d'induire une synergie cytotoxique (Shinohara H et al., 2016).

2.1.3. Thérapies ciblées et inhibiteurs du métabolisme de la glutamine

Lorsque le transport du pyruvate dans la mitochondrie est fonctionnel, les cellules de gliome inhibent la GDH et la formation d'AcoA dépendante de la glutamine. Lors de l'inhibition du MPC, les cellules cancéreuses sont capables de réactiver la GDH et d'utiliser la glutamine pour faire fonctionner le cycle de Krebs (Yang C et al., 2014). Nous pouvons alors supposer que dans le cas de thérapies ciblées, qui inhibent la glycolyse et limitent la quantité de pyruvate disponible pour la mitochondrie, les cellules cancéreuses se reposent sur le métabolisme de la glutamine pour leur survie. Dans le cas de LMC et de LAM FLT3^{ITD}, Gallipoli et collègues ont montré que sous TKI, la glutaminolyse devient en effet essentielle à la survie des cellules leucémiques et constitue ainsi une vulnérabilité pouvant être thérapeutiquement ciblée. Sous Quizartinib, les cellules leucémiques FLT3^{ITD} présentent une diminution drastique de leur activité glycolytique, mais également une augmentation de l'utilisation de la glutamine par les mitochondries permettant ainsi de conserver une fonction mitochondriale

intacte et une production de GSH. Les auteurs montrent alors que l'utilisation de shGLS1 ou du CB-839 en combinaison avec le Quizartinib ou l'Imatinib permet de potentialiser la mort cellulaire des cellules FLT3^{ITD} et BCR-Abl⁺ respectivement (Gallipoli P et al., 2018).

Nous avons montré qu'en dépit de l'inhibition de la glycolyse induite par l'Imatinib, les cellules de LMC persistant sous traitement sont capables de se reposer sur le métabolisme mitochondrial et présentent une addiction mitochondriale pour leur survie. Nous avons alors testé si l'association de la Kidrolase en combinaison avec l'Imatinib pouvait affecter la survie des cellules leucémiques persistant sous Imatinib. Pour cela, nous avons dans un premier temps vérifié les effets métaboliques induits par la Kidrolase, un médicament approuvé par la FDA et utilisé en clinique pour traiter les LAL pédiatriques, puisque ces cellules cancéreuses sont déficientes en asparagine synthetase (Hermanova I et al., 2012). Nous avons observé que ce traitement induit une déplétion des métabolites du cycle de Krebs. Nous avons montré que l'association de ces deux traitements permet de diminuer efficacement la prolifération et le potentiel clonogénique des cellules leucémiques BCR-Abl⁺. Cette association s'est avérée efficace pour éliminer les cellules souches leucémiques CD34⁺ *in vivo* et *ex vivo*, et permet de resensibiliser les cellules persistantes sous Imatinib à la mort cellulaire dans des modèles de co-culture avec des cellules mésenchymateuses et dans un modèle de dormance tumorale. Nous avons montré que les effets observés étaient dus à l'activité glutaminase de la Kidrolase, d'une part car le retrait de l'asparagine n'induit pas d'effets majeurs en combinaison avec l'Imatinib contrairement au retrait de la glutamine, et d'autre part, la supplémentation avec de l' α -KG permet de pallier à la déplétion en glutamine (Trinh A et al., article en cours).

Dans le cas du mélanome BRAF^{V600E} ayant développé une résistance acquise aux BRAFi, les cellules présentent une augmentation du métabolisme oxydatif associée à un switch du métabolisme du glucose vers le métabolisme de la glutamine pour leur prolifération. Les cellules résistantes présentent une dépendance à la mitochondrie pour leur survie, et le ciblage de la mitochondrie ou de la glutaminolyse permet d'affecter ces cellules (Baenke F et al., 2016). Nous avons montré que l'utilisation du BPTES, un inhibiteur de la glutaminase GLS1, était efficace pour pallier à la résistance des cellules de mélanome résistantes aux BRAFi (Trinh A et al., 2018).

3. La coopérativité métabolique : quels effets sur les cellules saines ?

Bien que les thérapies ciblées induisent des effets spécifiques sur des oncogènes, celles-ci peuvent également avoir d'autres cibles. L'une des questions principales pouvant être soulevée concerne donc l'innocuité de l'association thérapies ciblées et ciblage mitochondrial sur les cellules saines.

Afin de tester les effets de l'association TKI et ciblage mitochondrial sur des cellules saines, des cellules CD34⁺ de sang de cordon ont été traitées et les résultats montrent que les traitements seuls ou l'association de TKI et de l'oligomycine A n'induisent qu'une faible diminution du nombre de colonies formées. *In vivo*, cette combinaison n'induit pas de toxicité hématologique ni de toxicité hépatique (Alvarez-Calderon F et al., 2015). Jacques et collègues ont également montré sur des cellules CD34⁺ de donneurs sains qu'aux mêmes concentrations utilisées pour traiter les cellules de LAM, l'inhibition de la GLS1 par le CB-839 n'induit pas d'effet sur la prolifération cellulaire, ni sur la viabilité de ces cellules (Jacques N et al., 2015).

Nous avons montré dans des cellules CD34⁺ isolées de sang de cordon que d'une part, le traitement à l'Imatinib n'induisait pas de modification de la viabilité des CSH, et d'autre part, que l'association de l'Imatinib et de la Kidrolase n'induisait pas de mort cellulaire majeure en comparaison des CSH non traitées (Trinh A et al., article en cours).

Conclusion générale

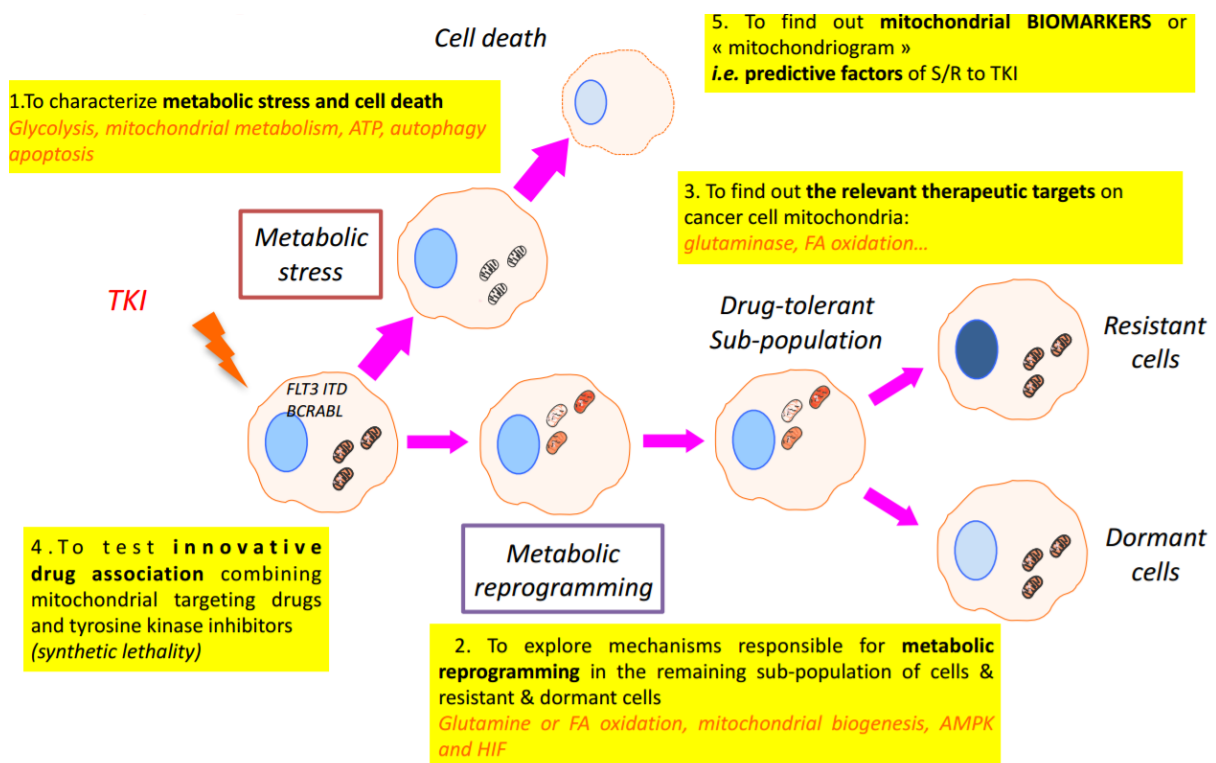
De nombreux travaux ont montré le rôle clé du métabolisme mitochondrial dans la survie des cellules cancéreuses dans différents modèles de cancers. Nous avons montré que la mitochondrie participait activement à la lutte contre le stress réticulaire au travers de NRF2, mais également dans la diminution du stress oxydant induits par les thérapies ciblées afin de favoriser la survie des cellules cancéreuses. D'autre part, nous avons également montré que l'effet protecteur du métabolisme mitochondrial était en partie dû à la flexibilité métabolique des cellules cancéreuses et à leur capacité à utiliser des voies métaboliques compensatoires lors d'un stress nutritif. Dans ces différents modèles, nous avons montré que l'utilisation d'inhibiteurs mitochondriaux ou de molécules pro-oxydantes augmentant la production de ROS mitochondriaux permettait de cibler les cellules cancéreuses résistantes ou ayant échappé aux traitements. En conclusion, ces différents travaux montrent l'importance du ciblage mitochondrial et pourraient permettre l'émergence de combinaisons thérapeutiques innovantes afin d'éliminer les cellules cancéreuses sensibles et celles persistant sous traitements aux chimiothérapies seules.



PERSPECTIVES

Dans le cas de la LMC, les cellules leucémiques présentent un remodelage de leur métabolisme sous Imatinib, en switchant de la glycolyse vers l'OXPHOS mitochondrial. Notamment, les cellules persistantes présentent une addiction à la glutamine pour leur survie. Nous avons alors montré que la Kidrolase, une L-Asparaginase approuvée par la FDA hydrolysant l'asparagine et la glutamine en aspartate et en glutamate au niveau du plasma, s'est avérée efficace pour éliminer les cellules leucémiques ayant persisté sous traitement à l'Imatinib seule. Il serait intéressant d'étudier si des mécanismes compensatoires existent dans d'autres types de leucémie telle que la LAM présentant l'oncogène muté FLT3^{ITD}, et si l'association de thérapies ciblées affectant la glycolyse et d'inhibiteurs mitochondriaux est capable d'induire une coopérativité anti-métabolique dans ces cellules.

Nos objectifs s'inscrivent dans le schéma suivant :



(1) **Caractériser le stress métabolique et son rôle dans l'induction de la mort cellulaire sous TKI.**

Pour cela, nous étudierons le métabolisme glycolytique et mitochondrial, mais également la production d'ATP, le flux des métabolites au travers de glucose ou de la glutamine marquées au carbone 13, mais également les processus de mort cellulaire telles que l'apoptose et l'autophagie.

(2) **Explorer les mécanismes impliqués dans la reprogrammation métabolique des cellules persistantes, résistantes et dormantes.**

Nous étudierons quels sont les mécanismes impliqués dans la reprogrammation métabolique en étudiant les acteurs impliqués dans le modelage du métabolisme tels que HIF ou l'AMPK,, les voies de signalisation associées, mais aussi les voies métaboliques compensatoires tels que le métabolisme de la glutamine et l'oxydation des acides gras.

(3) Evaluer les cibles thérapeutiques pertinentes pour cibler les mitochondries des cellules cancéreuses.

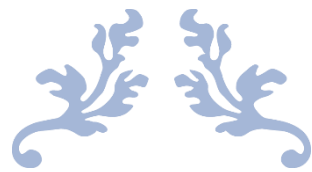
Pour cela, nous utiliserons des inhibiteurs mitochondriaux tels que l'Oligomycine A, ou des inhibiteurs de l'utilisation de substrats par les mitochondries, tels que des inhibiteurs du métabolisme de la glutamine (L-Asparaginase, BPTES, siRNA GLS1), du métabolisme des acides gras (Etomoxir, siRNA CPT1) ou du métabolisme du pyruvate (UK509, siRNA MPC).

(4) Tester des combinaisons innovantes de médicaments ciblant des thérapies ciblées et des inhibiteurs mitochondriaux.

Nous vérifierons alors l'efficacité de ces combinaisons dans des modèles de cellules leucémiques sensibles et résistantes aux TKI, et évaluerons si celles-ci sont efficaces pour induire une létalité synthétique.

(5) Trouver des biomarqueurs mitochondriaux ou « mitochondriogramme ».

Nous évaluerons quels sont les paramètres mitochondriaux modifiés et déterminerons si ceux-ci peuvent être utilisés comme facteurs prédictifs de sensibilité ou de résistance aux TKI.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham, A. et al.** SIRT1 regulates metabolism and leukemogenic potential in CML stem cells. *Journal of Clinical Investigation* 129, 2685–2701 (2019).
- Aguirre-Ghiso, J. A.** Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 7, 834–846 (2007).
- Aiderus, A., Black, M. A. & Dunbier, A. K.** Fatty acid oxidation is associated with proliferation and prognosis in breast and other cancers. *BMC Cancer* 18, 805 (2018).
- Airiau, K., Mahon, F.-X., Josselin, M., Jeanneteau, M. & Belloc, F.** PI3K/mTOR pathway inhibitors sensitize chronic myeloid leukemia stem cells to nilotinib and restore the response of progenitors to nilotinib in the presence of stem cell factor. *Cell Death Dis* 4, e827–e827 (2013).
- Alvarez-Calderon, F. et al.** Tyrosine Kinase Inhibition in Leukemia Induces an Altered Metabolic State Sensitive to Mitochondrial Perturbations. *Clinical Cancer Research* 21, 1360–1372 (2015).
- Amaral, T. et al.** MAPK pathway in melanoma part II—secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition. *European Journal of Cancer* 73, 93–101 (2017).
- André, F. et al.** GILZ overexpression attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated cell death via the activation of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478, 513–520 (2016).
- André, F. et al.** Metabolic rewiring in cancer cells overexpressing the glucocorticoid-induced leucine zipper protein (GILZ): Activation of mitochondrial oxidative phosphorylation and sensitization to oxidative cell death induced by mitochondrial targeted drugs. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 85, 166–174 (2017).
- Andreucci, E. et al.** SOX2 as a novel contributor of oxidative metabolism in melanoma cells. *Cell Commun Signal* 16, 87 (2018).
- Ayroldi, E. et al.** GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J. Clin. Invest.* 117, 1605–1615 (2007).
- Ayroldi, E. et al.** Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Inhibits the Raf-Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway by Binding to Raf-1. *Molecular and Cellular Biology* 22, 7929–7941 (2002).
- Ayroldi, E. et al.** Long glucocorticoid-induced leucine zipper regulates human thyroid cancer cell proliferation. *Cell Death Dis* 9, 305 (2018).
- Bader, D. A. et al.** Mitochondrial pyruvate import is a metabolic vulnerability in androgen receptor-driven prostate cancer. *Nat Metab* 1, 70–85 (2019).
- Baenke, F. et al.** Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. *Molecular Oncology* 10, 73–84 (2016).
- Becker, T. M. et al.** Mutant B-RAF-Mcl-1 survival signaling depends on the STAT3 transcription factor. *Oncogene* 33, 1158–1166 (2014).
- Bender, T. & Martinou, J.-C.** The mitochondrial pyruvate carrier in health and disease: To carry or not to carry? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863, 2436–2442 (2016).
- Bereshchenko, O., Migliorati, G., Bruscoli, S. & Riccardi, C.** Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper: A Novel Anti-inflammatory Molecule. *Front. Pharmacol.* 10, 308 (2019).
- Bewry, N. N. et al.** Stat3 contributes to resistance toward BCR-ABL inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance. *Mol Cancer Ther* 7, 3169–3175 (2008).

Blackman, R. K. et al. Mitochondrial Electron Transport Is the Cellular Target of the Oncology Drug Elesclomol. *PLoS ONE* 7, e29798 (2012).

Bolaños, J. P., Almeida, A. & Moncada, S. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends in Biochemical Sciences* 35, 145–149 (2010).

Bono, S. et al. Different BCR/Abl protein suppression patterns as a converging trait of chronic myeloid leukemia cell adaptation to energy restriction. *Oncotarget* 7, (2016).

Bott, A., Maimouni, S. & Zong, W.-X. The Pleiotropic Effects of Glutamine Metabolism in Cancer. *Cancers* 11, 770 (2019).

Caino, M. C. et al. PI3K therapy reprograms mitochondrial trafficking to fuel tumor cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 8638–8643 (2015).

Calderon-Dominguez, M. et al. Carnitine Palmitoyltransferase 1 Increases Lipolysis, UCP1 Protein Expression and Mitochondrial Activity in Brown Adipocytes. *PLoS ONE* 11, e0159399 (2016).

Campiotti, L. et al. Imatinib discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients with undetectable BCR-ABL transcript level: A systematic review and a meta-analysis. *European Journal of Cancer* 77, 48–56 (2017).

Cassier, P. A., Castets, M., Belhabri, A. & Vey, N. Targeting apoptosis in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 117, 1089–1098 (2017).

Chance, B., Estabrook, R. W. & Lee, C. Electron Transport in the Oxysome. *Science* 140, 379 (1963).

Chapman, P. B. et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med* 364, 2507–2516 (2011).

Chapman, P. B. et al. Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Annals of Oncology* 28, 2581–2587 (2017).

Chaudhry, R. & Varacallo, M. Biochemistry, Glycolysis. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).

Cheloni, G. et al. Targeting chronic myeloid leukemia stem cells with the hypoxia-inducible factor inhibitor acriflavine. *Blood* 130, 655–665 (2017).

Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F. & Maity, A. Regulation of *glut1* mRNA by Hypoxia-inducible Factor-1: interaction between H-ras and hypoxia. *J. Biol. Chem.* 276, 9519–9525 (2001).

Chen, C.-L. et al. NANOG Metabolically Reprograms Tumor-Initiating Stem-like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid Metabolism. *Cell Metabolism* 23, 206–219 (2016).

Chen, L. & Cui, H. Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach. *IJMS* 16, 22830–22855 (2015).

Chiche, J. et al. GAPDH enhances the aggressiveness and the vascularization of non-Hodgkin's B lymphomas via NF- κ B-dependent induction of HIF-1 α . *Leukemia* 29, 1163–1176 (2015).

Chiche, J., Brahimi-Horn, M. C. & Pouyssegur, J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14, 771–794 (2010).

Christofk, H. R. et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452, 230–233 (2008).

- Cipolleschi, M. G.** & Olivotto, M. The Role of Hypoxia in the Maintenance of Hematopoietic Stem Cells. 9.
- Clarke, C. J.** & Holyoake, T. L. Preclinical approaches in chronic myeloid leukemia: from cells to systems. *Experimental Hematology* 47, 13–23 (2017).
- Corazao-Rozas, P.** *et al.* Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors. *Oncotarget* 7, (2016).
- Corazao-Rozas, P.** *et al.* Mitochondrial oxidative stress is the achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget* 4, (2013).
- Corbet, C.** & Feron, O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nat Rev Cancer* 17, 577–593 (2017).
- Corbin, A. S.** *et al.* Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J. Clin. Invest.* 121, 396–409 (2011).
- Cormerais, Y.** *et al.* The glutamine transporter ASCT2 (SLC1A5) promotes tumor growth independently of the amino acid transporter LAT1 (SLC7A5). *J. Biol. Chem.* 293, 2877–2887 (2018).
- Courtney, R.** *et al.* Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep* 42, 841–851 (2015).
- Currie, E.,** Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C. & Farese, R. V. Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer. *Cell Metabolism* 18, 153–161 (2013).
- D'Adamio, F.** *et al.* A New Dexamethasone-Induced Gene of the Leucine Zipper Family Protects T Lymphocytes from TCR/CD3-Activated Cell Death. *Immunity* 7, 803–812 (1997).
- Davies, H.** *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949–954 (2002).
- Dawood, S.,** Austin, L. & Cristofanilli, M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 28, 1101–1107, 1110 (2014).
- Dayton, T. L.,** Jacks, T. & Vander Heiden, M. G. PKM 2, cancer metabolism, and the road ahead. *EMBO Rep* 17, 1721–1730 (2016).
- De Rosa, V.** *et al.* Coordinate Modulation of Glycolytic Enzymes and OXPHOS by Imatinib in BCR-ABL Driven Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *IJMS* 20, 3134 (2019).
- DeBerardinis, R. J.** *et al.* Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 19345–19350 (2007).
- Delgado-Goni, T.** *et al.* The BRAF Inhibitor Vemurafenib Activates Mitochondrial Metabolism and Inhibits Hyperpolarized Pyruvate–Lactate Exchange in BRAF-Mutant Human Melanoma Cells. *Mol Cancer Ther* 15, 2987–2999 (2016).
- Delord, M.,** Jr. 100 Years of Chronic Myeloid Leukemia Prevalence in France. *Blood* 128, 2380–2380 (2016).
- Demas, D. M.** *et al.* Glutamine Metabolism Drives Growth in Advanced Hormone Receptor Positive Breast Cancer. *Front. Oncol.* 9, 686 (2019).
- Devic, S.** Warburg Effect - a Consequence or the Cause of Carcinogenesis? *J. Cancer* 7, 817–822 (2016).
- Di Bacco, A.** Molecular Abnormalities in Chronic Myeloid Leukemia: Deregulation of Cell Growth and Apoptosis. *The Oncologist* 5, 405–415 (2000).

- Dong, G. et al.** PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. *Oncology Letters* 11, 1980–1986 (2016).
- Eadie, L. N.,** Hughes, T. P. & White, D. L. ABCB1 Overexpression Is a Key Initiator of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in CML Cell Lines. *PLoS ONE* 11, e0161470 (2016).
- Eales, K. L.,** Hollinshead, K. E. R. & Tennant, D. A. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* 5, e190–e190 (2016).
- Effenberger, M. et al.** Glutaminase inhibition in multiple myeloma induces apoptosis *via* MYC degradation. *Oncotarget* 8, (2017).
- Elmore, S.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35, 495–516 (2007).
- Enríquez, J. A.** Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 533–561 (2016).
- Etienne, G. et al.** Long-Term Follow-Up of the French Stop Imatinib (STIM1) Study in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *JCO* 35, 298–305 (2017).
- Farge, T. et al.** Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov* 7, 716–735 (2017).
- Faubert, B. et al.** Lactate Metabolism in Human Lung Tumors. *Cell* 171, 358–371.e9 (2017).
- Fedorenko, I. V.,** Paraiso, K. H. T. & Smalley, K. S. M. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochemical Pharmacology* 82, 201–209 (2011).
- Feng, Y. et al.** Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med* 7, 6124–6136 (2018).
- Ferguson, J. et al.** Osteoblasts contribute to a protective niche that supports melanoma cell proliferation and survival. *Pigment Cell Melanoma Res* pcmr.12812 (2019).
- Fiaschi, T. et al.** Reciprocal Metabolic Reprogramming through Lactate Shuttle Coordinately Influences Tumor-Stroma Interplay. *Cancer Research* 72, 5130–5140 (2012).
- Fontaine, E.** Metformin-Induced Mitochondrial Complex I inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Front. Endocrinol.* 9, 753 (2018).
- Fu, X. et al.** Targeting mitochondrial respiration selectively sensitizes pediatric acute lymphoblastic leukemia cell lines and patient samples to standard chemotherapy. *Am J Cancer Res* 7, 2395–2405 (2017).
- Gallego, M.-A. et al.** Apoptosis-inducing factor determines the chemoresistance of non-small-cell lung carcinomas. *Oncogene* 23, 6282–6291 (2004).
- Gallipoli, P. et al.** Glutaminolysis is a metabolic dependency in FLT3ITD acute myeloid leukemia unmasked by FLT3 tyrosine kinase inhibition. *Blood* 131, 1639–1653 (2018).
- Gallipoli, P. et al.** JAK2/STAT5 inhibition by nilotinib with ruxolitinib contributes to the elimination of CML CD34+ cells in vitro and in vivo. *Blood* 124, 1492–1501 (2014).
- Galluzzi, L.,** Morselli, E., Kepp, O., Tajeddine, N. & Kroemer, G. Targeting p53 to mitochondria for cancer therapy. *Cell Cycle* 7, 1949–1955 (2008).
- Genovese, I.,** Ilari, A., Assaraf, Y. G., Fazi, F. & Colotti, G. Not only P-glycoprotein: Amplification of the ABCB1-containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by

coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins. *Drug Resistance Updates* 32, 23–46 (2017).

Ghosh, J. C. et al. Adaptive mitochondrial reprogramming and resistance to PI3K therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 107, (2015).

Giuntoli, S. et al. Hypoxia suppresses BCR/Abl and selects imatinib-insensitive progenitors within clonal CML populations. *Leukemia* 20, 1291–1293 (2006).

Gleixner, K. V. et al. Combined targeting of STAT3 and STAT5: a novel approach to overcome drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 102, 1519–1529 (2017).

Gorre, M. E. Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by BCR-ABL Gene Mutation or Amplification. *Science* 293, 876–880 (2001).

Gottschalk, S. Imatinib (STI571)-Mediated Changes in Glucose Metabolism in Human Leukemia BCR-ABL-Positive Cells. *Clinical Cancer Research* 10, 6661–6668 (2004).

Griffin, M. et al. BRAF inhibitors: resistance and the promise of combination treatments for melanoma. *Oncotarget* 8, (2017).

Haas, S., Trumpp, A. & Milsom, M. D. Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity. *Cell Stem Cell* 22, 627–638 (2018).

Habib, E., Linher-Melville, K., Lin, H.-X. & Singh, G. Expression of xCT and activity of system xc⁻ are regulated by NRF2 in human breast cancer cells in response to oxidative stress. *Redox Biology* 5, 33–42 (2015).

Hadfield, G. The dormant cancer cell. *Br Med J* 2, 607–610 (1954).

Hamilton, A. et al. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *119*, 10 (2012).

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674 (2011).

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70 (2000).

Hassanein, M. et al. SLC1A5 Mediates Glutamine Transport Required for Lung Cancer Cell Growth and Survival. *Clinical Cancer Research* 19, 560–570 (2013).

Hermanova, I., Zaliova, M., Trka, J. & Starkova, J. Low expression of asparagine synthetase in lymphoid blasts precludes its role in sensitivity to L-asparaginase. *Experimental Hematology* 40, 657–665 (2012).

Hernández-Alvarez, M. I. et al. Glucocorticoid Modulation of Mitochondrial Function in Hepatoma Cells Requires the Mitochondrial Fission Protein Drp1. *Antioxidants & Redox Signaling* 19, 366–378 (2013).

Hernandez-Davies, J. E. et al. Vemurafenib resistance reprograms melanoma cells towards glutamine dependence. *J Transl Med* 13, 210 (2015).

Higashi, K. et al. Correlation of Glut-1 glucose transporter expression with [18F]FDG uptake in non-small cell lung cancer. *Eur J Nucl Med* 27, 1778–1785 (2000).

Hochhaus, A. et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 376, 917–927 (2017).

Holmström, K. M. et al. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. *Biology Open* 2, 761–770 (2013).

- Holyoake, T. L.** & Vetrie, D. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. *Blood* 129, 1595–1606 (2017).
- Huang, F.** *et al.* Upregulated SLC1A5 promotes cell growth and survival in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 6006–6014 (2014).
- Huang, Y.**, Dai, Z., Barbacioru, C. & Sadée, W. Cystine-Glutamate Transporter *SLC7A11* in Cancer Chemosensitivity and Chemoresistance. *Cancer Res* 65, 7446–7454 (2005).
- Hunt, T. K.** *et al.* Aerobically Derived Lactate Stimulates Revascularization and Tissue Repair *via* Redox Mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling* 9, 1115–1124 (2007).
- Iqbal, N.** & Iqbal, N. Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. *Chemotherapy Research and Practice* 2014, 1–9 (2014).
- Israelsen, W. J.** *et al.* PKM2 Isoform-Specific Deletion Reveals a Differential Requirement for Pyruvate Kinase in Tumor Cells. *Cell* 155, 397–409 (2013).
- Ito, K.**, Bonora, M. & Ito, K. Metabolism as master of hematopoietic stem cell fate. *Int J Hematol* 109, 18–27 (2019).
- Ivanovic, Z.** *et al.* Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34(+) murine bone marrow cells. *Exp. Hematol.* 30, 67–73 (2002).
- Jabbour, E.** & Kantarjian, H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol* 93, 442–459 (2018).
- Jacque, N.** *et al.* Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. *Blood* 126, 1346–1356 (2015).
- Jin, J.**, Xiong, Y. & Cen, B. Bcl-2 and Bcl-xL mediate resistance to receptor tyrosine kinase-targeted therapy in lung and gastric cancer: *Anti-Cancer Drugs* 28, 1141–1149 (2017).
- Jin, L.** *et al.* CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 48–58 (2008).
- Joha, S.** *et al.* GILZ inhibits the mTORC2/AKT pathway in BCR-ABL+ cells. *Oncogene* 31, 1419–1430 (2012).
- Joseph, B.** *et al.* Mitochondrial dysfunction is an essential step for killing of non-small cell lung carcinomas resistant to conventional treatment. *Oncogene* 21, 65–77 (2002).
- Jung, K.-A.**, Lee, S. & Kwak, M.-K. NFE2L2/NRF2 Activity Is Linked to Mitochondria and AMP-Activated Protein Kinase Signaling in Cancers Through miR-181c/Mitochondria-Encoded Cytochrome c Oxidase Regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 27, 945–961 (2017).
- Kakadia, S.** *et al.* Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *OTT Volume* 11, 7095–7107 (2018).
- Kakavand, H.** *et al.* PD-L1 Expression and Immune Escape in Melanoma Resistance to MAPK Inhibitors. *Clin Cancer Res* 23, 6054–6061 (2017).
- Kanai, Y.** *et al.* The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 108–120 (2013).

- Khamari, R.** *et al.* Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors. *Cell Death Dis* 9, 325 (2018).
- Kim, J. -w.** *et al.* Evaluation of Myc E-Box Phylogenetic Footprints in Glycolytic Genes by Chromatin Immunoprecipitation Assays. *Molecular and Cellular Biology* 24, 5923–5936 (2004).
- King, A.,** Selak, M. A. & Gottlieb, E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* 25, 4675–4682 (2006).
- Kirshner, J. R.** *et al.* Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 2319–2327 (2008).
- Klawitter, J.** *et al.* Time-dependent effects of imatinib in human leukaemia cells: a kinetic NMR-profiling study. *Br J Cancer* 100, 923–931 (2009).
- Kluza, J.** *et al.* Exploiting Mitochondrial Dysfunction for Effective Elimination of Imatinib-Resistant Leukemic Cells. *PLoS ONE* 6, e21924 (2011).
- Kluza, J.** *et al.* Inactivation of the HIF-1 /PDK3 Signaling Axis Drives Melanoma toward Mitochondrial Oxidative Metabolism and Potentiates the Therapeutic Activity of Pro-Oxidants. *Cancer Research* 72, 5035–5047 (2012).
- Koppula, P.,** Zhang, Y., Zhuang, L. & Gan, B. Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. *Cancer Commun* 38, 12 (2018).
- Korn, C.** & Méndez-Ferrer, S. Myeloid malignancies and the microenvironment. *Blood* 129, 811–822 (2017).
- Koukourakis, M. I.,** Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Gatter, K. C. & Harris, A. L. Pyruvate Dehydrogenase and Pyruvate Dehydrogenase Kinase Expression in Non Small Cell Lung Cancer and Tumor-Associated Stroma. *Neoplasia* 7, 1–6 (2005).
- Kozar, I.,** Margue, C., Rothengatter, S., Haan, C. & Kreis, S. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1871, 313–322 (2019).
- Kruse, J.-P.** & Gu, W. Modes of p53 Regulation. *Cell* 137, 609–622 (2009).
- Kumar, A.,** Bhattacharyya, J. & Jaganathan, B. G. Adhesion to stromal cells mediates imatinib resistance in chronic myeloid leukemia through ERK and BMP signaling pathways. *Sci Rep* 7, 9535 (2017).
- Kuntz, E. M.** *et al.* Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Med* 23, 1234–1240 (2017).
- Kuo, C.-Y.** & Ann, D. K. When fats commit crimes: fatty acid metabolism, cancer stemness and therapeutic resistance. *Cancer Commun* 38, 47 (2018).
- Kuo, T.,** McQueen, A., Chen, T.-C. & Wang, J.-C. Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. in *Glucocorticoid Signaling* (eds. Wang, J.-C. & Harris, C.) vol. 872 99–126 (Springer New York, 2015).
- Lagadinou, E. D.** *et al.* BCL-2 Inhibition Targets Oxidative Phosphorylation and Selectively Eradicates Quiescent Human Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 329–341 (2013).
- Lamantea, E.** *et al.* A novel nonsense mutation (Q352X) in the mitochondrial cytochrome b gene associated with a combined deficiency of complexes I and III. *Neuromuscular Disorders* 12, 49–52 (2002).
- LaMonte, G.** *et al.* Acidosis induces reprogramming of cellular metabolism to mitigate oxidative stress. *Cancer Metab* 1, 23 (2013).

- Larkin, J. et al.** Combined Vemurafenib and Cobimetinib in *BRAF* -Mutated Melanoma. *N Engl J Med* 371, 1867–1876 (2014).
- Latré de Laté, P. et al.** Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ) Promotes the Nuclear Exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* 285, 5594–5605 (2010).
- Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H. & Kurzrock, R.** The BCR Gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis. 14.
- Li, C. et al.** OCT4 Positively Regulates Survivin Expression to Promote Cancer Cell Proliferation and Leads to Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 7, e49693 (2012).
- Li, X. et al.** MPC1 and MPC2 expressions are associated with favorable clinical outcomes in prostate cancer. *BMC Cancer* 16, 894 (2016).
- Liou, G.-Y. & Storz, P.** Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research* 44, 479–496 (2010).
- Liu, F. et al.** Stat3-Targeted Therapies Overcome the Acquired Resistance to Vemurafenib in Melanomas. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 2041–2049 (2013).
- Liu, K. et al.** Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes cancer growth and metastasis through upregulation of SNAIL expression. *Int. J. Oncol.* 50, 252–262 (2017).
- Lopez, J. & Tait, S. W. G.** Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer* 112, 957–962 (2015).
- Lu, C.-L. et al.** Tumor Cells Switch to Mitochondrial Oxidative Phosphorylation under Radiation via mTOR-Mediated Hexokinase II Inhibition - A Warburg-Reversing Effect. *PLoS ONE* 10, e0121046 (2015).
- Lunt, S. Y. & Vander Heiden, M. G.** Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 441–464 (2011).
- Maeurer, M. J. et al.** Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *J. Clin. Invest.* 98, 1633–1641 (1996).
- Mahon, F.-X. & Etienne, G.** Deep Molecular Response in Chronic Myeloid Leukemia: The New Goal of Therapy? *Clinical Cancer Research* 20, 310–322 (2014).
- Mahon, F.-X. et al.** Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *The Lancet Oncology* 11, 1029–1035 (2010).
- Mahon, F.-X. et al.** Evidence that Resistance to Nilotinib May Be Due to BCR-ABL, Pgp, or Src Kinase Overexpression. *Cancer Research* 68, 9809–9816 (2008).
- Mantovani, F., Collavin, L. & Del Sal, G.** Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ* 26, 199–212 (2019).
- Marchetti, P., Guerreschi, P., Kluza, J. & Mortier, L.** Metabolic Features of Melanoma: A Gold Mine of New Therapeutic Targets? *CCDT* 14, 357–370 (2014).
- Marchetti, P., Guerreschi, P., Mortier, L. & Kluza, J.** Integration of Mitochondrial Targeting for Molecular Cancer Therapeutics. *International Journal of Cell Biology* 2015, 1–17 (2015).
- Matre, P. et al.** Inhibiting glutaminase in acute myeloid leukemia: metabolic dependency of selected AML subtypes. *Oncotarget* 7, (2016).
- Mauro, M. J.** ST1571: Targeting BCR-ABL as Therapy for CML. *The Oncologist* 6, 233–238 (2001).

- Medes, G.,** Paden, G. & Weinhouse, S. Metabolism of neoplastic tissues. XI. Absorption and oxidation of dietary fatty acids by implanted tumors. *Cancer Res.* 17, 127–133 (1957).
- Medes, G.,** Thomas, A. & Weinhouse, S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in 7.
- Melber, A.** & Winge, D. R. Inner Secrets of the Respirasome. *Cell* 167, 1450–1452 (2016).
- Mele, L. et al.** A new inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase blocks pentose phosphate pathway and suppresses malignant proliferation and metastasis in vivo. *Cell Death Dis* 9, 572 (2018).
- Melo, J. V.** The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 88, 2375–2384 (1996).
- Mencalha, A. L. et al.** Inhibition of STAT3-interacting protein 1 (STATIP1) promotes STAT3 transcriptional up-regulation and imatinib mesylate resistance in the chronic myeloid leukemia. *BMC Cancer* 14, 866 (2014).
- Meng, S. et al.** Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin. Cancer Res.* 10, 8152–8162 (2004).
- Miller, D. M.,** Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D. & Sedoris, K. c-Myc and Cancer Metabolism. *Clinical Cancer Research* 18, 5546–5553 (2012).
- Milojkovic, D.** & Apperley, J. Mechanisms of Resistance to Imatinib and Second-Generation Tyrosine Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research* 15, 7519–7527 (2009).
- Mitsuishi, Y.,** Motohashi, H. & Yamamoto, M. The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front. Oncol.* 2, (2012).
- Modi, H. et al.** Role of BCR/ABL gene-expression levels in determining the phenotype and imatinib sensitivity of transformed human hematopoietic cells. *Blood* 109, 5411–5421 (2007).
- Moschoi, R. et al.** Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 128, 253–264 (2016).
- Mullarky, E.** & Cantley, L. C. Diverting Glycolysis to Combat Oxidative Stress. in *Innovative Medicine* (eds. Nakao, K., Minato, N. & Uemoto, S.) 3–23 (Springer Japan, 2015).
- Mumprecht, S.,** Schürch, C., Schwaller, J., Solenthaler, M. & Oxsenbein, A. F. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* 114, 1528–1536 (2009).
- Nagai, T. et al.** Imatinib for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results of a prospective study in Japan. *Int. J. Hematol.* 92, 111–117 (2010).
- Nagao, A.,** Kobayashi, M., Koyasu, S., Chow, C. C. T. & Harada, H. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *IJMS* 20, 238 (2019).
- Nájera, L. et al.** Prognostic implications of markers of the metabolic phenotype in human cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 181, 114–127 (2019).
- Naka, K. et al.** TGF- β -FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 463, 676–680 (2010).
- Nieman, K. M. et al.** Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med* 17, 1498–1503 (2011).

- O'Brien, S. G. et al.** Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 348, 994–1004 (2003).
- O'Hare, T.,** Deininger, M. W. N., Eide, C. A., Clackson, T. & Druker, B. J. Targeting the BCR-ABL Signaling Pathway in Therapy-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemia. *Clinical Cancer Research* 17, 212–221 (2011).
- Obradović, M. M. S. et al.** Glucocorticoids promote breast cancer metastasis. *Nature* 567, 540–544 (2019).
- Okada, M. et al.** Final 3-year Results of the Dasatinib Discontinuation Trial in Patients With Chronic Myeloid Leukemia Who Received Dasatinib as a Second-line Treatment. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 18, 353-360.e1 (2018).
- Orrenius, S.,** Gogvadze, V. & Zhivotovsky, B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460, 72–81 (2015).
- Pan, R. et al.** Synthetic Lethality of Combined Bcl-2 Inhibition and p53 Activation in AML: Mechanisms and Superior Antileukemic Efficacy. *Cancer Cell* 32, 748-760.e6 (2017).
- Pardoll, D. M.** The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12, 252–264 (2012).
- Park, S. J. et al.** An overview of MCT1 and MCT4 in GBM: small molecule transporters with large implications. *Am J Cancer Res* 8, 1967–1976 (2018).
- Passarelli, A.,** Mannavola, F., Stucci, L. S., Tucci, M. & Silvestris, F. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget* 8, (2017).
- Passegue, E.,** Jamieson, C. H. M., Ailles, L. E. & Weissman, I. L. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 11842–11849 (2003).
- Patra, K. C. &** Hay, N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in Biochemical Sciences* 39, 347–354 (2014).
- Peterson, L. F. et al.** p53 stabilization induces apoptosis in chronic myeloid leukemia blast crisis cells. *Leukemia* 25, 761–769 (2011).
- Pinheiro, C. et al.** The metabolic microenvironment of melanomas: Prognostic value of MCT1 and MCT4. *Cell Cycle* 15, 1462–1470 (2016).
- Pochini, L.,** Scalise, M., Galluccio, M. & Indiveri, C. Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. *Front. Chem.* 2, (2014).
- Porporato, P. E.,** Filigheddu, N., Pedro, J. M. B.-S., Kroemer, G. & Galluzzi, L. Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Res* 28, 265–280 (2018).
- Prakasam, G.,** Iqbal, M. A., Bamezai, R. N. K. & Mazurek, S. Posttranslational Modifications of Pyruvate Kinase M2: Tweaks that Benefit Cancer. *Front. Oncol.* 8, 22 (2018).
- Pramod, A. B.,** Foster, J., Carvelli, L. & Henry, L. K. SLC6 transporters: Structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 197–219 (2013).
- Pufall, M. A.** Glucocorticoids and Cancer. in *Glucocorticoid Signaling* (eds. Wang, J.-C. & Harris, C.) vol. 872 315–333 (Springer New York, 2015).
- Qu, Q.,** Zeng, F., Liu, X., Wang, Q. J. & Deng, F. Fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase I: emerging therapeutic targets in cancer. *Cell Death Dis* 7, e2226–e2226 (2016).

Quentmeier, H., Eberth, S., Romani, J., Zaborski, M. & Drexler, H. G. BCR-ABL1-independent PI3Kinase activation causing imatinib-resistance. *J Hematol Oncol* 4, 6 (2011).

Rakheja, D., Konoplev, S., Medeiros, L. J. & Chen, W. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Human Pathology* 43, 1541–1551 (2012).

Rasti, A. et al. Co-expression of Cancer Stem Cell Markers OCT4 and NANOG Predicts Poor Prognosis in Renal Cell Carcinomas. *Sci Rep* 8, 11739 (2018).

Riether, C., Gschwend, T., Huguenin, A.-L., Schürch, C. M. & Ochsenbein, A. F. Blocking programmed cell death 1 in combination with adoptive cytotoxic T-cell transfer eradicates chronic myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 29, 1781–1785 (2015).

Roesch, A. et al. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 141, 583–594 (2010).

Roesch, A. et al. Overcoming Intrinsic Multidrug Resistance in Melanoma by Blocking the Mitochondrial Respiratory Chain of Slow-Cycling JARID1Bhigh Cells. *Cancer Cell* 23, 811–825 (2013).

Rojo de la Vega, M., Chapman, E. & Zhang, D. D. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell* 34, 21–43 (2018).

Romero, R. et al. Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. *Nat Med* 23, 1362–1368 (2017).

Romero-Garcia, S., Moreno-Altamirano, M. M. B., Prado-Garcia, H. & Sánchez-García, F. J. Lactate Contribution to the Tumor microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front. Immunol.* 7, (2016).185.

Ronchetti, S., Migliorati, G. & Riccardi, C. GILZ as a Mediator of the Anti-Inflammatory Effects of Glucocorticoids. *Front. Endocrinol.* 6, (2015).

Ross, D. M. et al. Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* 122, 515–522 (2013).

Roy Chowdhury, S. & Banerji, V. Targeting Mitochondrial Bioenergetics as a Therapeutic Strategy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018, 1–10 (2018).

Ruzzolini, J. et al. Everolimus selectively targets vemurafenib resistant BRAF V600E melanoma cells adapted to low pH. *Cancer Letters* 408, 43–54 (2017).

Sadri, N. & Zhang, P. Hypoxia-Inducible Factors: Mediators of Cancer Progression; Prognostic and Therapeutic Targets in Soft Tissue Sarcomas. *Cancers* 5, 320–333 (2013).

Sai, B. & Xiang, J. Disseminated tumour cells in bone marrow are the source of cancer relapse after therapy. *J Cell Mol Med* 22, 5776–5786 (2018).

Sakata, T. et al. L-type amino-acid transporter 1 as a novel biomarker for high-grade malignancy in prostate cancer. *Pathology International* 59, 7–18 (2009).

Sale, M. J. et al. MEK1/2 inhibitor withdrawal reverses acquired resistance driven by BRAFV600E amplification whereas KRASG13D amplification promotes EMT-chemoresistance. *Nat Commun* 10, 2030 (2019).

Samudio, I. et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J. Clin. Invest.* 120, 142–156 (2010).

Saudemont, A. & Quesnel, B. In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis. *Blood* 104, 2124–2133 (2004).10.

Saudemont, A. et al. Dormant Tumor Cells Develop Cross-Resistance to Apoptosis Induced by CTLs or Imatinib Mesylate via Methylation of Suppressor of Cytokine Signaling 1. *Cancer Research* 67, 4491–4498 (2007).

Saunier, E. et al. Resveratrol reverses the Warburg effect by targeting the pyruvate dehydrogenase complex in colon cancer cells. *Sci Rep* 7, 6945 (2017).

Sawai, C. M. et al. Hematopoietic Stem Cells Are the Major Source of Multilineage Hematopoiesis in Adult Animals. *Immunity* 45, 597–609 (2016).

Scalise, M., Pochini, L., Galluccio, M., Console, L. & Indiveri, C. Glutamine Transport and Mitochondrial Metabolism in Cancer Cell Growth. *Front. Oncol.* 7, 306 (2017).

Schell, J. C. & Rutter, J. The long and winding road to the mitochondrial pyruvate carrier. *Cancer Metab* 1, 6 (2013).

Schell, J. C. et al. A Role for the Mitochondrial Pyruvate Carrier as a Repressor of the Warburg Effect and Colon Cancer Cell Growth. *Molecular Cell* 56, 400–413 (2014).

Schepers, K. et al. Myeloproliferative Neoplasia Remodels the Endosteal Bone Marrow Niche into a Self-Reinforcing Leukemic Niche. *Cell Stem Cell* 13, 285–299 (2013).

Schönthal, A. H. Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica* 2012, 1–26 (2012).

Schroeder, T. Asymmetric Cell Division in Normal and Malignant Hematopoietic Precursor Cells. *Cell Stem Cell* 1, 479–481 (2007).

Sell, S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 51, 1–28 (2004).

Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M. & Wang, G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269, 23757–23763 (1994).

Shafat, M. S. et al. Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. *Blood* 129, 1320–1332 (2017).

Shinohara, H. et al. Perturbation of energy metabolism by fatty-acid derivative AIC-47 and imatinib in BCR-ABL-harboring leukemic cells. *Cancer Letters* 371, 1–11 (2016).

Shirmanova, M. V. et al. Chemotherapy with cisplatin: insights into intracellular pH and metabolic landscape of cancer cells in vitro and in vivo. *Sci Rep* 7, 8911 (2017).

Silver, R. T. et al. An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. *Blood* 94, 1517–1536 (1999).

Singh, D. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor and metabolic pathways: possible targets of cancer. *Cell Biosci* 7, 62 (2017).

Smith, R. L., Soeters, M. R., Wüst, R. C. I. & Houtkooper, R. H. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. *Endocrine Reviews* 39, 489–517 (2018).

Song, Z., Wei, B., Lu, C., Li, P. & Chen, L. Glutaminase sustains cell survival via the regulation of glycolysis and glutaminolysis in colorectal cancer. *Oncology Letters* 14, 3117–3123 (2017).

Sonveaux, P. et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* JCI36843 (2008).

Soverini, S. et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 118, 1208–1215 (2011).

Stincone, A. et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway: The pentose phosphate pathway. *Biol Rev* 90, 927–963 (2015).

Stone, T. W., McPherson, M. & Gail Darlington, L. Obesity and Cancer: Existing and New Hypotheses for a Causal Connection. *EBioMedicine* 30, 14–28 (2018).

Stuani, L., Sabatier, M. & Sarry, J.-E. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. *BMC Biol* 17, 57 (2019).

Sturgill, E. M. & Guzman, M. L. Cytokine Induced Nuclear Localization Of Pyruvate Kinase M2 In Acute Myeloid Leukemia. *Blood* 122, 5406–5406 (2013).

Sun, R. C. & Denko, N. C. Hypoxic Regulation of Glutamine Metabolism through HIF1 and SIAH2 Supports Lipid Synthesis that Is Necessary for Tumor Growth. *Cell Metabolism* 19, 285–292 (2014).

Sundstrøm, T. et al. Inhibition of mitochondrial respiration prevents BRAF-mutant melanoma brain metastasis. *acta neuropathol commun* 7, 55 (2019).

Suzanne, M. & Steller, H. Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death Differ* 20, 669–675 (2013).

Svensson, R. U. et al. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models. *Nat Med* 22, 1108–1119 (2016).

Sweet, K. et al. A phase I clinical trial of ruxolitinib in combination with nilotinib in chronic myeloid leukemia patients with molecular evidence of disease. *Leukemia Research* 74, 89–96 (2018).

Talebi, A. et al. Sustained SREBP-1-dependent lipogenesis as a key mediator of resistance to BRAF-targeted therapy. *Nat Commun* 9, 2500 (2018).

Teng, M. W. L., Swann, J. B., Koebel, C. M., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *Journal of Leukocyte Biology* 84, 988–993 (2008).

Theodosakis, N. et al. BRAF Inhibition Decreases Cellular Glucose Uptake in Melanoma in Association with Reduction in Cell Volume. *Mol Cancer Ther* 14, 1680–1692 (2015).

Thews, O. & Riemann, A. Tumor pH and metastasis: a malignant process beyond hypoxia. *Cancer Metastasis Rev.* 38, 113–129 (2019).

Thomas, D. & Majeti, R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* 129, 1577–1585 (2017).

Tsutsumi, H., Tani, K., Fujii, H. & Miwa, S. Expression of L- and M-type pyruvate kinase in human tissues. *Genomics* 2, 86–89 (1988).

Tynan, S. H., Lundeen, S. G. & Allan, G. F. Cell type-specific bidirectional regulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) gene by estrogen. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 91, 225–239 (2004).

Vannini, N. et al. Specification of haematopoietic stem cell fate via modulation of mitochondrial activity. *Nat Commun* 7, 13125 (2016).

Vazquez, F. et al. PGC1 α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. *Cancer Cell* 23, 287–301 (2013).

- Wang, D.**, Moothart, D. R., Lowy, D. R. & Qian, X. The Expression of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Associated Cell Cycle (GACC) Genes Correlates with Cancer Stage and Poor Survival in Patients with Solid Tumors. *PLoS ONE* 8, e61262 (2013).
- Wang, H.** *et al.* Targeting Immune-Mediated Dormancy: A Promising Treatment of Cancer. *Front. Oncol.* 9, 498 (2019).
- Wang, S.** & Lin, S.-Y. Tumor dormancy: potential therapeutic target in tumor recurrence and metastasis prevention. *Exp Hematol Oncol* 2, 29 (2013).
- Wang, Y.** *et al.* Upregulations of Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper by Hypoxia and Glucocorticoid Inhibit Proinflammatory Cytokines under Hypoxic Conditions in Macrophages. *J.I.* 188, 222–229 (2012).
- Warburg, O.** On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314 (1956).
- Wetzler, M.** *et al.* Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J. Clin. Invest.* 92, 1925–1939 (1993).
- Wigerup, C.**, Pålman, S. & Bexell, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 164, 152–169 (2016).
- Willems, L.** *et al.* Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood* 122, 3521–3532 (2013).
- Wilson, A.** & Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 93–106 (2006).
- Wilson, A.** *et al.* Dormant and Self-Renewing Hematopoietic Stem Cells and Their Niches. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1106, 64–75 (2007).
- Wilson, W. R.** & Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 11, 393–410 (2011).
- Wise, D. R.** *et al.* Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 18782–18787 (2008).
- Wong, N.** *et al.* Changes in PKM2 Associate with Prostate Cancer Progression. *Cancer Investigation* 32, 330–338 (2014).
- Wood, I. S.** & Trayhurn, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89, 3–9 (2003).
- Xue, C.** *et al.* Targeting P-glycoprotein expression and cancer cell energy metabolism: combination of metformin and 2-deoxyglucose reverses the multidrug resistance of K562/Dox cells to doxorubicin. *Tumor Biol.* 37, 8587–8597 (2016).
- Yadav, N.** *et al.* Oxidative phosphorylation-dependent regulation of cancer cell apoptosis in response to anticancer agents. *Cell Death Dis* 6, e1969–e1969 (2015).
- Yadav, R. K.**, Chae, S.-W., Kim, H.-R. & Chae, H. J. Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer. *J Cancer Prev* 19, 75–88 (2014).
- Yang, C.** *et al.* Glutamine Oxidation Maintains the TCA Cycle and Cell Survival during Impaired Mitochondrial Pyruvate Transport. *Molecular Cell* 56, 414–424 (2014).
- Yang, J.** *et al.* Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer* 18, 26 (2019).

- Yasumoto, Y. et al.** Inhibition of Fatty Acid Synthase Decreases Expression of Stemness Markers in Glioma Stem Cells. *PLoS ONE* 11, e0147717 (2016).
- Ye, D., Wolff, N., Li, L., Zhang, S. & Ilaria, R. L.** STAT5 signaling is required for the efficient induction and maintenance of CML in mice. *Blood* 107, 4917–4925 (2006).
- Yu, J. S. L. & Cui, W.** Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* 143, 3050–3060 (2016).
- Zacharias, N. M. et al.** Metabolic Differences in Glutamine Utilization Lead to Metabolic Vulnerabilities in Prostate Cancer. *Sci Rep* 7, 16159 (2017).
- Zhang, M. et al.** Adipocyte-Derived Lipids Mediate Melanoma Progression via FATP Proteins. *Cancer Discov* 8, 1006–1025 (2018).
- Zhang, M., Mileykovskaya, E. & Dowhan, W.** Gluing the Respiratory Chain Together: cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 277, 43553–43556 (2002).
- Zhang, W., Zhang, S.-L., Hu, X. & Tam, K. Y.** Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target? *Int. J. Biol. Sci.* 11, 1390–1400 (2015).
- Zhou, C.-F. et al.** Pyruvate kinase type M2 is upregulated in colorectal cancer and promotes proliferation and migration of colon cancer cells. *IUBMB Life* 64, 775–782 (2012).
- Zhu, H. et al.** Pyruvate kinase M2 (PKM2) expression correlates with prognosis in solid cancers: a meta-analysis. *Oncotarget* 8, (2017).
- Zimmerer, R. M. et al.** Functional features of cancer stem cells in melanoma cell lines. *Cancer Cell Int* 13, 78 (2013).
- Zou, H. et al.** MPC1 deficiency accelerates lung adenocarcinoma progression through the STAT3 pathway. *Cell Death Dis* 10, 148 (2019).

Résumé

Le métabolisme mitochondrial : un facteur clé dans la survie des cellules cancéreuses sous traitements anticancéreux

De nombreux arguments indiquent que les cellules cancéreuses présentent une glycolyse exacerbée quelle que soit la teneur en oxygène, un phénomène appelé « Effet Warburg » ou glycolyse aérobie. Cependant, contrairement à ce que pensait Otto Warburg, ce phénomène n'est pas secondaire à une altération irréversible du métabolisme des mitochondries. Plusieurs travaux ont récemment montré l'importance du métabolisme mitochondrial dans les différentes caractéristiques tumorigéniques des cellules cancéreuses, tels que la prolifération cellulaire, la survie, la résistance au stress oxydant et au stress réticulaire, mais également dans la résistance aux traitements anticancéreux. Dans un modèle de leucémie aigüe myéloïde, nous avons montré que la surexpression de la protéine GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper) permet de rediriger le métabolisme des cellules leucémiques vers la phosphorylation oxydative (OXPHOS) mitochondriale et d'augmenter le niveau de ROS mitochondriaux, les rendant alors sensibles aux molécules pro-oxydantes ciblant la mitochondrie. D'autre part, dans un modèle de mélanome muté BRAV600E, les cellules résistantes aux inhibiteurs de BRAF (BRAFi) remodelent leur réseau mitochondrial autour du réticulum endoplasmique (RE), permettant la captation de calcium du RE dans les mitochondries et de limiter le stress réticulaire. Ces cellules présentent une augmentation de leur OXPHOS mitochondriale et de la production de ROS mitochondriaux. Afin de faire face au stress oxydatif, les cellules de mélanome mutées BRAFV600E surexpriment le facteur NRF2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) afin d'augmenter la voie des pentoses phosphates et la production de glutathion. Les mitochondries peuvent également participer à la survie des cellules cancéreuses sous chimiothérapies en utilisant des voies métaboliques alternatives. Dans la leucémie myéloïde chronique présentant BCR-Abl, le traitement à l'Imatinib induit une diminution de l'activité glycolytique qui participe aux effets anti-tumoraux de ce médicament. Cependant, certaines cellules sont capables de survivre et de persister sous traitement au travers de l'utilisation d'autres substrats métaboliques telle que la glutamine. Nous avons alors montré que l'association de thérapies ciblées et d'inhibiteurs du métabolisme de la glutamine était efficace pour induire une coopérativité anti-métabolique affectant la survie de ces cellules dans différents modèles de résistance et de persistance sous traitements anticancéreux. Nos différents travaux montrent que le métabolisme mitochondrial joue un rôle clé dans la tumorigenèse et la survie des cellules cancéreuses sous thérapies ciblées quelque soit le modèle. Par conséquent, l'utilisation d'inhibiteurs de la mitochondrie représente une cible thérapeutique intéressante en combinaison avec d'autres chimiothérapies afin d'induire une létalité synthétique et de traiter les cancers.

Mots clés : métabolisme, mitochondrie, cancer, thérapies ciblées, coopérativité anti-métabolique, ciblage mitochondrial