



HAL
open science

Etude de la résistance à l'apoptose des cellules de cancer du sein triple négatif sous l'influence des fibroblastes associés au cancer

Lisa Nocquet

► To cite this version:

Lisa Nocquet. Etude de la résistance à l'apoptose des cellules de cancer du sein triple négatif sous l'influence des fibroblastes associés au cancer. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2023. Français. NNT : 2023NANU1026 . tel-04812761

HAL Id: tel-04812761

<https://theses.hal.science/tel-04812761v1>

Submitted on 1 Dec 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : Cancérologie

Par

Lisa NOCQUET

« Etude de la résistance à l'apoptose des cellules de cancer du sein triple négatif sous l'influence des fibroblastes associés au cancer »

Thèse présentée et soutenue à NANTES, le 30 novembre 2023

Unité de recherche : CRCI²NA INSERM U1307

Composition du Jury :

Président :	Xavier Prieur	PU, Université de Nantes, Institut du Thorax, INSERM U1087
Rapporteurs :	Corinne Bousquet	DR INSERM, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), INSERM U1037
	Serge Manié	DR CNRS, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), INSERM U1052
Examineurs :	Géraldine Gentric	CR INSERM, Institut Curie, INSERM U830
	Xavier Prieur	PU, Université de Nantes, Institut du Thorax, INSERM U1087
Dir. de thèse :	Frédérique Souazé	CR, CRCI ² NA, INSERM U1307
Co-dir. de thèse :	Philippe Juin	DR, CRCI ² NA, INSERM U1307

Remerciements

Je tiens chaleureusement à remercier ma directrice de thèse **Frédérique Souazé** de m'avoir fait confiance et m'avoir prise sous son aile pour réaliser ce travail. Merci de m'avoir tout appris. Je te remercie sincèrement pour ta bienveillance et ta bonne humeur pendant ces quatre années.

Merci à **Philippe Juin** de m'avoir également fait confiance en m'accueillant dans son équipe. Merci pour toutes les discussions riches que nous avons pu avoir pendant toutes ces années. Je te remercie d'avoir toujours eu à cœur de valoriser mon travail.

Je remercie Dr **Corinne Bousquet** et Dr **Serge Manié** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux en qualité de rapporteurs de ma thèse, ainsi que Dr **Géraldine Gentric** et Pr **Xavier Prieur** d'avoir accepté d'évaluer ma thèse en tant qu'examineurs.

Je souhaite également remercier les personnes qui ont collaboré en interne à l'équipe ou en externe à mes travaux de recherche : **Julie Roul**, **Laurine Duarte**, **Mario Campone**, **Ophélie Renoult** (CRCI²NA, Nantes), **Claire Pecqueur** (CRCI²NA, Nantes), **Agnès Basseville** (Institut de Cancérologie de l'Ouest, Angers-Nantes), **Mikaël Croyal** (Plateforme de Spectrométrie, Nantes), **Olivier Hérault** (LNOx, Tours) et **Jérôme Bourgeais** (LNOx, Tours).

Je remercie tout particulièrement mes deux co-thésards sous l'aile également de Fred : **Thomas Bonneaud** et **Chloé Lefebvre**. Merci d'avoir été mes super voisins ! Merci pour la bonne ambiance et les bons moments où nous avons bien ri.

Je remercie l'ensemble de l'équipe 7 pour nos nombreux échanges scientifiques et nombreux échanges pas scientifiques du tout. En particulier, merci à **Alison Dumont** et **Aurélié Fétiveau** pour nos discussions et de m'avoir également aidé à avancer.

Un (re)merci à **Agnès Basseville** pour tous nos échanges et en particulier les discussions métabo, ainsi que son expertise bioinformatique dans l'analyse de nos données.

Je remercie Dr **Claire Pecqueur** et Dr **Richard Tomasini** pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et les discussions riches qui m'ont aidée dans l'avancement de mon projet.

Merci également aux membres des autres équipes du centre avec qui j'ai eu la chance d'échanger et qui m'ont aidée durant ma thèse.

Je tiens à remercier mes parents, **Jean-Ro** et **Paupau**, pour tout le soutien qu'ils m'apportent depuis toujours. Merci de m'avoir toujours encouragée et poussée à donner le meilleur de moi-même.

Merci à ma sœur **Marion** de m'accompagner depuis le premier jour de notre vie. Merci pour notre complicité et pour ton soutien sans faille. Et merci de me répéter tout le temps que je suis la meilleure.

Merci à mon amoureux **Nathan**. Merci pour ton soutien, ta patience, ton humour, les randos bières, les fléchettes, les parties de pêche et j'en passe.

Merci à mon frangin **Thomas** et tonton **Laurent** pour tous les bons moments que nous passons. Je sais aussi que je peux compter sur vous, et compte bien continuer de profiter des weekends et des vacances en famille !

Merci à mes grands-parents **Marie, Bernadette** et **Robert** pour tout l'amour et le soutien qu'ils m'ont apportés dans mes études et dans la vie en général.

Un grand merci aussi à « **Les Fesses** ». Merci pour tous les super moments que nous continuons de passer depuis l'agro. Merci d'être toujours là pour les rigolades.

Merci aux **copains nantais** qui m'ont suivie pendant ces quelques années et avec qui j'ai eu la chance de partager de très bons moments.

Enfin, je remercie **tous les copains** qui m'ont suivie de près ou de loin pendant ces années de thèse.

... Et je tiens sincèrement à remercier l'ensemble des personnes qui ont eu un jour ou tous les jours à subir mes « 5 minutes » de retard. Pour votre patience, merci.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	3
Table des illustrations	7
Liste des abréviations	9
INTRODUCTION	13
Chapitre 1 : Les Cancers du Sein	15
I- Développement des cancers du sein	15
a) Anatomie et Physiologie du sein	15
b) Apparition des cancers du sein et hétérogénéité	16
c) Mutations retrouvées dans les cancers du sein	17
d) Détection des cancers du sein	19
II- Classifications des cancers du sein	19
a) Classifications histopathologiques	19
b) Classifications histologiques et moléculaires	21
1- Classification histologique	21
2- Classifications moléculaires.....	23
c) Traitements	25
d) Résistances aux traitements.....	28
Chapitre 2 : L'Apoptose et la famille BCL-2	31
I- Caractéristiques de l'apoptose	31
a) Une mort cellulaire programmée parmi d'autres types de mort cellulaire	31
b) Description de l'apoptose	32
c) Les deux voies de l'apoptose.....	34
1- La voie intrinsèque de l'apoptose	35
2- La voie extrinsèque de l'apoptose.....	36
d) Importance de l'apoptose en physio-pathologie	37
II- La famille BCL-2	38
a) Les membres de la famille BCL-2.....	38
1- Les protéines pro-apoptotiques effectrices	39
2- Les protéines anti-apoptotiques gardiennes.....	41

3-	Les protéines pro-apoptotiques BH3-only	44
b)	La famille BCL-2 dans les cancers	45
1-	Dans les cancers en général	46
2-	Dans les cancers du sein.....	49
3-	Interactions entre l'UPR et les protéines de la famille BCL-2 dans les cancers	49
III-	Les BH3-mimétiques.....	52
a)	Présentation des BH3-mimétiques.....	52
b)	Le ciblage de BCL-2 et BCL-xL	53
c)	Le ciblage de MCL-1.....	55
d)	Vers une utilisation clinique des BH3-mimétiques ?.....	56
Chapitre 3-	Le métabolisme dans les cancers	58
I-	Caractéristiques du métabolisme dans les cancers	58
a)	Effet Warburg et métabolisme mitochondrial dans les cancers	58
b)	Régulation du métabolisme des cancers.....	61
c)	Le métabolisme dans les cancers du sein.....	63
II-	Implication du métabolisme dans la progression tumorale	66
a)	Initiation et prolifération.....	66
b)	Métastases	68
c)	Immunorégulation.....	69
III-	Le métabolisme dans la résistance aux traitements	71
a)	Résistance aux traitements	71
b)	Régulation de l'apoptose par le métabolisme	76
c)	Régulation du métabolisme par les protéines de la famille BCL-2.....	79
IV-	Vers une utilisation clinique d'inhibiteurs du métabolisme ?	82
Chapitre 4 :	Les Fibroblastes Associés au Cancer (CAFs)	84
I-	Caractéristiques des CAFs	84
a)	Les fibroblastes.....	84
1-	Description et origines	84
2-	Activation et fonctions des fibroblastes.....	86
b)	Les CAFs.....	88
c)	Activation des CAFs	90
d)	Hétérogénéité des CAFs	92
1-	«Polarisation» des CAFs	92

2- Hétérogénéité des marqueurs	93
II- Importance des CAFs dans la progression tumorale	97
a) Interactions avec les cellules malignes.....	97
1- Via des cytokines et facteurs de croissance	97
2- Via des nutriments	99
3- Via les protéines de la MEC	101
4- Autres types d'interactions	103
b) Interactions avec les cellules endothéliales	105
c) Interactions avec les cellules immunitaires.....	105
III- Vers un ciblage des CAFs ?	108
OBJECTIFS DU PROJET.....	113
RESULTATS.....	115
ARTICLE 1	117
" Cancer-associated fibroblasts mitigate the efficacy of the combination of chemotherapy and BCL-xL targeting in triple negative breast cancer cells "	
Résumé de l'article 1	119
Discussion de l'article 1.....	139
ARTICLE 2	143
"Cancer-associated fibroblasts enhance resistance to apoptosis in triple-negative breast cancer cells by restricting glucose availability and upregulating MCL-1 expression"	
Résumé de l'article 2	145
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	173
Les mécanismes cellulaires à l'origine des effets protecteurs des CAFs diffèrent selon les lignées cancéreuses.....	175
Les CAFs modulent le métabolisme des MDA-MB-468.....	179
La protéine ATF4 est augmentée par les MC CAFs et la déprivation en glucose, mais n'est pas nécessaire à l'effet protecteur des MC CAFs contre l'apoptose des MDA-MB-468	181
Matériels et méthodes supplémentaires	186
DISCUSSION	189
Amélioration du modèle d'étude	191
Hétérogénéité des dépendances métaboliques et des effets des CAFs.....	192
Modulations du métabolisme des cellules malignes par les CAFs	195

Implication potentielle de certains processus cellulaires dans les effets protecteurs des CAFs..	197
Importance de MCL-1 dans les effets observés	199
Vulnérabilités thérapeutiques induites par l'absence de glucose sous influence des CAFs	200
CONCLUSION GENERALE	203
BIBLIOGRAPHIE	204
ANNEXES.....	267
Mitochondria at Center of Exchanges between Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts during Tumor Progression (Nocquet et al., 2020).....	269
Targeting of MCL-1 in breast cancer-associated fibroblasts reverses their myofibroblastic phenotype and pro-invasive properties (Bonneaud et al., 2022).....	287

Table des illustrations

Figure 1: Anatomie du sein.....	15
Figure 2: Modèles de l'évolution clonale et des cellules souches cancéreuses.....	17
Figure 3: Evaluation du stade de cancer du sein à partir des critères de classification TNM	21
Figure 4: Classification histologique des cancers du sein.....	22
Figure 5 : Classification moléculaire des cancers du sein obtenue à partir d'échantillons de patientes par analyse sur puces à ADN	24
Figure 6 : Chimiothérapies les plus couramment utilisées dans le traitement des cancers du sein	27
Figure 7 : Survie des patientes suivant le sous-type de cancer du sein et le stade I, II, III, ou IV aux Etas-Unis.....	28
Figure 8 : Représentation morphologique de trois voies de mort cellulaire	32
Figure 9 : Les deux voies d'activation de l'apoptose.....	35
Figure 10 : Structure des membres de la famille BCL-2	39
Figure 11 : Localisations subcellulaires des membres de la famille BCL-2.....	40
Figure 12 : Interaction entre les différents membres de la famille BCL-2	42
Figure 13 : Principales caractéristiques du développement tumoral	45
Figure 14 : Taux d'échantillons présentant un gain du nombre de copies de MCL-1, BCL2L1 et BCL-2 dans différents types dans différents cancers	47
Figure 15 : Représentation schématique de l'UPR.....	50
Figure 16 : Le devenir cellulaire sous le contrôle d'ATF4.....	51
Figure 17 : Ciblage des protéines anti-apoptotiques par les BH3-mimétiques.....	53
Figure 18 : Principales voies métaboliques modifiées dans les cancers.	59
Figure 19 : Schéma général de l'hétérogénéité métabolique entre les sous-types de cancer du sein	64
Figure 20 : Mécanismes de résistance des cellules malignes aux traitements induite par la disponibilité en glucose.....	72
Figure 21 : Mécanismes de résistance des cellules malignes aux traitements induite par d'autres substrats nutritifs et conditions environnementales.....	73
Figure 22 : Impact de l'absence de glucose ou de glutamine sur les membres de la famille BCL-2 et le devenir des cellules malignes.....	77
Figure 23 : Interaction des protéines de la famille BCL-2 et de transporteurs et enzymes mitochondriaux	80
Figure 24 : Origines des fibroblastes	85
Figure 25 : Marqueurs d'inclusion et d'exclusion relatifs aux fibroblastes.....	86
Figure 26 : Différentes étapes de l'activation du fibroblaste.....	88
Figure 27 : La composition du microenvironnement tumoral (Kalluri, 2016).....	89
Figure 28 : Hétérogénéité des CAFs au sein des tumeurs mammaires.....	94
Figure 29 : Impact des CAFs sur les cellules malignes dans les cancers et implication dans la progression tumorale	104
Figure 30 : Influence des CAFs sur les cellules immunitaires lors de la réponse immunitaire anti-tumorale.....	106
Figure 31 : Les différentes stratégies envisagées pour cibler les CAFs	110
Figure 32 : Les fibroblastes associés au cancer limitent l'efficacité de la combinaison d'une chimiothérapie et du ciblage de BCL-xL sur des cellules malignes de cancer du sein triple négatifs .	120

Figure 33 : Les fibroblastes associés au cancer favorisent la résistance à l'apoptose de cellules de cancer du sein triple négatif en limitant la disponibilité en glucose et en augmentant les niveaux de MCL-1	146
Figure 34 : Différentes dépendances métaboliques en présence d'ABT-737 en fonction des lignées cancéreuses	176
Figure 35 : Effet protecteur des milieux conditionnés de CAFs (MC CAFs) sur différentes lignées de cancer du sein puis avec des CAFs issus de cancer luminal	178
Figure 36 : Métabolisme des MDA-MB-468 sous influence des MC CAFs	180
Figure 37 : Analyse DGE sur données de RNAseq montrant que les variations de gènes impliqués dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique induites par l'ABT-737 ne sont pas retrouvées en présence des MC CAFs	182
Figure 38 : Influence des MC CAFs et de l'absence de glucose sur la voie phospho-EIF2 α /ATF4 dans les MDA-MB-468.....	184
Figure 39: Etude de l'implication d'ATF4 dans les effets protecteurs des MC CAFs contre l'apoptose des MDA-MB-468	185
Figure 40 : Niveau d'ATF4 dans les MDA-MB-468 sous influence des MC CAFs et de l'ABT-737 en fonction du temps en western blot.....	197
Figure 41 : Effet d'ONC212 sur la sensibilité des MDA-MB-468 à l'ABT-737 en absence de glucose et sous l'influence des MC CAFs.	202

Liste des abréviations

2DG	2-Deoxy-D-Glucose	CREB	Camp Response Element Binding Protein
2HG	2-Hydroxyglutarate	CSCs	Cancer Stem Cells
4EBP1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Binding Protein 1	CSTN	Cancers Du Sein Triple Négatifs
5-Fu	5-Fluorouracile	CXCL14	C-X-C Motif Chemokine Ligand 14
ABC	ATP-Binding-Cassette	CXCR4	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
ADN	Deoxyribonucleic Acid	DDR2	Discoidin Domain Receptor 2
ADP	Adenosine Diphosphate	DGE	Differential Gene Expression
AKT	Protein Kinase B	DISC	Death Inducing Signaling Complex
AML	Acute Myeloid Leukemia	DNA-PK	DNA-Dependent Protein Kinase
AMP	Cyclic Adenosine Monophosphate	ECAR	ExtraCellular Acidification Rate
AMPK	AMP-Activated Protein Kinase	EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
APAF-1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1	EIF2α	Eukaryotic initiation factor 2 alpha
ARC	Association Pour La Recherche Sur Le Cancer	EndoMT	Endothelial-Mesenchymal
ARNInc	ARN long non codant	EPCs	Endothelial Progenitor Cells
ATF	Activating Transcription Factor	ER	Récepteur Aux Œstrogènes
ATM	Ataxia Telangiectasia	ERCC1	Excision Repair Cross-Complementation Group 1
ATP	Adenosine Triphosphate	ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2
BAK	Bcl-2 Homologous Antagonist Killer	ERα	Estrogen Receptor A
BAX	Bcl-2-Associated X Protein	FAK	Focal Adhesion Kinase
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2	FAP	Fibroblast Activation Protein
BCL-2A1	BCL2 Related Protein A1	FASN	Fatty-Acid Synthase
BCL-xL	Bcl-2 Like Protein X	FBW7	F-Box/WD Repeat-Containing Protein 7
BH	BCL-2 Homology Domain	FDA	Food And Drug Administration
BOK	Bcl-2 Related Ovarian Killer	FEC	5-Fluorouracile / Epirubicine / Cyclophosphamide
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2	FGF	Fibroblast Growth Factor
c-FLIP	Flice Associated Death Factor	FH	Fumarate Hydratase
CAF	Cancer-Associated Fibroblast	FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
CCL2	C-C Motif Chemokine Ligand 2	FSP1	Fibroblast-Specific Protein 1
CD	Cluster Of Differentiation	GATA3	Guanosine-Adenosine-Thymidine-Adenosine Binding Protein 3
CDK	Cyclin-Dependent Kinase	GCN2	General-Control Non-Repressible 2
CHOP	C/Ebp Homologous Protein	GLS	Glutaminase
CPT1	Carnitine Palmitoyl-Transferase-1	GLUT	Glucose Transporter

GO	Gene Ontology	MFAP1	Microfibril Associated Protein 1
GPR132	G Protein Coupled Receptor 132	miARNs	Microarns
GPR77	G Protein-Coupled Receptor 77	MMP	Matrix Metalloproteinase
GRB7	Growth Factor Receptor Bound Protein 7	MMT	Mesenchymal-Mesenchymal Transition
GRP78	Glucose-Regulated Protein 78	MOMP	Perméabilisation De La Membrane Externe Mitochondriale
GSH	Reduced Glutathione	MPC	Mitochondrial Pyruvate Carrier
H2O2	Hydrogen Peroxide	MSC	Mesenchymal Stem Cell
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2	mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
HEY1	Hairy/Enhancer-Of-Split Related With YRPW Motif Protein 1	MYC	Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
HGF	Hepatocyte Growth Factor	myCAF	Myofibroblastique
HIF	Hypoxia-Inducible Factor	NAD(P)H	Nicotinamide Adenine DiNucleotide (Phosphate)
HK2	Hexokinase 2	NAMPT	NicotinAMide PhosphoribosylTransferase
HRI	Heme-Regulated Inhibitor	NFkB	Nuclear Factor-Kappa B
HSF1	Heat Shock Factor 1	NG2	Neural/Glial Antigen 2
IAP	Inhibitor Of Apoptosis Protein	NK	Natural Killer
iCAF	Inflammatory Cancer-Associated Fibroblast	NOTCH1	Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1
IDH	Isocitrate Dehydrogenase	NOX	NADPH Oxydase
IDO	Indoleamine 2,3-Dioxygenase	NSEP1	Nuclease Sensitive Element Binding Protein 1
IGF(R)	Insulin-Like Growth Factor (Receptor)	OCR	Oxygen Consumption Rate
IGFBP	Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein	OSCC	Oral Squamous Cell Carcinoma
IRE1	Inositol Requiring Enzyme 1	OXPHOS	Oxidative Phosphorylation
IRM	Magnetic Resonance Imaging	P-gp	P-Glycoprotein
ISR	Integrated Stress Response	p53	Tumor Protein 53
ITGB4	Integrin Subunit Beta 4	PAR1	Proteinase-Activated Receptor 1
JAK1	Janus Kinase 1	PARP	Poly-Adp-Ribose-Polymerase
JNK	C-Jun N-Terminal Kinase	PDGF(R)	Platelet-Derived Growth Factor (Receptor)
KEAP1	Kelch-Like ECH-Associated Protein 1	PDK	Dehydrogenase Kinase
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog	PERK	PKR-Related Endoplasmic Reticulum Kinase
LDHA	Lactate Dehydrogenase A	PEST	Proline, Glutamic Acid, Serine And Threonine
LIF	Leukemia Inhibitory Factor	PET	Positron Emission Tomography
LPCAT 2	Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 2	PGC1α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha
MC CAFs	Milieux conditionnés de CAFs	PGE2	Prostaglandine E2
MCL-1	Myeloid Cell Leukemia 1		
MEC	Matrice Extracellulaire		

PHGDH	Phosphoglycerate Dehydrogenase	tBid	Truncated Bid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase	TEAD	TEA Domain Family Member 1
PI3KCA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha	Teff	T Cell Effector
PIP3,4,5	Phosphatidylinositol (3,4,5) Tri-Phosphate	TFAM	Mitochondrial Transcription Factor A
PKR	Protein Kinase R	TGF-β	Transforming Growth Factor B
PML	Promyelocytic Leukemia Protein	TIL	Tumor-Infiltrating Lymphocyte
PR	Progesterone Receptor	TNF	Tumor Necrosis Factors
PS	Phosphatidylserine	TNM	Tumor, Node, Metastasis
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog	TRAIL	Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
RAS	Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog	Treg	Regulatory T Cell
ROBO1	Roundabout Homolog 1	UCA1	Urothelial Carcinoma-Associated 1
ROS	Reactive Oxygen Species	UICC	Union Internationale Contre le Cancer
S6K1	Ribosomal Protein S6 Kinase Beta-1	uPA	Urokinase Plasminogen Activator
SDF1	Stromal Cell-Derived Factor 1	UPR	Unfolded Protein Response
SDH	Succinate Dehydrogenase	UTP	Uracile-Triphosphate
SIRT3	Sirtuin 3	VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
SMAC	Second Mitochondrial Activator Of Caspases	VDAC2	Voltage-Dependent Anion Carrier 2
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Protein	VEGF(R)	Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)
SRF	Serum Responsive Factor	VHL	Von Hippel-Lindau
STAT3/5	Signal Transducers And Activators Of Transcription	VLCAD	Very Long Chain Acyl-Coa Dehydrogenase
TAM	Tumor-Associated Macrophage	XIAP	X-Linked Inhibitor Of Apoptosis Protein
TAZ	Transcriptional Coactivator With PDZ-Binding Motif	YAP1	Yes-Associated Protein 1
		α-SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Les Cancers du Sein

I- Développement des cancers du sein

a) Anatomie et Physiologie du sein

Le sein est un organe constitué d'une glande mammaire et d'un tissu de soutien formé par des vaisseaux, des fibres et de la graisse. Sa fonction biologique primaire est d'assurer la nutrition du nouveau-né par la production de lait. La glande mammaire est divisée en 15 à 20 compartiments séparés par du tissu graisseux, chacun constitué de canaux lactifères (transport du lait) et de lobules composés de nombreuses alvéoles (production du lait en période d'allaitement) (Hennighausen & Robinson, 2005) (**Figure 1**).

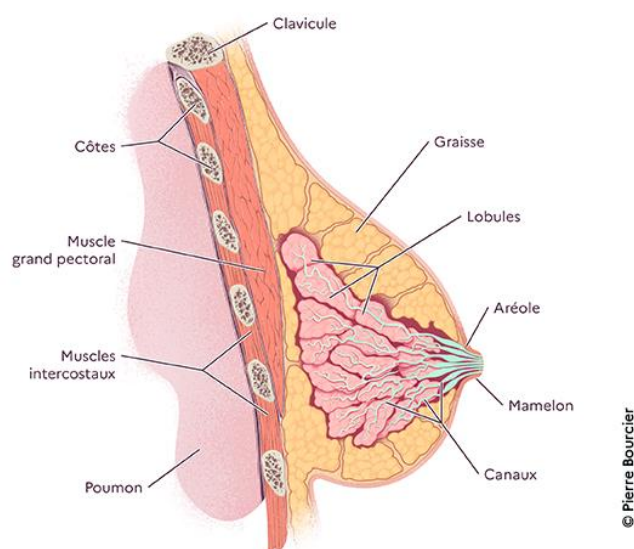


Figure 1: Anatomie du sein
(Institut National du Cancer, INCA).

L'épithélium de la glande mammaire est composé principalement de deux types cellulaires (Moumen et al., 2011). Les cellules épithéliales luminales font face au lumen et sont subdivisées en cellules canaliculaires et en cellules lobulaires responsables de la production et de la sécrétion du lait au cours de la grossesse et de la lactation. Les cellules basales myoépithéliales possèdent des propriétés contractiles grâce notamment à l'expression de cytokératines et d' α -SMA (smooth muscle actin) permettant l'acheminement du lait. Ces dernières cellules régulent également la prolifération et la différenciation des cellules luminales. Ces types cellulaires sont entourés d'une lame basale qui les sépare du stroma constitué principalement d'adipocytes, de fibroblastes et d'une matrice extracellulaire (MEC). Le tissu de soutien est ainsi constitué d'un tissu conjonctif et d'un tissu graisseux,

qui contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Le réseau lymphatique constitué de ganglions et vaisseaux lymphatiques aide notamment à combattre les infections.

La glande mammaire subit de nombreux changements lors de la puberté et chez l'adulte au cours de chaque cycle menstruel et des grossesses, sous le contrôle de facteurs de croissance et de stimulations hormonales (Hennighausen & Robinson, 2005). En particulier, la prolactine intervient au cours de la croissance de la glande mammaire et lors de la grossesse permettant la lactogénèse. Les œstrogènes permettent le développement des seins lors de la puberté et jouent un rôle important tout au long de la grossesse. La progestérone joue notamment un rôle dans la différenciation des cellules du sein. Les récepteurs aux œstrogènes ER α (estrogen receptor α), à la progestérone et à la prolactine sont principalement exprimés par les cellules luminales, bien que les cellules myoépithéliales basales répondent à des stimulations hormonales *in vivo* (Brisken & O'Malley, 2010).

b) Apparition des cancers du sein et hétérogénéité

La formation des cancers du sein est caractérisée par une accumulation de mutations génétiques ou épigénétiques aboutissant à la surexpression d'oncogènes (*c-MYC*, *RAS* ...) et la sous-expression de gènes suppresseurs de tumeur (*p53*, *BRCA1*, *PTEN* ...), induisant l'échappement à la mort et la prolifération accrue des cellules (M. Zhang et al., 2017).

Les cancers du sein sont des cancers hétérogènes aux niveaux inter-tumoral (entre les individus) et intra-tumoral (au sein d'une même tumeur) (Polyak, 2011). Les différences génétiques participent aux différences entre cellules au sein d'une même tumeur. Ces différences génétiques pourraient avoir différentes origines suivant le modèle considéré. Le modèle des « cellules souches cancéreuses » (CSC) propose une organisation hiérarchique des cellules telle que seul un sous-ensemble limité soutient la tumorigénèse et établit l'hétérogénéité cellulaire inhérente à la tumeur primaire (Bonnet & Dick, 1997; Visvader & Lindeman, 2012). Bien que les CSCs présentent des propriétés souches d'auto-renouvellement et de différenciation, elles ne sont pas nécessairement issues de la transformation de cellules souches de tissu normal. De nombreuses études montrent que ce modèle n'explique pas à lui seul l'hétérogénéité tumorale dans toutes les tumeurs (Visvader & Lindeman, 2012). Un autre modèle, appelé modèle de l'« évolution clonale », propose que la tumeur est issue d'une cellule d'origine et la progression tumorale résulte de la variabilité génétique acquise à partir du clone d'origine, permettant des sélections séquentielles de clones plus agressifs (Nowell, 1976). Des transformations malignes pourraient ainsi apparaître dans des cellules différenciées, résultant en l'apparition de cellules distinctes génétiquement et épigénétiquement (Greaves & Maley, 2012; Kreso & Dick, 2014; Polyak &

Weinberg, 2009). Le modèle de l'origine des cancers du sein est sujet à controverses, mais il semble que les modèles de cellules souches cancéreuses et d'évolution clonale ne sont pas mutuellement exclusifs (Kreso & Dick, 2014) (**Figure 2**). L'hétérogénéité intra-tumorale pourrait ainsi résulter de la combinaison des deux modèles.

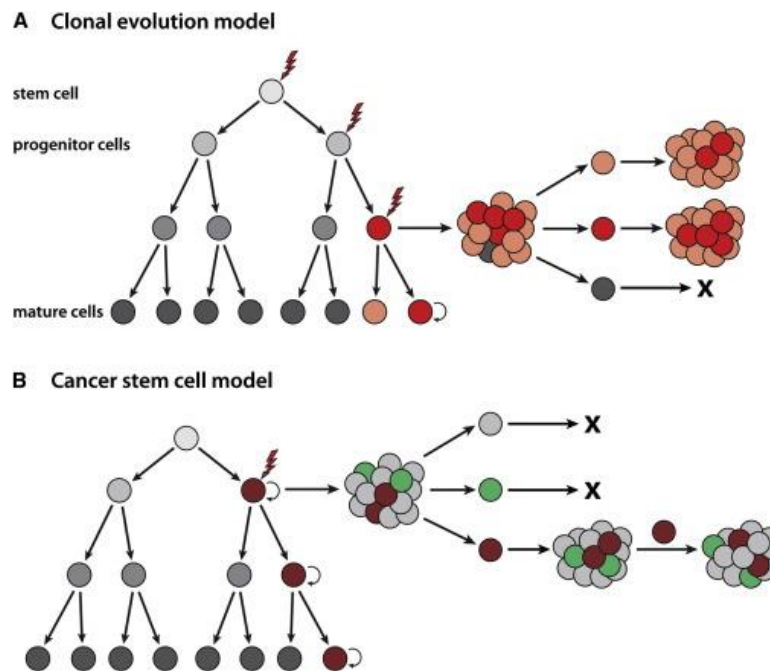


Figure 2: Modèles de l'évolution clonale et des cellules souches cancéreuses.

A. Le modèle de l'évolution clonale est un modèle non hiérarchique dans lequel les mutations des cellules malignes leur confèrent un avantage sélectif. L'hétérogénéité tumorale résulte de la diversité des cellules présentes au sein de la tumeur. **B.** Le modèle de cellules souches cancéreuses est un modèle basé sur une organisation hiérarchique des cellules, dans lequel une sous-population de cellules seulement a la capacité de soutenir la tumorigenèse et de générer l'hétérogénéité via leur différenciation (Visvader & Lindeman, 2012)

Au sein du stroma, fibroblastes, cellules endothéliales et cellules immunitaires participent ainsi à l'hétérogénéité tumorale en modulant les conditions environnementales dans lesquelles les cellules malignes évoluent (Polyak, 2007). Le stroma participe d'ailleurs à la croissance et à la propagation tumorale à travers de nombreux échanges avec les cellules malignes.

c) Mutations retrouvées dans les cancers du sein

De nombreuses mutations géniques sont retrouvées dans les cancers du sein. Ces mutations peuvent être germinales ou somatiques. Ici, nous nous intéressons à certaines mutations majeures retrouvées dans les cancers du sein.

P53

P53 (Tumor Protein 53) est un facteur de transcription qui régule de nombreux gènes impliqués dans la réponse à la mort cellulaire et au cycle cellulaire. *P53* est le gène suppresseur de tumeur retrouvé le plus muté dans les cancers en général (S. Kim & An, 2016). *P53* est retrouvé muté dans 30% des cancers du sein (Cancer Genome Atlas Network, 2012). La plupart des mutations *P53* sont des mutations faux-sens (Marcel et al., 2011).

BRCA1/2

BRCA1/2 (Breast Cancer genes 1/2) font également partie des gènes les plus fréquemment retrouvés mutés dans les cancers du sein et sont associés au risque de développer un cancer du sein (Zubair et al., 2020). *BRCA1* régule de nombreuses voies comme le processus transcriptionnel, la prolifération, la réparation de l'ADN, et *BRCA2* est principalement impliqué dans la réparation de l'ADN (Gorodetska et al., 2019). Les mutations de ce gène peuvent être germinales mais elles sont principalement somatiques, et des mutations sur les deux allèles sont nécessaires pour observer un effet tumorigène (Godet & Gilkes, 2017). Il a été montré que l'environnement tissulaire joue un rôle majeur dans le développement des cancers du sein lors de mutations germinales de *BRCA1/2* (A. K. Singh & Yu, 2020).

PTEN

PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) est un autre gène suppresseur de tumeur muté dans les cancers du sein. *PTEN* déphosphoryle le messenger secondaire pléiotropique PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5) tri-phosphate), limitant alors l'activité de la voie PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/AKT (protein kinase B) et donc certains processus comme la division et la survie cellulaires (Cantley & Neel, 1999; Myers et al., 1998). Dans les cancers, la perte de *PTEN* observée induit une augmentation du signal PI3K, favorisant ainsi la tumorigenèse et la progression tumorale. Les mécanismes majeurs d'inactivation de *PTEN* sont des délétions géniques, retrouvées dans 40% à 50% des cancers du sein ainsi que des mutations, retrouvées dans 5% à 10% des cancers du sein (Bazzichetto et al., 2019; Coughlin et al., 2010). La perte fonctionnelle de *PTEN* est également induite par d'autres types de régulations comme des régulations épigénétiques et des régulations post-traductionnelles (Coughlin et al., 2010).

Il existe d'autres gènes retrouvés mutés dans les cancers du sein et participant à la tumorigenèse comme *ATM* (Ataxia Telangiectasia) ou *PI3KCA* (Phosphatidylinositol 3-Kinase α) (T. W. Miller, 2012; Shiovitz & Korde, 2015).

d) Détection des cancers du sein

Le nombre de nouveaux cas de cancers du sein est estimé à plus de 61 000 en France pour l'année 2023 d'après Santé Publique France (*Incidence des principaux cancers en France métropolitaine en 2023 et tendances depuis 1990*, Santé Publique France, 2023). Depuis 2004, la généralisation à l'échelle nationale du dépistage du cancer du sein repose sur un programme national basé sur un examen clinique des seins et une mammographie réalisés tous les deux ans chez les femmes de 50 à 74 ans ne présentant pas de symptôme ou de facteur de risque particulier (Les Cancers du Sein, ARC, 2020). Si une anomalie est repérée, des examens complémentaires et notamment une biopsie sont prescrits pour préciser la nature de la lésion. Un dépistage individuel peut aussi être proposé aux femmes en fonction des facteurs de risque. Pour les femmes dont une parente (mère, sœur, tante) a développé un cancer du sein avant 50 ans, et d'autant plus lorsqu'une mutation génétique associée a été identifiée (comme BRCA1/2), un suivi régulier est particulièrement important, avec un examen clinique pratiqué tous les six mois. Ce suivi repose en plus sur l'utilisation d'échographies et d'IRM mammaires. Les cancers du sein peuvent ainsi être détectés avant même l'apparition des premiers signes cliniques. Dans un état plus avancé, les cancers du sein peuvent induire une grosseur ou induration (durcissement anormal) au niveau du sein ou de l'aisselle, une déformation, ulcération ou rétractation de la peau au niveau du sein ou encore un écoulement anormal au niveau du mamelon (Les Cancers du Sein, ARC, 2020).

Le dépistage organisé du cancer du sein ainsi que le dépistage individuel des personnes à plus haut risque de développer un cancer permettent de détecter les cancers du sein de plus en plus précocement, améliorant ainsi le pronostic des patientes (Gill et al., 2004; C. Taylor et al., 2023). La biopsie réalisée chez les patientes permet de confirmer le diagnostic de cancer et de préciser la nature de la tumeur suivant différentes classifications reconnues.

II- Classifications des cancers du sein

a) Classifications histopathologiques

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, les cancers du sein peuvent être catégorisés suivant leur origine (Sinn & Kreipe, 2013). Lorsque le cancer du sein est issu d'un épithélium glandulaire, notamment des lobules ou des canaux terminaux, il est appelé adénocarcinome. Les adénocarcinomes représentent 95% des cancers du sein (V. Kumar et al., 2014). Il existe également d'autres types de cancers suivant leur origine comme les sarcomes qui sont issus des tissus conjonctifs qui soutiennent

les canaux et les lobules. Ils peuvent être issus de myofibroblastes ou de vaisseaux sanguins, et représentent moins d'1% des cancers du sein (S. Hassan & Adari, 2004). Parmi les autres types de cancers du sein, les phyllodes ont une origine fibro-épithéliale et les angiomes sont issus des tissus mésenchymateux.

Les cliniciens s'intéressent particulièrement à une autre classification histologique des cancers du sein, reposant sur le caractère infiltrant ou non de la tumeur. Ce critère repose sur la capacité des adénocarcinomes à franchir la lame basale. Les carcinomes *in situ* sont localisés dans les lobules ou les canaux mammaires, alors que les carcinomes infiltrants ou invasifs envahissent les tissus adjacents. Ces types de tumeurs mammaires sont catégorisés en sous-types suivant leur cytologie, comme les cancers canaux ou lobulaires *in situ*, ou encore canaux, canalo-lobulaires ou mucineux infiltrants (Malhotra et al., 2010).

De plus, le grade d'un cancer du sein indique son agressivité et permet d'affiner le choix du traitement. Le grade est déterminé par l'addition de scores qui reposent sur 3 paramètres : le degré de différenciation, le pléiomorphisme nucléaire et l'activité mitotique des cellules malignes (Lester et al., 2009). Il existe 3 grades notés de I à III, du pronostic le plus favorable au plus défavorable.

Enfin, le stade de la tumeur est largement utilisé en clinique pour évaluer la progression du cancer. Ce stade repose sur la classification TNM (Tumor, Node, Metastasis_Tumeur, Ganglion, Métastase) qui est définie par l'Union Internationale du Cancer (IUCC) et par l'American Joint Committee on Cancer. Il permet d'adapter le traitement en fonction de l'avancée de la maladie. Il repose sur la taille et l'infiltration de la tumeur (degré d'évolution du cancer), l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques (niveau de propagation) et la présence ou non de métastases (dissémination). Ces critères sont numérotés suivant un gradient et la combinaison de ces numéros indique le stade du cancer du sein (**Figure 3**).

Tumor		Node		Metastasis	
Numéro	Critère	Numéro	Critère	Numéro	Critère
TX	Non évaluable	NX	Envahissement non évaluable	MX	Renseignement insuffisant
T0	Non décelable	N0	Absence envahissement	M0	Absence de métastases
Tis	Carcinome in situ	N1mi	Micrométastases 0,2mm < x < 2mm	M1	Présence de métastases à distance
T1	Tumeur < 2cm	N1	Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires		
T2	Tumeur 2cm < x < 5cm	N2	Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires, ou ganglions mammaires internes		
T3	Tumeur > 5cm	N3	Envahissement des ganglions sous-claviculaires		
T4	Tumeur toute taille Extension directe (paroi thoracique ou peau)				
Stade		Critères			
Stade 0		Tis N0 M0			
Stade I		T1 N0 M0			
Stade II		T0 N1 M0 / T1 N1 M0 / T2 N0 M0 / T2 N1 M0 / T3 N0 M0			
Stade III		T0-4 N2 M0 / T3 N1 M0 / T4 N0 M0 / T4 N1 M0 / T0-4 N3 M0			
Stade IV		T0-4 N0-3 M1			

Figure 3: Evaluation du stade de cancer du sein à partir des critères de classification TNM (d'après UICC, 7^{ème} édition).

b) Classifications histologiques et moléculaires

1- Classification histologique

Au-delà des différences histopathologiques des cancers du sein, une classification majeure utilisée en clinique repose sur l'expression de récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone et l'amplification du gène codant pour le récepteur HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2). L'expression de ces protéines est évaluée par immunohistochimie. Elle permet de classer les cancers du sein en trois types majeurs : les luminaux, les HER2 amplifiés et les triple négatifs (**Figure 4**).

Classification	Récepteurs hormonaux		HER2	Ki67
	RO	RP		
Luminal A	+	+	-	Faible (<20%)
Luminal B	-	+	+	Fort (>20%)
	HER2	+	+	
HER2+	-	-	Surexpression	Fort
Triple Négatif	-	-	-	Fort

Figure 4: Classification histologique des cancers du sein
(RO : Récepteurs aux œstrogènes, RP : récepteurs à la progestérone)

Récepteurs aux hormones

Les récepteurs aux œstrogènes (ER) s'oligomérisent avec leurs ligands et sont transloqués dans le noyau où ils régulent l'activité transcriptionnelle de la cellule en recrutant différents facteurs de transcription et coactivateurs. Dans le cancer du sein, les récepteurs aux œstrogènes (principalement l'isoforme ER α) sont retrouvés surexprimés dans de nombreux cas et favorisent la tumorigenèse et la croissance tumorale (P. Chen et al., 2022). Ils sont retrouvés exprimés dans une large majorité des cancers du sein (Zubair et al., 2020). Les récepteurs à la progestérone (PR) agissent également par dimérisation et translocation dans le noyau où ils régulent la transcription de gènes (Azeez et al., 2021).

Les cancers du sein qui expriment les récepteurs aux œstrogènes et/ou à la progestérone sont des cancers de type **luminal**, et représentent environ 70%-75% des cas de cancers du sein (Orrantia-Borunda et al., 2022). Ils se développent à partir de cellules progénitrices luminales ou cellules luminales matures (Skibinski & Kuperwasser, 2015). Il existe 2 sous-types luminaux : le **luminal A** et le **luminal B**, qui se distinguent principalement par leur capacité invasive et leur niveau de prolifération. Le luminal A est en effet plutôt tubulaire ou canalaire avec un marqueur de prolifération Ki67 faible (inférieur à 20%) et est de bon pronostic, alors que le luminal B est plutôt invasif avec un marqueur de prolifération Ki67 élevé (supérieur à 20%) et est de moins bon pronostic (Goldhirsch et al., 2013). En général, les cancers luminaux présentent un pronostic favorable grâce à l'utilisation possible des hormonothérapies (Howlader et al., 2018; Yersal & Barutca, 2014).

HER2

Le récepteur HER2 fait partie de la famille des tyrosine-kinases transmembranaires. Il est capable en cas de forte expression de s'homo-dimériser ou s'hétéro-dimériser avec d'autres membres de la même famille, même en l'absence de ses ligands (Yersal & Barutca, 2014). Cette auto-activation induit des

voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale et le processus métastatique (Moasser, 2007). Les cancers n'exprimant pas les récepteurs aux hormones mais présentant une forte expression de HER2 sont appelés **HER2+ (HER2 amplifié)** et représentent environ 10%-15% des cas de cancers du sein (Orrantia-Borunda et al., 2022). L'intensité et la distribution du marquage HER2 au sein de la biopsie indiquent un score d'intensité allant de 0 à 3+. Le gène codant HER2 est dit surexprimé lorsque le score est 3+ ou lorsque le score 2+ est associé à l'amplification du gène, mesurée par la méthode d'Hybridation Fluorescente In Situ (FISH) (Dybdal et al., 2005; G. Viale et al., 2014). Les cancers HER2+ sont souvent invasifs et présentent un indice de prolifération Ki67 élevé. Cependant, les thérapies ciblées anti-HER2 améliorent nettement le pronostic des patientes HER2+ (Swain et al., 2023).

Parmi le sous-type luminal B, les cancers surexprimant HER2 sont appelés luminal B like HER2 ou cancers triple positifs. Au contraire, les **cancers triple négatifs** (CSTN) n'expriment ni les récepteurs hormonaux ni l'oncogène HER2. Ces cancers sont particulièrement invasifs. Ils sont constitués de cellules hétérogènes souvent peu différenciées et présentant un indice de prolifération élevé. Ils constituent environ 20% des cas de cancer du sein (Orrantia-Borunda et al., 2022). Les cancers du sein triple négatifs sont divisés en sous-types en fonction de l'expression de certains gènes.

Au sein d'une même tumeur, les cellules sont hétérogènes puisqu'elles peuvent exprimer différents niveaux de récepteurs hormonaux et de HER2. Le sous-type est identifié par la prédominance d'un type cellulaire sur les autres (Polyak, 2011).

2- Classifications moléculaires

L'expression de certains gènes est également utilisée pour caractériser les cancers du sein et mieux prédire les réponses aux traitements (Malhotra et al., 2010). Des signatures multigéniques ont ainsi été établies grâce aux tests prédictifs PAM50 (Parker et al., 2009) et EndoPredict (Filipits et al., 2011) afin de préciser le phénotype moléculaire des cancers du sein et d'évaluer notamment le risque de développer des métastases à distance. L'analyse moléculaire des cancers du sein a permis l'établissement de nouvelles classifications moléculaires plus précises des cancers du sein comme la suivante: luminal A, luminal B, HER2 amplifié, basal-like, normal-like et claudin-low (Parker et al., 2009; Prat et al., 2010; Sorlie et al., 2003) (**Figure 5**).

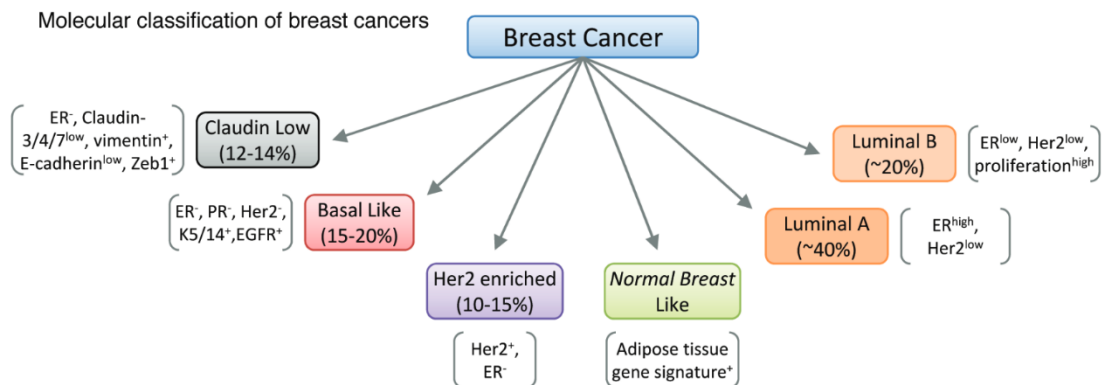


Figure 5 : Classification moléculaire des cancers du sein obtenue à partir d'échantillons de patientes par analyse sur puces à ADN
(Malhotra et al., 2010)

Les cancers luminaux B se distinguent des luminaux A par la surexpression de gènes impliqués dans la prolifération comme la NSEP1 (nuclease sensitive element binding protein 1) et la cycline E1 (Yersal & Barutca, 2014), et peuvent ainsi être identifiés par un niveau d'expression élevé du marqueur de prolifération Ki67. Les cancers luminaux sont caractérisés entre autres par l'expression des cytokératines 8 et 18, GATA3 (guanosine-adenosine-thymidine-adenosine binding protein 3) et BCL-2 (B-cell lymphoma 2) (Carey, 2010), et présentent des mutations de PI3KCA (49% lumA et 32% lumB) et P53 (12% lumA et 32% lumB) (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Les cancers HER2+ présentent une amplification du gène codant pour HER2. Des gènes voisins du gène codant pour HER2 sont également amplifiés dans les cancers HER2+ comme la topoisomérase II α et GRB7 (Growth Factor Receptor Bound Protein 7) (Carey, 2010). Des mutations de P53 (75%) et PI3KCA (42% des cas) sont également observées, ainsi que l'inactivation de PTEN (19%) (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Les cancers appartenant au sous-type histologique triple négatif peuvent être divisés en plusieurs groupes. Les cancer basal-like expriment les gènes retrouvés dans des cellules myoépithéliales basales comme les cytokératines 5, 14 et 17, les cavéolines 1 et 2 et l'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) (Yersal & Barutca, 2014). Ils présentent très largement des mutations de P53 (84%) (Cancer Genome Atlas Network, 2012), et également des mutations de BRCA1 (Sorlie et al., 2003). Ils présentent également une inactivation de PTEN (35%) (Cancer Genome Atlas Network, 2012). Les claudin-low forment un autre groupe appartenant au sous-type triple négatif qui a été décrit plus récemment et qui est caractérisé par la faible expression des gènes des claudines 3, 4 et 7 et E-cadhérine (Prat et al., 2010). Ces cancers expriment peu de marqueurs de différenciation luminaux mais présentent un enrichissement en marqueurs de cellules souches ou de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

Enfin, les cancers normal-like expriment des gènes de cellules non-épithéliales et de tissus adipeux (Yersal & Barutca, 2014), suggérant que ce sous-type pourrait être plus un artefact de tissu normal qu'un réel sous-type de cancer du sein (Parker et al., 2009). Ils se différencient des basal-like par l'absence d'expression des cytokératines et de l'EGFR (Yersal & Barutca, 2014).

D'autres classifications sont développées à partir de profils d'expression génétique dans le but de mieux comprendre les mécanismes de résistance aux traitements. Par exemple, une autre classification divise les cancers du sein triple négatifs en 6 sous-groupes : tumeurs basales 1 et 2, immunomodulatrices, mésenchymateuses-like, souche mésenchymateuses-like ou positives aux récepteurs aux androgènes (Lehmann et al., 2011). De nouvelles études continuent d'affiner cette classification (Burstein et al., 2015; Y.-R. Liu et al., 2016). De plus, certains sont parvenus, par une approche protéomique, à identifier un sous-groupe de cancer luminal caractérisé par une augmentation de la voie de signalisation PI3K (Yanovich et al., 2018), soulignant la complémentarité de l'analyse protéomique de tumeurs de patientes permettant d'identifier des particularités qui ne sont pas observées par approche transcriptomique.

Lors de ma thèse, je me suis intéressée particulièrement aux cancers les plus agressifs que sont les cancers triple négatifs. Nous avons ainsi utilisé les lignées humaines de cancer du sein triple négatif MDA-MB-468 et MDA-MB-231. MDA-MB-468 est issue de l'effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire métastatique. Dans cette lignée cellulaire appartenant au sous-type basal-like (Prat et al., 2010), PTEN est inactivé par délétion, P53 est muté faux-sens et EGFR est amplifié (Chavez et al., 2010; Hollestelle et al., 2010). Nous avons également utilisé la lignée MDA-MB-231 qui est issue d'un adénocarcinome mammaire primitif et dans laquelle PTEN est actif, P53 est muté faux-sens et KRAS (Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog) est muté (Chavez et al., 2010). Cette lignée est classée dans le sous-type claudin-low (Prat et al., 2010).

Ces différentes classifications ne sont pas réellement utilisées en clinique, mais constituent un cadre très intéressant afin d'étudier les cancers du sein, et en particulier leur réponse aux traitements.

c) Traitements

Il existe différents traitements permettant la prise en charge d'un cancer du sein. Ils peuvent être utilisés seuls ou en association et sont choisis selon la nature, la localisation et le stade de la maladie. De plus, l'âge et l'état de santé général sont des éléments importants lors du choix thérapeutique (Harbeck et al., 2013). En particulier, le choix des traitements est principalement réalisé en s'appuyant

sur la classification histologique (ER/PR+, HER2+ ou CSTN), sur le stade TNM et le grade du cancer du sein.

La **chirurgie** est le traitement de référence de la plupart des cancers du sein (Harbeck et al., 2013). Elle vise à enlever les tissus touchés par les cellules cancéreuses. En fonction de la taille de la tumeur, elle peut être réalisée en premier ou est précédée d'un traitement « néoadjuvant » destiné à réduire la taille de la tumeur avant l'opération pour en améliorer l'efficacité. Les thérapies néoadjuvantes sont de plus en plus utilisées avant les chirurgies (Balic et al., 2023).

La **radiothérapie**, qui est également un traitement local, utilise des radiations à haute énergie pour induire la mort des cellules cancéreuses, en provoquant des lésions à l'ADN. La radiothérapie repose sur l'émission de rayonnements ionisants, principalement des photons ou des électrons. Elle est le plus souvent utilisée après la chirurgie afin de détruire les cellules cancéreuses qui auraient pu échapper à la chirurgie (Balic et al., 2023). Elle peut être administrée à partir d'une source externe de rayonnements délivrés en fractionné sur plusieurs semaines (Hickey & Lehman, 2021). Plus précisément, les doses délivrées sont exprimées en grays (Gy) (1 Gy correspond à un 1 joule absorbé dans une masse de 1kg), et les patientes reçoivent entre 40 Gy et 60 Gy répartis sur plusieurs semaines, en fonction de l'évolution de la tumeur. De plus, la radiothérapie peut être administrée à partir de matériaux radioactifs implantés directement au contact de la tumeur (méthode appelée curiethérapie) (Kauer-Dorner & Berger, 2018).

Une **thérapie adjuvante** succède le plus souvent la chirurgie et la radiothérapie. Il existe principalement trois grands groupes de thérapies adjuvantes ou néoadjuvantes: les hormonothérapies, les thérapies ciblées et les chimiothérapies. Le choix de ces thérapies dépend de l'ensemble des critères cités précédemment et en particulier de la classification histologique du cancer du sein.

Les **hormonothérapies** sont proposées aux patientes dont la tumeur est hormono-dépendante (luminale). Elles visent à supprimer l'action stimulante des estrogènes sur les cellules tumorales soit par inhibition compétitive de la liaison des hormones avec leurs récepteurs (comme le fulvestrant ou le tamoxifène), soit par inhibition de la synthèse des hormones par l'organisme (Delozier, 2010).

Les **thérapies ciblées** agissent sur les cellules cancéreuses en ciblant une caractéristique propre à celles-ci, ou au moins largement plus fréquente chez elles que dans les cellules saines.

La thérapie ciblée la plus connue est le trastuzumab (Herceptin®) qui est un anticorps monoclonal ciblant les cellules cancéreuses surexprimant HER2 (Kreutzfeldt et al., 2020). Il est utilisé en association à des chimiothérapies adjuvantes. Des thérapies ciblées peuvent être utilisées en association avec des hormonothérapies comme des inhibiteurs de la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin)

(Everolimus) ou des inhibiteurs de CDK4-6 (Cyclin-Dependent Kinases) qui bloquent la division cellulaire (Rampioni Vinciguerra et al., 2022; Raphael et al., 2020). De plus, le bévacicumab est utilisé dans les cancers triples négatifs métastatiques en association avec les chimiothérapies. Cette molécule inhibe spécifiquement des récepteurs VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) impliqués dans le développement de nouveaux vaisseaux à proximité de la tumeur (Hey et al., 2020). D'autres thérapies ciblées sont actuellement en développement dans les cancers triple négatifs métastatiques comme des inhibiteurs de PI3K, d'AKT, et des immunothérapies de type PD-L1 (Yin et al., 2020). Enfin, les patientes présentant une mutation héréditaire *BRCA1* ou *BRCA2* peuvent bénéficier des inhibiteurs de PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymérase) qui bloquent la réparation de l'ADN (comme l'Olaparib) (Yin et al., 2020).

Les **chimiothérapies** sont les traitements au plus large spectre. Elles peuvent être données en complément des hormonothérapies ou des thérapies ciblées si nécessaire (Coates et al., 2015). Etant donné le manque de cible thérapeutique dans les cancers du sein triple négatifs, les chimiothérapies représentent l'essentiel des thérapies adjuvantes dans ce sous-type. Elles induisent généralement des dommages à l'ADN, résultant en un arrêt du cycle cellulaire et à la mort cellulaire (Wilson et al., 2006) (**Figure 6**). Elles sont particulièrement nécessaires en cas de métastases.

Classe	Action	Exemples
Anthracyclines	Intercalant de l'ADN	Doxorubicine, épirubicine
Agents alkylants	Formation de cassures lors de la réplication par liaisons fortes avec l'ADN	Cyclophosphamide, sels de platine
Antimétabolites	Substitution aux bases azotées de l'ADN lors de la réplication	5-fluorouracile, méthotrexate, gemcitabine
Taxanes	Anti-mitotique (perturbation de la dynamique des microtubules)	Paclitaxel, docétaxel
Vinca-alcaloïdes		Vinorelbine, vinblastine
Dérivés de l'épothilone		Ixabépilone

Figure 6 : Chimiothérapies les plus couramment utilisées dans le traitement des cancers du sein (d'après M. S. U. Hassan et al., 2010)

Les chimiothérapies sont souvent utilisées en combinaisons, comme les combinaisons Cyclophosphamide / Méthotrexate / 5-Fluorouracile (CMF), 5-Fluorouracile / Epirubicine / Cyclophosphamide (FEC) ou Docetaxel / Doxorubicine / Cyclophosphamide (TAC) (M. S. U. Hassan et al., 2010). Lors de ma thèse j'ai utilisé une combinaison proche de FEC, avec un antimétabolite (5-Fluorouracile_5-Fu), une anthracycline (Doxorubicine) et un agent alkylant (Cisplatine).

d) Résistances aux traitements

L'ensemble des dépistages précoces et des traitements utilisés ont permis d'améliorer nettement le pronostic des patientes atteintes de cancer du sein (Howlander et al., 2018; C. Taylor et al., 2023). L'efficacité des traitements est mesurée par leur capacité à réduire la taille de la tumeur et la propagation tumorale (Prihantono & Faruk, 2021). Les cancers luminaux sont les cancers qui présentent le meilleur pronostic (Howlander et al., 2018) (**Figure 7**), grâce notamment à l'efficacité des hormonothérapies. Des études montrent cependant que les cancers luminaux B répondent moins bien aux hormonothérapies que les luminaux A, et moins bien à des chimiothérapies contenant paclitaxel ou doxorubicine que les cancers HER2+ et triple négatifs. En revanche, les luminaux B semblent mieux répondre à certaines chimiothérapies néoadjuvantes que les luminaux A (Yersal & Barutca, 2014).

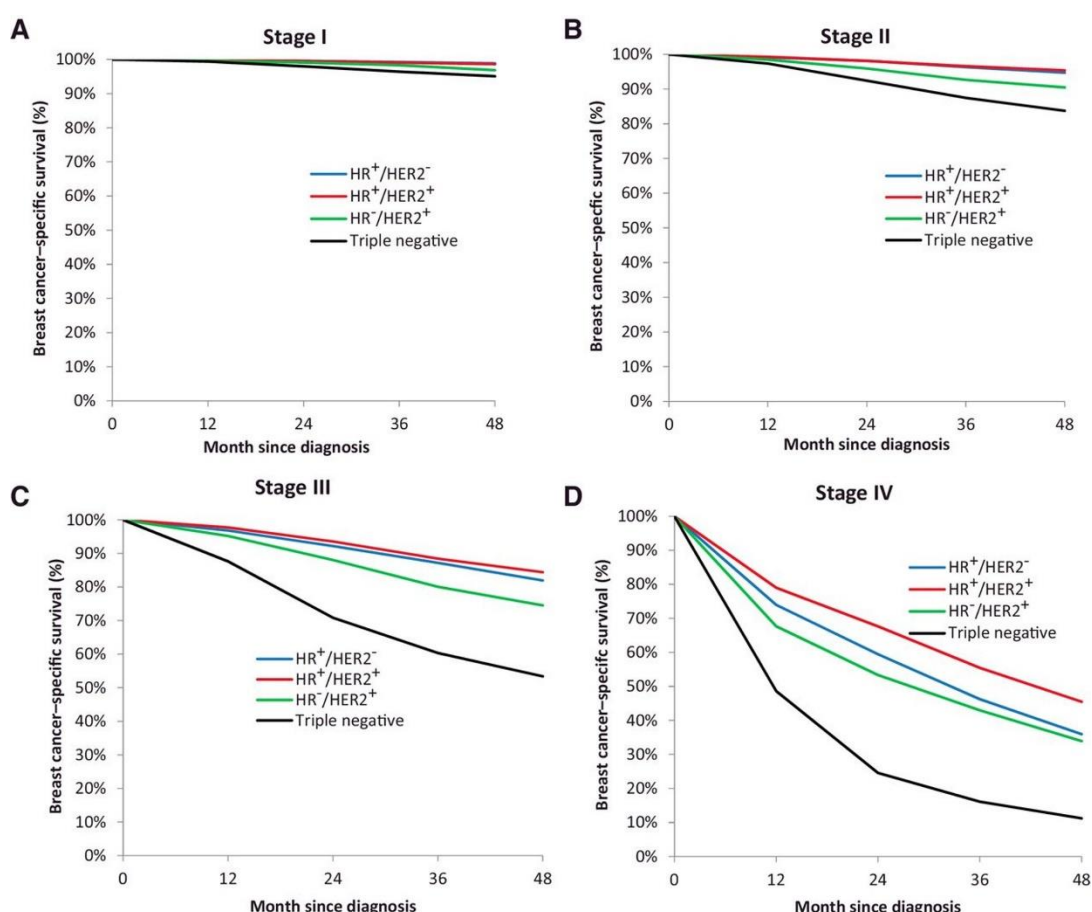


Figure 7 : Survie des patientes suivant le sous-type de cancer du sein et le stade I, II, III, ou IV aux Etas-Unis.

HR : récepteurs aux hormones (Howlander et al., 2018)

Les cancers du sein triple négatifs sont les cancers du sein avec le moins bon pronostic, en lien notamment avec le manque de thérapies ciblées pour combattre ce type de cancer (Boisserie-Lacroix et al., 2014). En particulier, les tumeurs développent de nombreuses résistances aux chimiothérapies

(Nedeljković & Damjanović, 2019), c'est-à-dire que les tumeurs progressent malgré les traitements. Cette progression tumorale désigne la rechute du cancer dans une période de 6 à 12 mois après le traitement adjuvant, ou la propagation de la maladie dans l'organisme (Andreopoulou & Sparano, 2013). Lorsque la rechute locale ou à distance apparaît plus de 12 mois après la fin du traitement, des études ont montré que les cancers peuvent répondre aux mêmes traitements dans les mêmes proportions qu'initialement (Castiglione-Gertsch et al., 1997; X. Guo et al., 2011).

Les tumeurs peuvent être intrinsèquement résistantes à certaines chimiothérapies ou développer des résistances acquises (Wilson et al., 2006). Les cellules sensibles aux traitements meurent ou arrêtent de proliférer alors que les cellules résistantes aux traitements poursuivent leur prolifération et sont donc sélectionnées positivement. Les résistances aux chimiothérapies sont notamment permises par une activation accrue des pompes à efflux, comme les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) (Gottesman et al., 2002). Ce type de résistance peut affecter des chimiothérapies ayant des modes d'action variés et est donc appelée résistance « multi-drogue ». En particulier, de nombreuses études ont montré la surexpression de la protéine P-gp (P-glycoprotéine, un transporteur ABC) dans de nombreuses lignées cellulaires résistantes aux traitements et dans un certain nombre de tumeurs solides (Krishna & Mayer, 2000; Pilotto Heming et al., 2022; H. Thomas & Coley, 2003). De plus, l'activation des traitements jouent un rôle majeur dans leurs effets cytotoxiques sur la tumeur. Par exemple, pour exercer son activité cytotoxique, le 5-Fu est converti par des enzymes telles que la thymidine phosphorylase et l'uridine phosphorylase (Evrard et al., 1999; Schwartz et al., 1985). Le methotrexate est quant à lui polyglutamaté par la folypolyglutamate synthase, ce qui augmente sa rétention cellulaire et son affinité de liaison pour son substrat. Au contraire, des mécanismes qui inactivent les traitements peuvent diminuer la quantité de drogue disponible pour atteindre sa cible. Par exemple, les sels de platine comme le cisplatine peuvent être inactivés par liaison au glutathion réduit (GSH), un antioxydant, ce qui favorise l'efflux de la drogue par les transporteurs ABC (Ishikawa & Ali-Osman, 1993; Meijer et al., 1992). Les chimiothérapies induisent des dommages à l'ADN, résultant en l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire. La réparation des dommages de l'ADN permet à la cellule de survivre et constitue donc un facteur important de la résistance aux chimiothérapies. Par exemple, l'expression de la protéine de réparation de l'ADN ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementation group 1) est associée à la résistance aux sels de platine dans différents cancers (Wilson et al., 2006). Ainsi, divers mécanismes de résistance aux traitements néoadjuvants ou adjuvants limitent l'efficacité des traitements, à l'échelle des cellules malignes mais également à l'échelle de l'organisme comme pour la métabolisation des substances chimiques. Les modulations d'expression des gènes impliqués dans ces mécanismes peuvent être médiées par des mutations

génétiques des cellules malignes (Goldie, 1983; Wilson et al., 2006) ou des modifications épigénétiques (Luque-Bolivar et al., 2020; Wilson et al., 2006).

Les chimiothérapies, en particulier celles qui induisent des dommages à l'ADN, provoquent la mort cellulaire par un type de mort programmée appelée apoptose (Hannun, 1997). Bien que l'apoptose ne soit pas le seul type de mort cellulaire induite par les chimiothérapies (Ricci & Zong, 2006), la dérégulation de médiateurs de l'apoptose (signaux pro-mort/ pro-survie) est un mécanisme majeur de résistance aux chimiothérapies (Dogan et al., 2022). Des cellules malignes dans lesquelles l'apoptose est facilitée sont en effet bien plus sensibles aux chimiothérapies (Hayward et al., 2004; E. Y. Kim et al., 2017; Teixeira et al., 1995; Zangemeister-Wittke, 2003). Comprendre les mécanismes de résistance à l'apoptose est donc d'un intérêt majeur pour mieux comprendre les résistances aux chimiothérapies et espérer les contrer. Nous détaillerons l'apoptose et les mécanismes de résistance à l'apoptose dans le **Chapitre 2- L'Apoptose et la Famille BCL-2**.

Le microenvironnement tumoral ou stroma, constitué d'une matrice extracellulaire et de différents types cellulaires comme les fibroblastes associés au cancer (CAFs), cellules endothéliales et cellules immunitaires, en plus de leur implication dans la croissance et l'invasion des cellules malignes, apportent un soutien majeur dans la résistance aux traitements.

Le stroma est caractérisé par la disponibilité en nutriments qui définit le contexte métabolique dans lequel les cellules malignes évoluent. Les cellules malignes s'adaptent à leur environnement nutritif en subissant des reprogrammations métaboliques. Ces reprogrammations métaboliques participent à de nombreuses résistances aux chimiothérapies dans les cancers (Zaal & Berkers, 2018). Nous préciserons l'importance du métabolisme cellulaire dans les résistances à la mort induite par les chimiothérapies dans le **Chapitre 3 – Le Métabolisme dans les Cancers**.

De plus, les cellules du microenvironnement tumoral échangent avec les cellules malignes qui augmentent l'expression de nombreux gènes impliqués dans leur survie (DeMichele et al., 2017; C. Tan et al., 2018; D. Yu et al., 2015). Il a en effet été montré qu'une signature élevée de gènes du stroma prédit une résistance à la chimiothérapie FEC en thérapie néoadjuvante dans des cancers du sein triple négatifs (Farmer et al., 2009). Par exemple, certains macrophages associés à la tumeur favorisent la résistance à diverses chimiothérapies via la sécrétion de protéines solubles ou de microARNs (miARNs) dans différents types de cancers *in vitro* et *in vivo* (Larionova et al., 2019). Les CAFs protègent également les cellules malignes des chimiothérapies (Qiao et al., 2016). Nous préciserons l'implication des CAFs dans la résistance à la mort des cellules malignes dans le **Chapitre 4 – Les Fibroblastes Associés au Cancer**.

Chapitre 2 : L'Apoptose et la famille BCL-2

I- Caractéristiques de l'apoptose

a) Une mort cellulaire programmée parmi d'autres types de mort cellulaire

Le fonctionnement des organismes multicellulaires repose sur l'équilibre homéostatique, qui est régi notamment par la balance entre prolifération et mort cellulaires.

Il existe de nombreux mécanismes entraînant la mort des cellules. Les plus étudiés sont la nécrose, mort historiquement décrite comme désordonnée et incontrôlée, et l'apoptose, une mort cellulaire programmée (Edinger & Thompson, 2004; Hotchkiss et al., 2009). D'autres voies de mort cellulaire ont été plus récemment décrites comme la nécroptose, la ferroptose, la pyroptose, ou encore la mort cellulaire autophagique (Galluzzi et al., 2018).

Ces morts se distinguent par 1- leurs contextes d'activations, 2- qui induisent des acteurs et des voies distinctes 3- qui aboutissent à des morphologies 4- et des conséquences pour l'organisme caractéristiques (Galluzzi et al., 2018). En particulier, l'apoptose est décrite comme une mort cellulaire active autonome sans rupture de la membrane plasmique, qui ne provoque pas d'inflammation, et se distingue en cela de la nécrose, mort cellulaire passive accompagnée d'un relargage incontrôlé de contenu cellulaire inflammatoire (Fink & Cookson, 2005) (**Figure 8**).

Les différents types de mort cellulaire ne sont pas totalement indépendants. En effet, certaines morts cellulaires font intervenir des partenaires communs (récepteurs de morts, protéases...). Ainsi, un signal inducteur de mort peut aboutir à des morts différentes suivant le contexte cellulaire (expression ou non de protéines impliquées par les cellules) (Cárdenas-Aguayo et al., 2003; Hitomi et al., 2008; Mills et al., 2004).

Nous nous intéressons ici particulièrement à l'apoptose, mort cellulaire programmée parmi les plus étudiées.

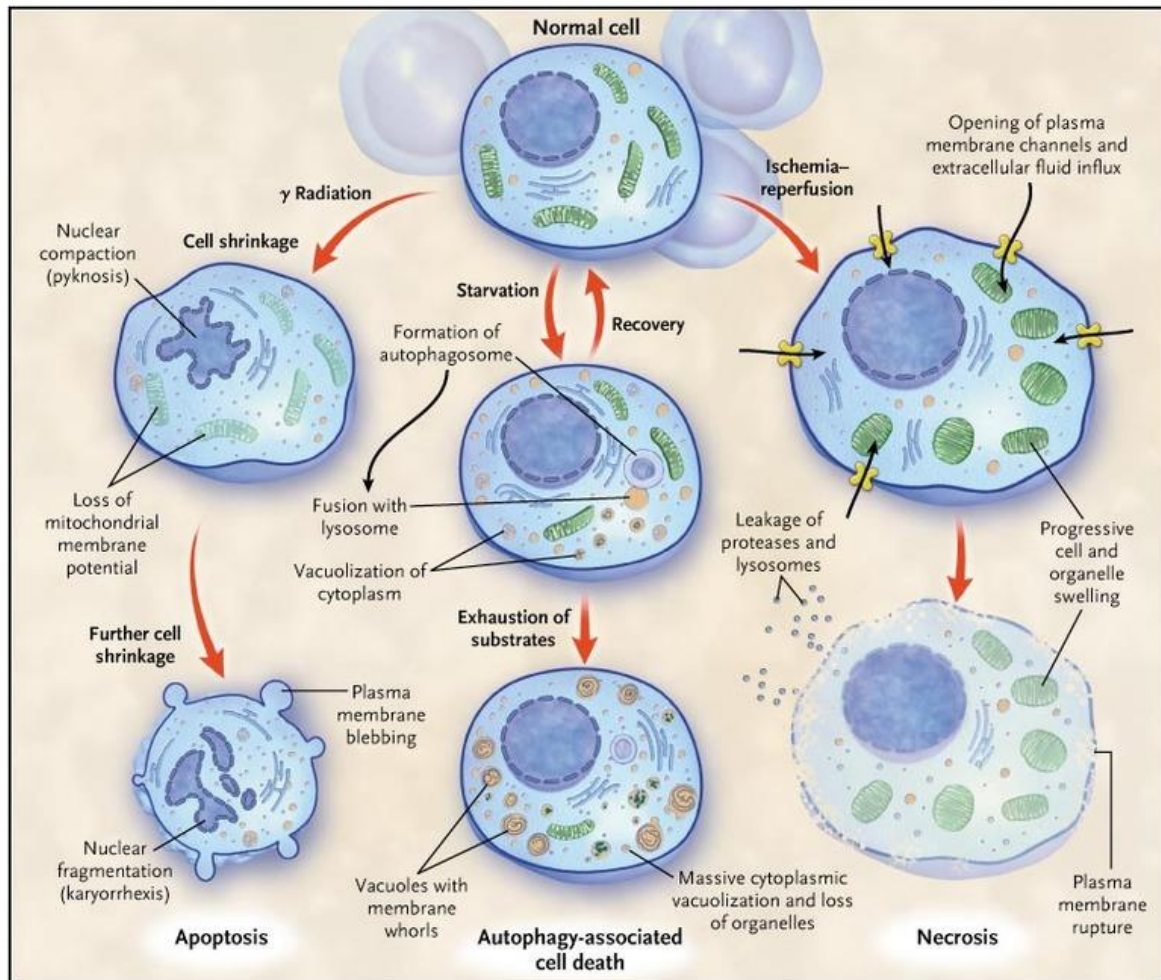


Figure 8 : Représentation morphologique de trois voies de mort cellulaire

Suite à un stress, la cellule peut subir un rétrécissement associé à une compaction du noyau et une perte du potentiel membranaire mitochondrial. Ces phénomènes peuvent aboutir à la fragmentation nucléaire et à la formation de protubérances de la membrane plasmique. Cette voie de mort cellulaire est appelée apoptose. La mort cellulaire associée à l'autophagie est favorisée par un stress nutritif important et est caractérisée par la dégradation de nombreuses organelles. Enfin, la nécrose est caractérisée par le gonflement des organelles et de la cellule, qui aboutit à la rupture de la membrane plasmique, libérant ainsi le contenu cellulaire. La nécrose, contrairement à l'apoptose, est dite inflammatoire. Un mode particulier de mort cellulaire peut prédominer en fonction de la lésion et du type cellulaire. (Hotchkiss et al., 2009)

b) Description de l'apoptose

Au cours du XIX^e siècle, les pathologistes ont observé une forme de mort cellulaire organisée impliquée dans le développement embryonnaire, en réponse au stress et permettant l'homéostasie. Cette mort semblait avoir lieu de manière « programmée » (H. M. Ellis & Horvitz, 1986; Lockshin, 1969; Saunders, 1966). Cette mort cellulaire programmée fut nommée 'apoptose' sur la base d'une description morphologique détaillée (J. F. R. Kerr et al., 1972). L'apoptose est caractérisée par la condensation de

la chromatine et un rétrécissement cellulaire accompagnés de la formation de corps apoptotiques enfermés dans la membrane plasmique (J. F. Kerr et al., 1994). Ces corps pouvant contenir des organites intacts sont appelés corps apoptotiques et forment des « blebs ». Ils sont ensuite phagocytés par des cellules voisines. Un détachement cellulaire entre cellules voisines et une fragmentation du noyau ont également été observés. De nombreux travaux ont permis de caractériser finement la chronologie des modifications morphologiques observées ainsi que la succession des évènements biochimiques aboutissant à la mort cellulaire.

Lors de l'apoptose, la membrane plasmique de la cellule reste intacte mais est caractérisée par l'extériorisation de la phosphatidylsérine (PS) à sa surface. En effet, la PS subit un mouvement transversal (ou flip flop) dépendant de l'ATP, et est alors extériorisée. Cette extériorisation permet la reconnaissance par les cellules phagocytaires (signal « eat-me ») qui éliminent alors les corps apoptotiques. Ce processus est appelé efferocytose (deCathelineau & Henson, 2003). Le marquage des PS par l'annexine-V permet d'ailleurs de distinguer les cellules vivantes des cellules en apoptose. L'extériorisation de la PS n'est pas un indicateur systématique de la mort cellulaire. En effet, il a été montré que la capacité d'extériorisation des PS induite par apoptose pouvait dépendre des cellules (Fadeel et al., 1999), et que cette extériorisation pouvait également être induite par des morts cellulaires non-apoptotiques telles que la nécroptose (Shlomovitz et al., 2019). De plus, l'extériorisation de la PS a été observée dans l'activation de thrombocytes et de lymphocytes sans conduire à leur mort (Bever et al., 1982; Elliott et al., 2005). D'autres signaux, appelés « find me », favorisent l'élimination des cellules en apoptose en attirant les phagocytes. Certains nucléotides comme l'ATP et l'UTP contribuent au recrutement de monocytes (Elliott et al., 2005) et la fractalkine (ou CX3CL1), une chimiokine ayant la particularité d'être membranaire, sécrétée par des lymphocytes en apoptose, stimule le chimiotactisme des macrophages (Truman et al., 2008).

D'un point de vue biochimique, l'exécution de l'apoptose est réalisée par les membres d'une famille de protéases à cystéine appelés caspases, qui ont la capacité de cliver spécifiquement des protéines au niveau d'un résidu aspartate. Ces protéases, une fois activées, clivent ainsi de nombreuses protéines cytoplasmiques et nucléaires qui contribuent à l'initiation et à la progression de la mort cellulaire (D. K. Miller, 1999). Lors de l'apoptose, on distingue les caspases initiatrices (8, 9 et 10) et les caspases effectrices (3, 6 et 7). Les caspases sont initialement sous formes monomériques « procaspases » et requièrent une dimérisation et souvent un clivage pour être activées (Riedl & Shi, 2004). L'assemblage en dimères est facilité par de nombreuses protéines adaptatrices qui se lient spécifiquement aux prodomaines des procaspases (R. C. Taylor et al., 2008). L'activation des caspases effectrices est permise par les caspases initiatrices qui clivent ces caspases, aboutissant à des caspases dimérisées fonctionnelles (McIlwain et al., 2013).

Les caspases inactivent leurs substrats ou bien les activent par élimination de domaines de régulation. Par exemple, elles peuvent inactiver des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité génomique telles que PARP et la DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) et ainsi empêcher les processus de réparation de l'ADN. De plus, les caspases peuvent activer des endonucléases (Nicholson, 1999). Ces mécanismes contribuent à des changements de l'ADN génomique qui accompagnent le suicide cellulaire. Les caspases peuvent également lyser des composants structurels du cytosquelette ou du noyau aboutissant à des défauts d'assemblage (par exemple la lamine, la fodrine et la gelsoline). D'un point de vue général, les effets cumulatifs des clivages permis par les caspases conduisent à un déséquilibre des processus homéostatiques et de réparation, une perturbation de la progression cellulaire, l'inactivation des inhibiteurs de l'apoptose et des changements d'assemblage structurel (Nicholson, 1999).

L'activation des caspases initiatrices et effectrices dépend de la voie d'entrée apoptotique, qui implique des acteurs différents.

c) Les deux voies de l'apoptose

Deux voies principales d'apoptose sont décrites, se distinguant par la chronologie d'activation des caspases initiatrices et effectrices ainsi que par l'implication de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP), qui aboutit au relargage de cytochrome c (**Figure 9**). Dans la voie intrinsèque, le cytochrome c est relargué de l'espace intermembranaire mitochondrial avant toute activation de caspase alors que dans la voie extrinsèque, des caspases initiatrices sont activées avant même le relargage de cytochrome c, et permettent l'activation rapide des caspases effectrices (Lossi, 2022) (**Figure 9**).

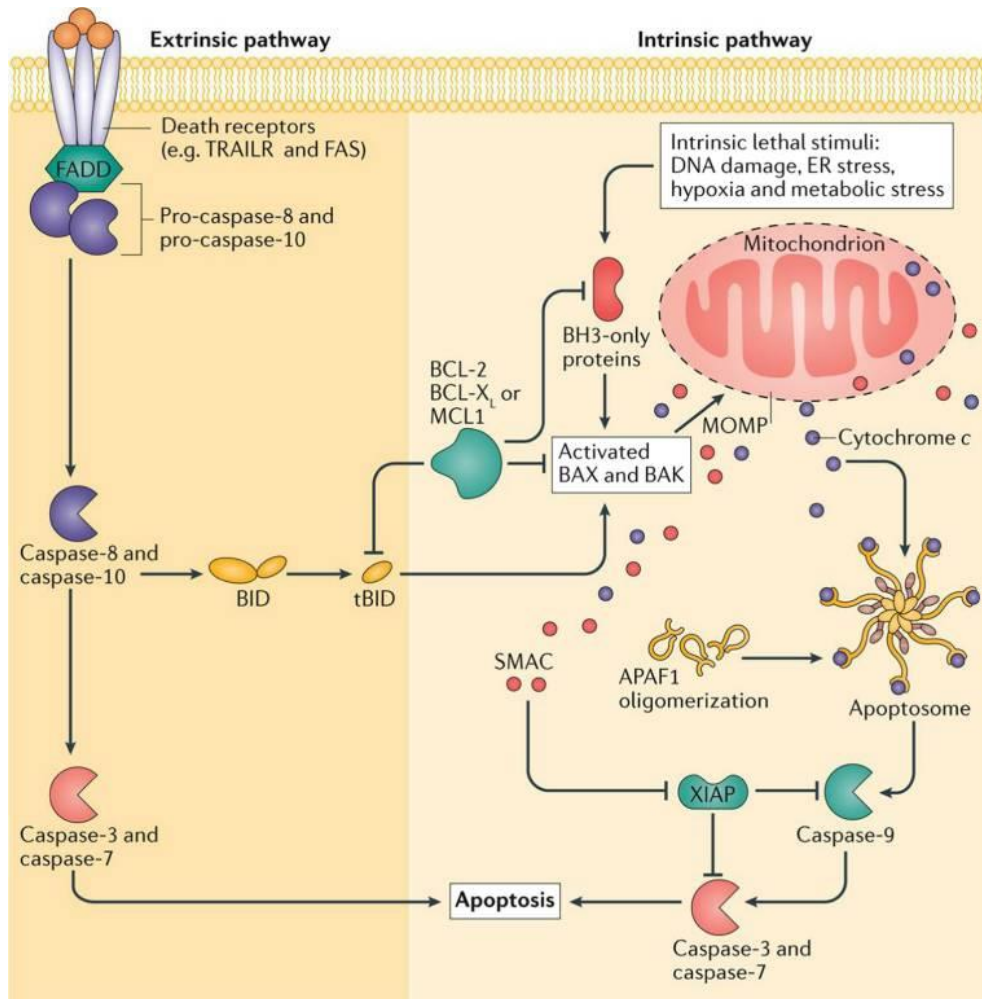


Figure 9 : Les deux voies d'activation de l'apoptose

La voie intrinsèque de l'apoptose (à droite) est déclenchée par des signaux léthaux internes, qui favorisent l'accumulation de protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2 (BH3-only), stimulant l'activation des protéines pro-apoptotiques effectrices BAX et BAK, qui s'oligomérisent et induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP). Ce phénomène entraîne le relargage de cytochrome c dans le cytosol, favorisant la formation de l'apoptosome qui enclenche la voie d'activation des caspases 9, 3 et 7, aboutissant à l'apoptose. La voie extrinsèque de l'apoptose repose également sur l'activation des caspases 3 et 7, cette fois-ci par les caspases 8 et 10, activées par des récepteurs de la membrane plasmique. La voie extrinsèque peut également contribuer à l'activation de la voie intrinsèque via la protéine pro-apoptotique BID, stimulant la MOMP. (Suhaili et al., 2017)

1- La voie intrinsèque de l'apoptose

La voie intrinsèque de l'apoptose est initiée par l'activation de senseurs intracellulaires qui détectent des stimuli variés comme un dommage à l'ADN, un stress oxydatif, de l'hypoxie ou un stress métabolique (Lossi, 2022)... Ces signaux induisent la MOMP. La MOMP dépend des protéines de la famille BCL-2 qui sont classées en 2 catégories : les protéines anti-apoptotiques qui favorisent la survie, les protéines pro-apoptotiques qui favorisent la MOMP et les protéines BH3-only qui activent les protéines pro-apoptotiques (**Figure 9**) (Juin et al., 2013). Les protéines pro-apoptotiques forment des

pores mitochondriaux qui aboutissent à la MOMP, permettant la libération de protéines pro-apoptogènes dans le cytosol, tels que le cytochrome c. Le cytochrome c libéré induit l'oligomérisation de la protéine APAF-1 (apoptotic peptidase activating factor 1), entraînant la formation de l'apoptosome. Cet apoptosome induit le clivage protéolytique et donc l'activation de la pro-caspase initiatrice 9. Une fois activée, cette caspase initie la cascade d'activation des caspases effectrices 3, 7 et 6. D'autres protéines sont relarguées dans le cytosol à la suite de la MOMP. C'est le cas de la protéine SMAC (second mitochondrial activator of caspases) et de la protéine Omi qui empêchent l'activité des protéines inhibitrices des caspases IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) comme XIAP et favorisent ainsi l'activité des caspases et le déroulement de l'apoptose (Pfeffer & Singh, 2018) (**Figure 9**).

2- La voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque de l'apoptose est initiée par des signaux de mort extracellulaires. Ces signaux peuvent provenir d'un contact avec une autre cellule comme les lymphocytes T cytotoxiques ou les natural killers, ou d'un facteur sécrété tels que les TNF (tumor necrosis factors) ou FAS ligands, induisant une activation des récepteurs TNF tels que FAS (également appelé Apo1 et CD95) ou TRAIL (également appelé DR5). L'activation de ces récepteurs entraîne le recrutement de différentes protéines adaptatrices (FADD, TRADD, RIP) et des procaspases initiatrices (caspases 8 et 10). L'ensemble de ces protéines forme alors le complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex). Les caspases recrutées sont alors activées par clivage et peuvent directement à leur tour cliver et activer les procaspases effectrices 3, 7 et 6 ou alors cliver la protéine Bid en tBid (truncated Bid) pour permettre sa translocation au niveau de la mitochondrie et l'activation de la voie intrinsèque (Pfeffer & Singh, 2018) (**Figure 9**).

Le complexe DISC peut être inhibé par c-FLIP (FLICE Associated Death Factor), un homologue de la caspase 8 qui ne présente pas d'activité caspase. Comme la voie intrinsèque, la voie extrinsèque peut également être bloquée par les protéines IAP qui inhibent les caspases effectrices (Pfeffer & Singh, 2018).

Ainsi, les deux voies d'apoptose convergent vers l'activation des caspases effectrices. Ces deux voies ne sont pas indépendantes, et l'activation de la voie extrinsèque peut entraîner l'activation de la voie intrinsèque. Ainsi, l'activation de tBid par la caspase 8 est déterminante dans le couplage entre les voies extrinsèque et intrinsèque et semble cellule-spécifique (Özören & El-Deiry, 2002).

Notons qu'un moyen supplémentaire d'induire l'apoptose a été décrit spécifiquement dans les lymphocytes T cytotoxiques. Ce phénomène implique des perforines qui permettent par oligomérisation la formation de pores à la surface de la cellule (Voskoboinik et al., 2010). Le granzyme

B, une protéase, peut activer Bid en amont de la mitochondrie, ou directement les caspases 3, 7 et 9 (Waterhouse et al., 2006), induisant alors la mort cellulaire par apoptose.

d) Importance de l'apoptose en physio-pathologie

En physiologie, l'apoptose assure l'homéostasie de l'organisme en lui permettant de se débarrasser des cellules endommagées ou inutiles, laissant la place à de nouvelles cellules fonctionnelles (R. Singh et al., 2019).

Des études ont déjà établi que certains processus du développement embryonnaire et fœtal reposent sur l'apoptose (Voss & Strasser, 2020). Par exemple, l'apoptose est impliquée dans le remodelage de l'arc aortique, l'élimination de neurones surnuméraires, la suppression de la cloison vaginale ou encore la suppression des tissus interdigitaux des pieds et des mains. Dans divers organes comme le cerveau, le cœur, le rein ou le foie, les cellules proliférantes sont d'ailleurs davantage sensibles aux stimuli apoptotiques lors du développement périnatal ou postnatal qu'à l'âge adulte. De même, les cellules souches hématopoïétiques sont plus sensibles aux stimuli apoptotiques chez les jeunes animaux que chez les adultes (R. Singh et al., 2019). Certaines études mettant en avant l'importance de l'apoptose dans le développement embryonnaire par invalidation génique de protéines clés n'ont cependant pas pu exclure totalement la présence d'apoptose résiduelle dans leurs modèles (Voss & Strasser, 2020).

Chez l'adulte, les hépatocytes accumulant des toxines entrent en apoptose. Ces mêmes cellules relarguent des cytokines qui favorisent la régénération du foie et la prolifération des hépatocytes (Luedde et al., 2014). De même, les neutrophiles matures ont un pool renouvelé rapidement corrélés à des taux d'apoptose non négligeables qui évitent la mise en place de stratégies de détoxification (R. Singh et al., 2019). Les fonctions reproductrices et de lactation sont également hautement régulées par l'apoptose (R. Singh et al., 2019; Stefanon et al., 2002).

L'apoptose se met donc en place principalement dans des tissus en phases de réparation et/ou de régénération, et permet aux organes de maintenir leur homéostasie. Lorsque des cellules « sensées » mourir par apoptose ne le font pas, elles peuvent s'accumuler et causer des préjudices à l'organisme comme l'apparition de maladies auto-immunes ou la propagation de pathogènes intracellulaires, mais également le développement de tumeurs (R. Singh et al., 2019).

L'apoptose peut également jouer un rôle oncogénique. En effet, lorsqu'une minorité des mitochondries d'une cellule subissent la MOMP (MOMP minoritaire), l'activation limitée des caspases ne suffit pas à induire la mort des cellules mais favorise en revanche l'instabilité génétique de la cellule, favorisant le phénomène de transformation et ainsi la tumorigenèse (G. Ichim et al., 2015). Une cellule

qui subit une MOMP importante n'est pas non plus vouée à mourir. Par exemple, une glycolyse accrue et une élimination des mitochondries par autophagie favorisant l'expansion des mitochondries fonctionnelles restantes permettent aux cellules de survivre à la MOMP lorsque les caspases sont inactives (Colell et al., 2007). L'«anastase» (résurrection en grec) est le nom donné au phénomène de résistance à l'activation des caspases lors de l'apoptose. Il est accompagné entre autres de l'activation rapide de signaux de survie, de régulation du cycle cellulaire ou encore de dommages à l'ADN, et de l'activation plus tardive de voies angiogéniques et migratoires (G. Sun et al., 2017; H. M. Tang et al., 2017). Des phénomènes de résistance à l'activation sub-léthale des caspases ont d'ailleurs été décrits comme jouant un rôle dans le développement et la différenciation cellulaire (Nakajima & Kuranaga, 2017).

Les caspases sont donc les effecteurs majeurs de l'apoptose. Une autre famille de protéines est largement impliquée dans l'apoptose. Ses membres réalisent ou régulent la MOMP. Ils appartiennent à la famille BCL-2 (B Cell Lymphoma 2).

II- La famille BCL-2

a) Les membres de la famille BCL-2

Les protéines de la famille BCL-2 sont les chefs d'orchestres de l'apoptose intrinsèque (ou mitochondriale). Cette famille doit son nom à la découverte de son premier membre BCL-2 (B Cell Lymphoma 2) dans le lymphome B (Tsujiimoto et al., 1984), dont la surexpression a été associée à l'apparition de la maladie et à la survie cellulaire (Vaux et al., 1988).

Ensuite, d'autres protéines ont été découvertes et ajoutées à cette famille car elles possèdent des domaines similaires et sont impliquées dans le destin cellulaire. Ces protéines possèdent ou non certains domaines BH (BCL-2 homology domain), et toutes possèdent le domaine BH3. Elles sont classées suivant leurs rôles et les domaines BH qu'elles présentent (Juin et al., 2013). On distingue les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines effectrices, les protéines anti-apoptotiques à multi-domaines gardiennes, et les protéines pro-apoptotiques à domaine unique (ou BH3-only) activatrices ou sensibilisatrices (**Figure 10**).

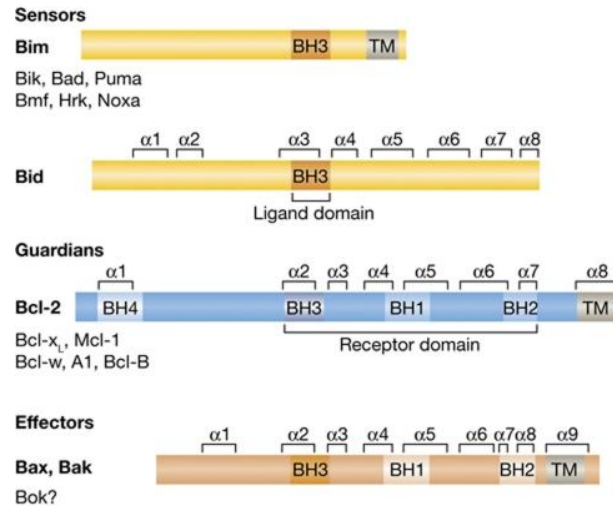


Figure 10 : Structure des membres de la famille BCL-2

Tous les membres de la famille de protéines BCL-2 sont constitués du domaine BH3. Les protéines anti-apoptotiques gardiennes et les protéines pro-apoptotiques effectrices présentent d'autres domaines BH. La plupart des protéines de la famille BCL-2 contiennent une région transmembranaire (TM) C-Terminale hydrophobe, permettant l'ancrage à la membrane externe mitochondriale et/ou au réticulum endoplasmique. (Strasser et al., 2011)

La présence des domaines BH1, BH2 et BH3 dans les protéines à multi-domaines permet un repliement des hélices α des protéines aboutissant à la formation d'un sillon hydrophobe qui est le lieu d'interaction entre les différentes protéines de la famille BCL-2. Le domaine BH3, en plus de son implication dans le sillon hydrophobe, est essentiel à ces interactions (Juin et al., 2013). De petites variations du domaine BH3 et des changements conformationnels de la poche hydrophobe des protéines à multi-domaines expliquent que toutes ces protéines n'ont pas la même affinité pour un partenaire donné (L. Chen et al., 2005).

Les nombreuses interactions entre différents membres de la famille BCL-2 contrôlent la survenue de la MOMP. En effet, elles déterminent la quantité libre de protéines pro-apoptotiques effectrices qui déclenchent la MOMP lorsque la cellule est stressée (Juin et al., 2013).

1- Les protéines pro-apoptotiques effectrices

Les protéines pro-apoptotiques effectrices présentent les domaines BH1, BH2 et BH3 ainsi qu'un domaine transmembranaire permettant leur insertion dans la membrane mitochondriale externe, où elles peuvent s'oligomériser et former des pores qui engendrent la MOMP et la libération dans le cytosol des protéines apoptogènes conduisant par la suite à la mort cellulaire. Les protéines pro-apoptotiques effectrices majeures sont BAX (Bcl-2-Associated X protein) (Oltvai et al., 1993) et BAK (Bcl-2 homologous Antagonist Killer) (Chittenden et al., 1995). BOK (Bcl-2 related ovarian killer) est

une autre protéine pro-apoptotique effectrice (S. Y. Hsu et al., 1997). D'autres ont été décrites telles que BFK ou encore BCL-WAV (Popgeorgiev et al., 2018).

Les protéines BAX et BAK ont des rôles similaires et semblent redondantes puisque la délétion de l'une ou l'autre de ces protéines n'empêche pas la mort cellulaire. En revanche, la délétion simultanée des deux protéines entraîne l'absence d'apoptose dans les cellules (M. C. Wei et al., 2001). Certaines études montrent que la surexpression de BOK induit la mort cellulaire même en absence de BAX et BAK (Einsele-Scholz et al., 2016) alors que d'autres montrent que la protéine BOK ne suffit pas à elle seule à induire la mort apoptotique des cellules soumises à un stimuli pro-apoptotique (Echeverry et al., 2013).

Des cellules saines expriment de façon constitutive ces protéines. BAK est localisée essentiellement au niveau de la mitochondrie, mais également au niveau du réticulum endoplasmique, tandis que BAX est localisée principalement au cytosol (Popgeorgiev et al., 2018) (**Figure 11**). BOK est retrouvée principalement au golgi, mais aussi à la mitochondrie et au réticulum endoplasmique (Echeverry et al., 2013). Dans une cellule saine qui n'est pas destinée à mourir, ces protéines pro-apoptotiques sont inactives. Ceci peut être dû à une conformation spécifique liée au repliement, comme le repliement de l'hélice $\alpha 9$ de BAX qui empêche sa fixation et améliore sa solubilité (Suzuki et al., 2000). L'inactivation des protéines pro-apoptotiques effectrices est essentiellement permise par leur séquestration par les protéines anti-apoptotiques.

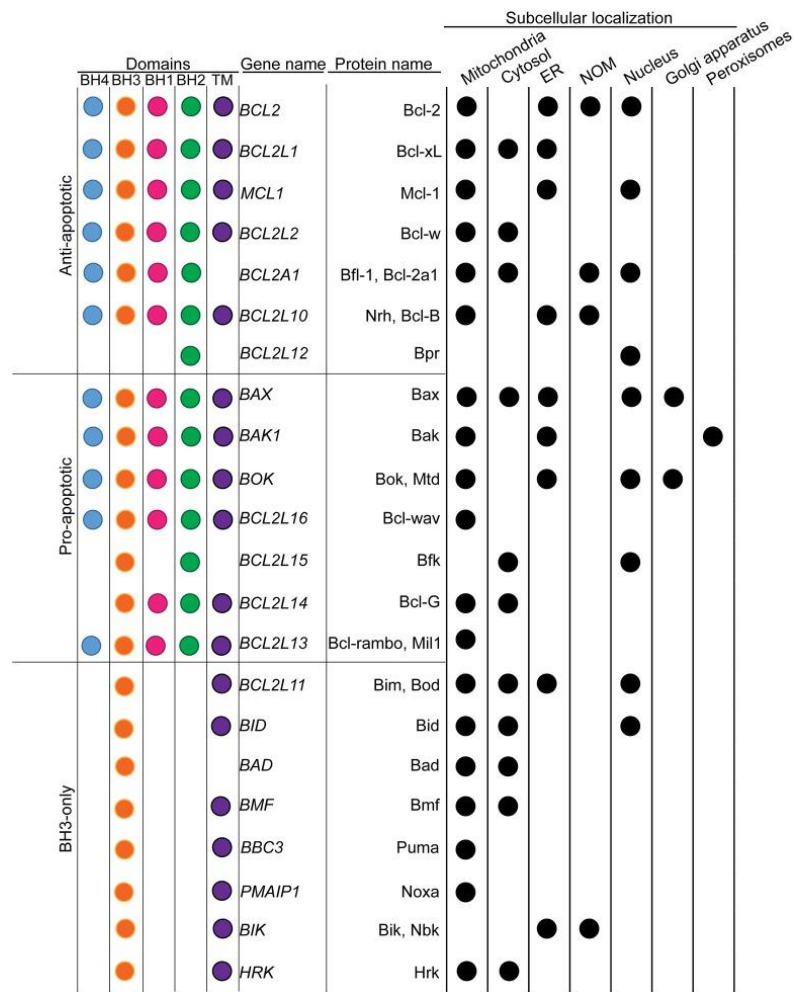


Figure 11 : Localisations subcellulaires des membres de la famille BCL-2

Localisations subcellulaires des protéines de la famille BCL-2. La présence des domaines BH3 conservés et du domaine transmembranaire est indiquée avec des points de couleur. Les points noirs indiquent la présence de la protéine concernée à la localisation subcellulaire correspondante. (Popgeorgiev et al., 2018)

2- Les protéines anti-apoptotiques gardiennes

Ces protéines ont un sillon hydrophobe semblable aux protéines pro-apoptotiques effectrices. En séquestrant et rendant inactives ces protéines pro-apoptotiques, les protéines gardiennes favorisent la survie cellulaire (**Figure 12**). Les protéines anti-apoptotiques sont principalement : BCL-2 (Tsujimoto et al., 1984), MCL-1 (Kozopas et al., 1993), BCL-xL (Sattler et al., 1997), BCL-w (Gibson et al., 1996), BFL-1/BCL-2A1 (S. S. Choi et al., 1995) et BCL-B/DIVA (Ke et al., 2001). Nous nous intéressons ici plus particulièrement aux protéines BCL-2, MCL-1, BCL-xL et BCL-w, qui ont été les plus décrites.

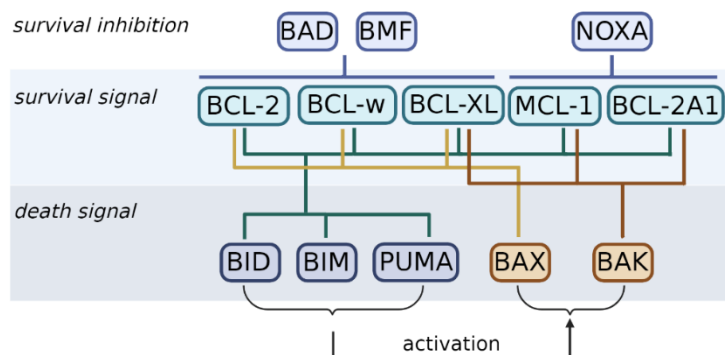


Figure 12 : Interaction entre les différents membres de la famille BCL-2

Les lignes représentent l'existence d'interactions entre les protéines de la famille BCL-2 concernées. Les protéines anti-apoptotiques (milieu) interagissent avec certaines protéines pro-apoptotiques effectrices et sensibilisatrices (en bas), limitant ainsi leur activité pro-apoptotique. Certaines protéines pro-apoptotiques (en haut) limitent l'activité des protéines anti-apoptotiques en occupant la place des autres protéines pro-apoptotiques, qui sont davantage libres pour participer à l'induction de la mort cellulaire. (d'après Juin et al., 2013)

BCL-2 et BCL-xL (Bcl-2 like protein X) présentent des structures très proches. Ces protéines sont exprimées par certains types cellulaires et sont retrouvées notamment dans des lymphocytes B en développement (BCL-xL) ou matures (BCL-2). Ces protéines sont relativement stables avec une demi-vie d'environ 20h (Blagosklonny et al., 1996).

MCL-1 (myeloid cell leukemia 1) est exprimée dans de nombreux tissus et participe au développement et à la survie de nombreux types cellulaires comme les lymphocytes B et T, cardiomyocytes ou neurones (Arbour et al., 2008; Opferman et al., 2003; X. Wang et al., 2013). MCL-1 se distingue des autres protéines anti-apoptotiques par la présence d'une queue N-terminale plus longue contenant une séquence PEST (riche en Proline, acide glutamique, sérine et thréonine), caractéristique des protéines rapidement dégradées (X. Wu et al., 2020). Ce site concentre des zones de clivage, de phosphorylation et d'ubiquitination qui modulent la stabilité et la dégradation de MCL-1 (L. W. Thomas et al., 2010). Par exemple, la phosphorylation T163 par ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase) favorise la stabilisation de MCL-1 (Domina et al., 2004), alors que la phosphorylation S159 par GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) déstabilise la protéine MCL-1 en favorisant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Maurer et al., 2006). L'ubiquitination de MCL-1 permise par la ligase ubiquitine E3 MULE favorise l'envoi de la protéine au protéasome, où elle est dégradée (L. W. Thomas et al., 2010; Zhong et al., 2005). Au contraire, la désubiquitinase USP9X peut limiter l'action de MULE et ainsi favoriser la stabilisation de MCL-1 (Schwickart et al., 2010). De plus, la phosphorylation de MCL-1 sur la sérine 64 par CDK1/2 et JNK (c-Jun N-terminal Kinase) favorise la liaison de MCL-1 avec les

membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2, augmentant ainsi les fonctions anti-apoptotiques de la protéine (S. Kobayashi et al., 2007). MCL-1 peut aussi être clivée par les caspases ou la granzyme B, modulant ses fonctions anti-apoptotiques (Han et al., 2004; Weng et al., 2005). Le domaine BH1 et une partie de la région C-terminale modulent également la stabilité de la protéine MCL-1 (Mei et al., 2005). Ainsi, cette protéine hautement régulée au niveau post-traductionnel présente une demi-vie courte (de l'ordre de 40 minutes) (Nijhawan et al., 2003), ce qui permet à la cellule de répondre de manière dynamique aux stimuli de mort cellulaire.

MCL-1 n'est pas la seule protéine anti-apoptotique qui peut être modulée par phosphorylation. BCL-2 par exemple peut être phosphorylée par ERK1/2, ce qui augmente son activité anti-apoptotique (Deng et al., 2000). De plus, la traduction de BCL-2 peut être diminuée par des miARNs comme miR15 et miR16 (Cimmino et al., 2005) et celle de MCL-1 diminuée par le miR29b (Mott et al., 2007).

Ces protéines sont également régulées transcriptionnellement. En particulier, la transcription de *MCL-1* est modifiée sous l'influence de facteurs extracellulaires comme des facteurs de croissance et cytokines, qui induisent des facteurs de transcription capables de réguler le promoteur de *MCL-1* (L. W. Thomas et al., 2010). Par exemple, STAT3/5 (Signal Transducers and Activators of Transcription), NFκB (Nuclear Factor-Kappa B), HIF1α (Hypoxia Inducible Factor 1α), CREB (cAMP Response Element Binding protein) et ATF5 (Activating Transcription Factor 5) ont été montrés comme régulant positivement la transcription de MCL-1 (Iqbal et al., 2012; X.-H. Liu et al., 2006; Puthier et al., 1999; Ricci et al., 2007; Sheng et al., 2010; J.-M. Wang et al., 2003; Yoshimoto et al., 2009), contrairement à E2F1 qui agit comme répresseur du promoteur de MCL-1 (Croxtton et al., 2002). De plus, l'épissage alternatif de MCL-1 peut conduire à la formation de deux formes plus courtes de la protéine, qui ont alors une action pro-apoptotique en capturant leur homologue anti-apoptotique (Bae et al., 2000; J.-H. Kim et al., 2009).

BCL-2, BCL-xL et MCL-1 sont retrouvées au niveau de la membrane mitochondriale externe où elles séquestrent les protéines pro-apoptotiques effectrices. Ces protéines ont également été détectées dans le réticulum endoplasmique (Krajewski et al., 1993; White et al., 2005; E. Yang et al., 1995) et dans le noyau (Jamil et al., 2005; Schmitt et al., 2007). De plus, BCL-xL peut être retrouvée au cytosol (Jeong et al., 2004). Ces variations de localisations subcellulaires ont été imputées à la composition de la séquence homologue transmembranaire (avec une forte homologie entre les protéines) et séquences avoisinantes, ainsi qu'au domaine BH4 de ces protéines (Popgeorgiev et al., 2018). MCL-1 et BCL-xL ont également été décrites comme pouvant s'ancrer dans la membrane mitochondriale interne (Alavian et al., 2011; Perciavalle et al., 2012), l'ancrage de MCL-1 dans la membrane interne mitochondriale nécessitant le clivage de sa séquence N-Terminale. Les localisations atypiques des

protéines anti-apoptotiques leur confèrent de nouvelles fonctions que nous détaillerons dans le *Chapitre 3- Le métabolisme dans les cancers*.

3- Les protéines pro-apoptotiques BH3-only

Ces protéines sont appelées ainsi parce qu'elles ne possèdent que le domaine BH3 de fixation aux autres protéines.

Ces protéines sont divisées en 2 groupes suivant leur mécanisme d'action de déclenchement de l'apoptose. Les « sensibilisatrices » telles que Bad et Noxa se fixent sur les protéines anti-apoptotiques et neutralisent leur action pro-survie. Les « activatrices » telles que Bid, Bim et Puma présentent en plus la capacité de se fixer sur les protéines pro-apoptotiques effectrices et favorisent alors directement la formation des pores à la membrane mitochondriale externe (Juin et al., 2013) (**Figure 12**). Certaines protéines « BH3-only » comme Puma et Bid peuvent se fixer à l'ensemble des protéines anti-apoptotiques alors que certaines comme Noxa se fixent spécifiquement à certaines protéines anti-apoptotiques. Différents modèles décrivent comment les interactions entre les membres de la famille BCL-2 contrôlent l'apoptose (Czabotar et al., 2014). Dans le « modèle d'activation directe », les protéines BH3-only activatrices activent directement les protéines pro-apoptotiques effectrices par fixation pour induire la mort. Dans le « modèle d'activation indirecte », les protéines BH3-only sensibilisatrices se lient aux protéines anti-apoptotiques afin de libérer les protéines pro-apoptotiques effectrices qui déclenchent l'apoptose. Enfin, un troisième modèle appelé « modèle unifié » combine les deux modèles précédents, dans lequel les protéines BH3-only sensibilisatrices favorisent l'apoptose en libérant à la fois les protéines pro-apoptotiques effectrices et les BH3-only activatrices des protéines anti-apoptotiques.

Ces BH3-only, qualifiées de « senseurs de stress » agissent très rapidement. Elles sont peu exprimées ou actives dans les cellules saines mais vont être exprimées ou activées rapidement en cas de stress pour favoriser le déclenchement de l'apoptose. Par exemple, PUMA et NOXA sont produites après l'activation de facteurs de transcription comme P53 et c-MYC, et BIM, déjà exprimée, est activée par phosphorylation via la voie de signalisation RAS/ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase) (Juin et al., 2013). Au contraire, en présence de facteurs de survie, la phosphorylation de Bad favorise sa forme inactive (Siddiqui et al., 2015). De plus, l'activation de BID nécessite en effet un clivage protéolytique par la caspase 8 (Desagher et al., 2001). Enfin, l'épissage alternatif de BIM régule son activité (L. Liu et al., 2007).

Ces protéines sont retrouvées à la mitochondrie et certaines dans le cytosol comme BIM, BID et BAD ou encore au niveau du noyau comme BIM et BID (Popgeorgiev et al., 2018).

b) La famille BCL-2 dans les cancers

Les cancers sont caractérisés par la prolifération intense et anarchique des cellules malignes qui les composent (Hanahan & Weinberg, 2011). L'échappement au contrôle du cycle cellulaire est permis par l'activation d'oncogènes tels que *c-MYC* et *RAS*, ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur tels que *PTEN* ou *P53*. L'apoptose contrôle le développement des cancers par la mise en place d'une réponse au stress induit par ces modifications dans les cellules permettant la mort cellulaire (Cory & Adams, 2002). Cependant, les cellules malignes développent des capacités d'échappement à l'apoptose qui leur permettent de résister à l'instabilité génétique et autres stress, et favorisent ainsi leur survie. Le blocage de l'apoptose dans ces cellules leur permet également probablement de vivre assez longtemps pour acquérir des mutations oncogéniques qui favorisent la progression tumorale (Campbell & Tait, 2018). L'échappement à l'apoptose est d'ailleurs l'une des 6 caractéristiques du développement des cancers décrites par Hanahan et Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011) (**Figure 13**). Cet échappement est permis notamment par la surexpression des protéines anti-apoptotiques et la diminution des protéines pro-apoptotiques dans les cellules malignes. Ces modifications de niveaux de protéines de la famille BCL-2 modifient la balance entre pro- et anti-apoptotiques en faveur de la tumorigenèse et de la progression tumorale, ainsi que de la résistance aux traitements.

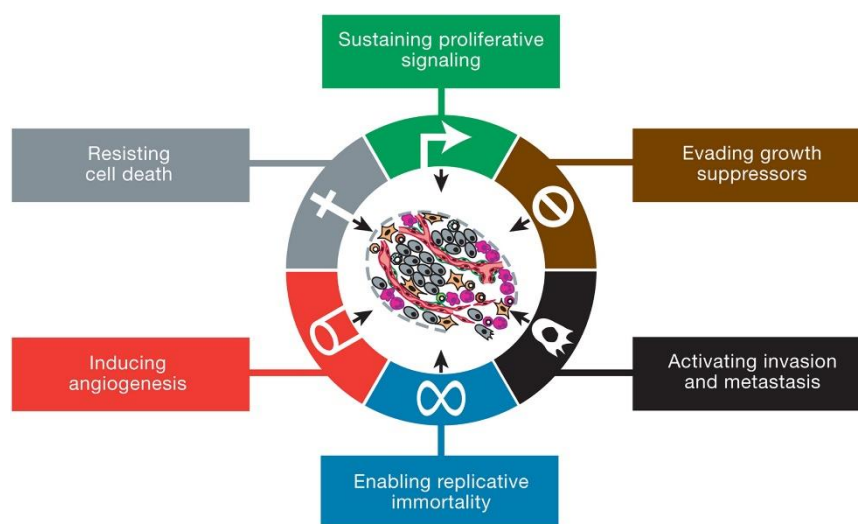


Figure 13 : Principales caractéristiques du développement tumoral

La résistance à la mort cellulaire est une des six altérations essentielles retrouvées lors du développement tumoral. Ces altérations comprennent l'auto-suffisance dans les voies de signalisation, l'échappement aux signaux suppresseurs de croissance, l'invasion et le développement de métastases, un potentiel répliatif illimité, et l'induction de l'angiogenèse. (Hanahan & Weinberg, 2011)

1- Dans les cancers en général

La surexpression des protéines anti-apoptotiques a été observée dans de nombreux cancers. Cette surexpression peut être due à différents mécanismes comme la translocation chromosomique, l'amplification génique, l'augmentation de la transcription ou de la traduction, ou encore la stabilisation de ces protéines.

L'implication de BCL-2 dans la survie cellulaire a été découverte dans des lymphomes non-hodgkiniens lors de l'étude de la translocation chromosomique t(14,18) qui favorise la surexpression de cette protéine (Tsujimoto et al., 1985). L'augmentation des protéines anti-apoptotiques dans les cancers semble davantage induite par augmentation du nombre de copies géniques que par translocation. L'amplification de *MCL1* et de *BCL2L1* (gène codant pour BCL-XL) a en effet été retrouvée parmi les gains chromosomiques les plus fréquents dans une étude comprenant 3000 échantillons représentant 26 types de tumeurs différents (Beroukhi et al., 2010). Une autre étude a confirmé la prévalence de l'amplification de *MCL-1* et de *BCL2L1* dans de nombreuses tumeurs solides (Cerami et al., 2012). L'amplification des autres membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 dans les cancers semble plus rare. L'amplification de *BCL-2* a tout de même été rapportée dans certains cancers comme des lymphomes non-hodgkiniens et cancers du poumon à petites cellules (Ikegaki et al., 1994; Monni et al., 1997) (**Figure 14**).

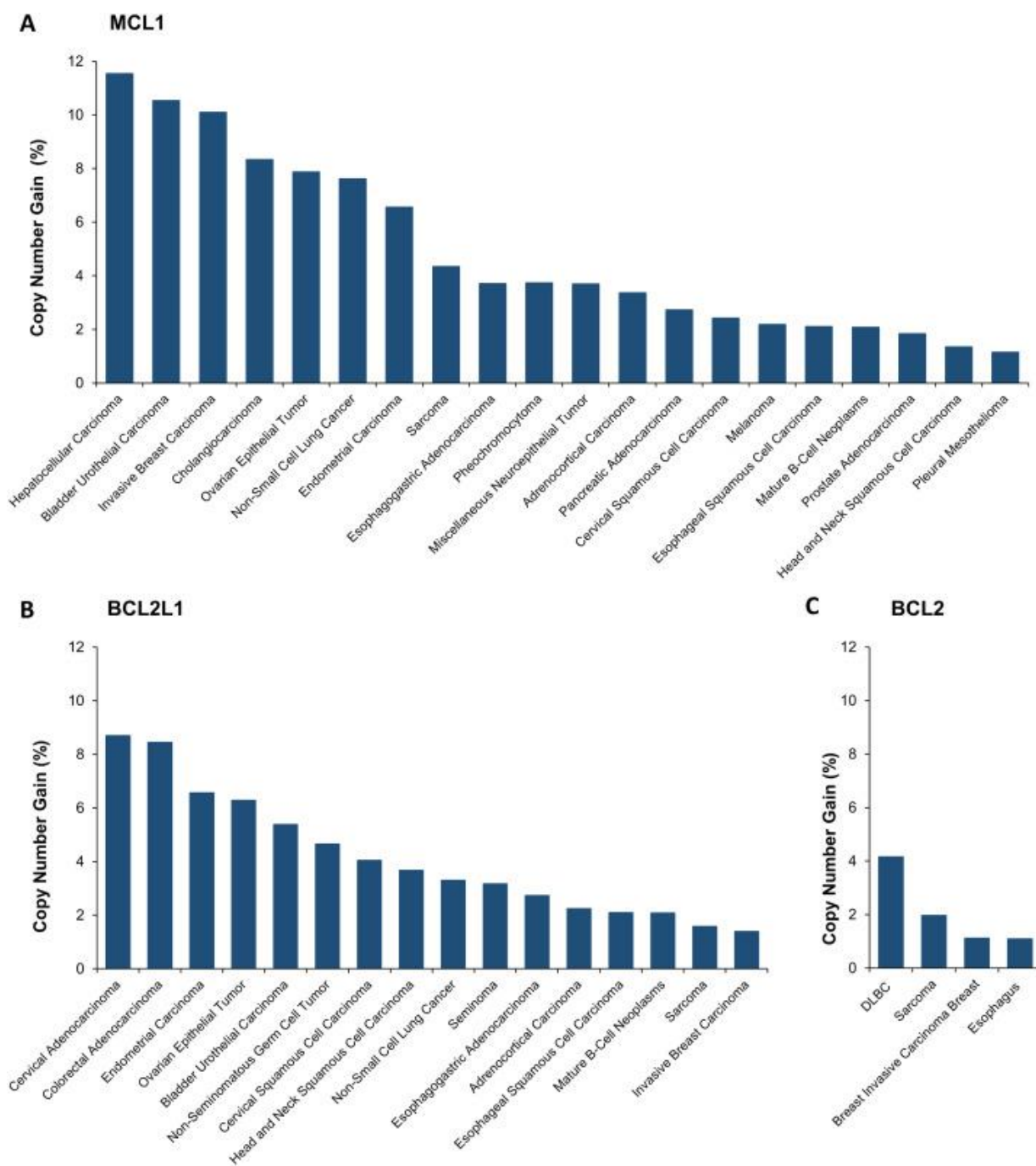


Figure 14 : Taux d'échantillons présentant un gain du nombre de copies de MCL-1, BCL2L1 et BCL-2 dans différents types dans différents cancers

L'analyse du gain du nombre de copie de MCL-1 (A), BCL2L1 codant pour BCL-xL (B) et BCL-2 (C) en fonction des types de cancers a été obtenue à partir de cBioportal (<http://www.cbioportal.org>) et réalisée sur un jeu TCGA Pan-Cancer comprenant 94 études. (Kehr & Vogler, 2021)

La surexpression de protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 est donc une caractéristique des cellules cancéreuses et est corrélée au pronostic des patients. Les exemples de surexpression de ces protéines et corrélation au pronostic sont nombreux : BCL-2 dans le cancer du poumon (Pezzella et al.,

1993), BCL-xL dans les myélomes multiples (Tu et al., 1998) et de la vessie (Kirsh et al., 1998), MCL-1 dans le cancer du col de l'utérus (T. Zhang et al., 2012) et le cancer du poumon (Luo et al., 2012), ou encore BCL-2A1 (BCL2 related protein A1) dans des cancers avancés ou métastatiques (Vogler, 2012).

De plus, des études montrent que les protéines anti-apoptotiques favorisent la résistance aux traitements anti-cancéreux dans différents cancers. Par exemple, la stabilisation de MCL-1 dans les cellules résistantes au paclitaxel permise par la voie PI3K/AKT est montrée comme une cause majeure de résistance à la chimiothérapie dans le cancer gastrique (Shuang 2017). La stabilisation de MCL-1 a également été montrée dans d'autres types de cancers comme étant un facteur de résistance à des chimiothérapies anti-mitotiques, en lien avec l'inactivation de FBW7 (F-box/WD repeat-containing protein 7), une protéine qui permet l'ubiquitination de MCL-1 et sa dégradation (Wertz et al., 2011). De plus, l'inhibition de MCL-1 par interférence par ARN sensibilise les cellules malignes à la gemcitabine dans le cancer du pancréas (Wei 2008).

A l'inverse, des défauts d'expression de protéines pro-apoptotiques ont également été observés dans certains cancers. Par exemple, les deux allèles de BIM sont décrits comme délétés dans certains lymphomes B à cellules du manteau (Tagawa et al., 2005). PUMA et BIM sont également sous-exprimées dans certains lymphomes et cancers du rein respectivement (Garrison et al., 2008; Zantl et al., 2007). Du fait de la redondance entre les protéines BAX et BAK, il semble peu probable que la diminution d'une seule de ces protéines impacte notablement la tumorigenèse, bien que des mutations somatiques inactivatrices de BAX dans des cas spécifiques de cancers du côlon ou lymphomes ont été décrites (Meijerink et al., 1998; Rampino et al., 1997). Différentes études fonctionnelles ont montré dans des modèles murins que la perte de protéines pro-apoptotiques comme BIM, PUMA, BAD et BAX accélère la tumorigenèse (Egle et al., 2004; Eischen et al., 2001; Frenzel et al., 2010; Garrison et al., 2008).

L'expression des protéines de la famille BCL-2 est étroitement régulée par certains oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs. C'est le cas par exemple du suppresseur de tumeur P53 qui induit les transcriptions des pro-apoptotiques PUMA et NOXA et favorise l'activation de BAX (Vaseva & Moll, 2009). P53 limite aussi la transcription de *BCL-2* (Miyashita et al., 1994). L'oncogène RAS favorise également la transcription de *NOXA* (Elgendy et al., 2011) mais diminue la transcription du pro-apoptotique *BIM*. Enfin, l'oncogène *MYC* favorise les transcriptions de *BIM* et *NOXA* (Campane et al., 2011; Elgendy et al., 2011), suggérant la nécessité d'un signal de survie compensatoire qui peut être permis par l'expression de protéines anti-apoptotiques. En effet, la co-amplification de *MYC* et *MCL-1* ou *BCL-xL* a été montrée dans différents cancers (Beroukhim et al., 2010), et la co-amplification de

MYC et *BCL-2* induite dans des modèles murins de lymphomes a été montrée comme favorisant la tumorigenèse (Strasser, 2005).

2- Dans les cancers du sein

Les protéines anti-apoptotiques BCL-2, MCL-1 et BCL-xL ont été retrouvées surexprimées dans les cancers du sein. Des études montrent que BCL-2 est surexprimée dans une fraction importante de cancers luminaux (Eom et al., 2016; Gee et al., 1994). BCL-xL est également retrouvée surexprimée par rapport au tissu adjacent dans une fraction significative des cancers du sein de l'étude d'Olopade et al., sans corrélation avec le type de cancer (Olopade et al., 1997). La protéine MCL-1 a été montrée quant à elle comme surexprimée dans les cancers du sein HER2+ et triple négatifs (Bashari et al., 2016; C. M. Goodwin et al., 2015; Petrocca et al., 2013; M. M. Williams et al., 2017).

La surexpression des protéines anti-apoptotiques est souvent associée à un mauvais pronostic (Q. Ding et al., 2007; Honma et al., 2015; Merino et al., 2016; Musgrove & Sutherland, 2009; Olopade et al., 1997). En particulier, les protéines anti-apoptotiques sont retrouvées surexprimées dans les tumeurs réfractaires aux traitements (Balko et al., 2014; P. A. Ellis et al., 1998). L'ensemble de ces études indiquent que BCL-2, MCL-1 ou BCL-xL sont des facteurs de résistance majeurs à l'efficacité des traitements dans les cancers du sein.

3- Interactions entre l'UPR et les protéines de la famille BCL-2 dans les cancers

L'UPR (unfolded protein response) est déclenchée par le stress du réticulum endoplasmique (RE) induit par l'accumulation dans le RE de protéines mal repliées. L'UPR implique 3 senseurs du stress du RE: PERK (PKR-related Endoplasmic Reticulum Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1) (Madden et al., 2019) (**Figure 15**). Lors du stress du RE, GRP78 (glucose-regulated protein 78) se dissocie de ces senseurs, permettant leur activation qui induit diverses voies de signalisation adaptatives pour surmonter le stress cellulaire. En particulier, certaines voies permettent la transcription de protéines chaperonnes du RE qui facilitent le repliement des protéines ou permettent l'élimination des protéines mal repliées (Madden et al., 2019). De plus, lors d'un stress du RE amenant un stress oxydatif, l'expression de NRF2 (Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2) induite par ATF4 (activé via PERK) protège les cellules de la mort cellulaire en engageant une réponse antioxydante (Sarcinelli et al., 2020). Cependant, lorsque le stress du RE n'est pas contenu et persiste, la réponse adaptative se transforme en réponse inductrice de mort cellulaire, suggérant que le stress du RE induit l'apoptose à partir d'un certain seuil (Logue et al., 2013; Szegezdi et al., 2006; Tagoug et al., 2013).

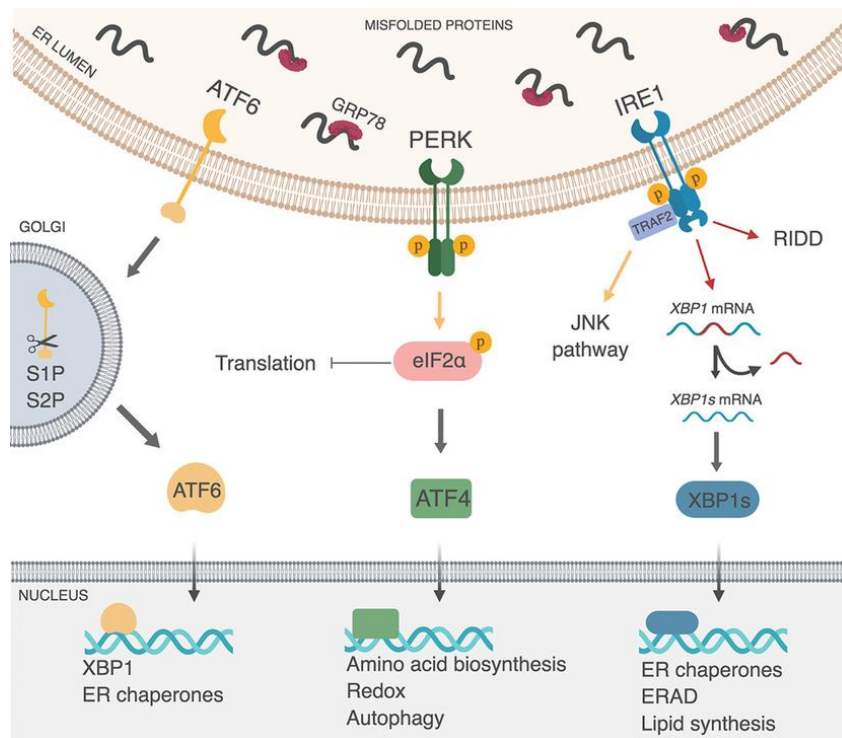


Figure 15 : Représentation schématique de l'UPR

Des protéines présentant des défauts de repliement s'accumulent dans le réticulum endoplasmique (RE) générant un « stress du RE ». Afin de restaurer l'homéostasie du RE, GRP78 se dissocie des senseurs ATF6, PERK et IRE1. ATF6 est alors relocalisé au Golgi, où il est clivé et activé. PERK et IRE1 sont eux activés par dimérisation et autophosphorylation. PERK phosphoryle EIF2α, qui éteint la traduction cap-dépendante, permettant l'expression sélective d'ATF4. IRE1 génère la forme épissée de XBP1 (XBP1s) qui est alors un facteur de transcription actif, et induit également la cassure d'ARNs via le processus nommé RIDD (regulated IRE1 dependent decay). De plus, IRE1 se lie à TRAF2 pour initier la voie de signalisation JNK. Ensemble, les voies de l'UPR se coordonnent pour rétablir le repliement des protéines, réduire la quantité totale de protéines en limitant la traduction, et éliminer les protéines mal repliées via ERAD (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation). (Madden et al., 2019)

Dans les cancers, l'UPR est impliquée dans les phénomènes de résistance aux chimiothérapies. Par exemple, il a été montré que la perte ou la diminution d'expression de GRP78 (Glucose-Regulated Protein 78), ATF6, ATF4 ou XBP1s permet de sensibiliser des cellules résistantes aux chimiothérapies (D. Chen et al., 2017; J. K. Kim et al., 2016; J. Wang et al., 2009). De plus, des cellules malignes de côlon résistantes à une combinaison inducteur de stress du RE/chimiothérapie montrent une activation de la voie PERK/NRF2, associée à une augmentation de la fixation de NRF2 sur le promoteur du gène codant pour la protéine de multirésistance aux drogues ABCC1, suggérant que l'UPR pourrait également limiter la réponse aux chimiothérapies en favorisant l'efflux des molécules thérapeutiques (Salaroglio et al., 2017).

ATF4 est un facteur de transcription induit par le stress qui est souvent retrouvé augmenté dans les cellules malignes. Il peut favoriser la survie cellulaire via des mécanismes adaptatifs ou au contraire

conduire à la mort cellulaire via l'induction de signaux pro-apoptotiques (Wortel et al., 2017) (**Figure 16**). Par exemple, les dimères formés avec C/EBP β ou C/EBP γ induisent des signaux d'adaptation alors que les dimères formés avec CHOP (C/EBP Homologous Protein) induisent la transcription d'éléments pro-apoptotiques (Han et al., 2013; Matsumoto et al., 2013; Teske et al., 2013). La protéine CHOP favorise la transcription de *BIM* (Puthalakath et al., 2007) et l'activation de la caspase 8 dans des lignées de CSTN, induisant ainsi la voie extrinsèque de l'apoptose (Cano-González et al., 2018). A l'inverse, CHOP peut diminuer la transcription de *BCL-2* (McCullough et al., 2001). Il a également été montré, lorsqu'une transformation oncogénique induit le stress du RE, que la réponse adaptative médiée par P58 (une protéine chaperonne induite par IRE1 α) peut favoriser la survie des cellules en atténuant justement la voie PERK/CHOP (Huber et al., 2013). De plus, la voie de signalisation JNK, qui est induite par l'UPR via IRE1 α , régule positivement l'activité de protéines pro-apoptotiques comme BIM (Lei & Davis, 2003), et négativement celle des anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-xL (Davis, 2000). Enfin, la branche IRE1 α /XBP1 médie l'augmentation du niveau de MCL-1 lors d'un stress du RE induit par la tunicamycine dans des lignées de mélanome, via l'induction du facteur de transcription ETS-1 (Dong et al., 2011).

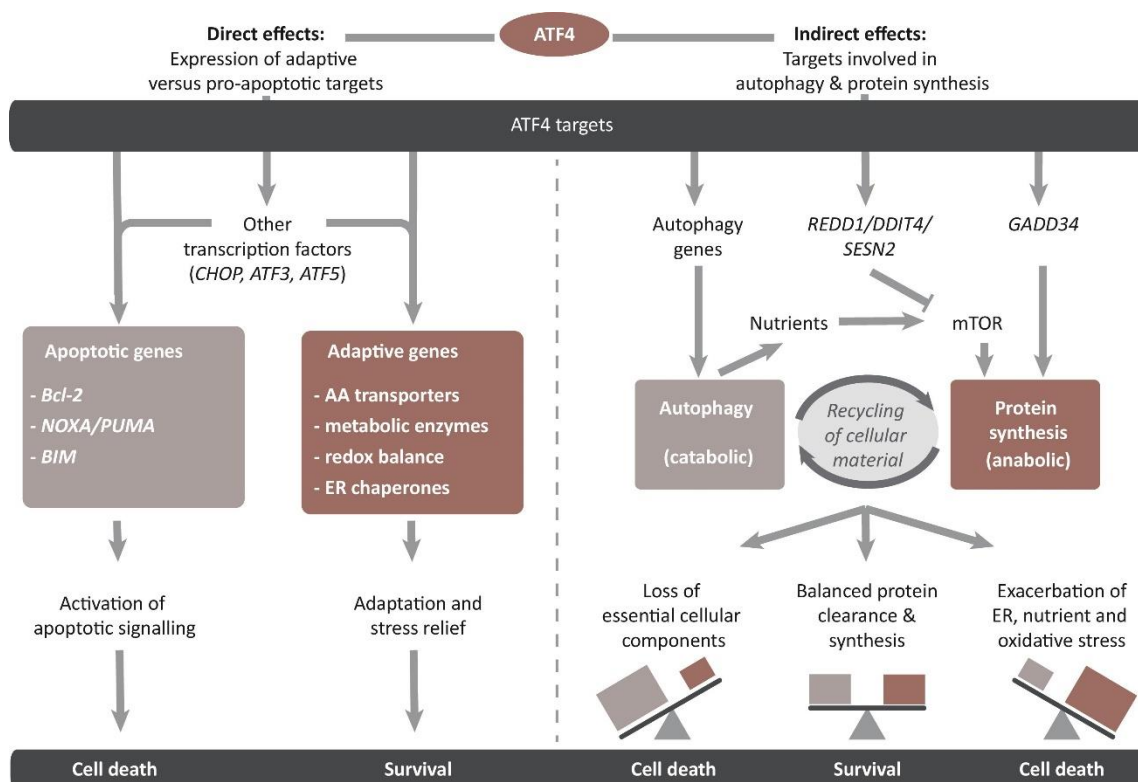


Figure 16 : Le devenir cellulaire sous le contrôle d'ATF4

Le facteur de transcription ATF4 peut induire l'expression de gènes apoptotiques (codant pour des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2) mais également de gènes qui permettent à la cellule de s'adapter au stress subi (codant pour des transporteurs et enzymes métaboliques, des protéines de l'équilibre redox et des protéines chaperonnes). Ces modulations de gènes peuvent être directes ou indirectes via l'induction d'autres facteurs de transcription comme CHOP ou ATF3. De plus, ATF4

présente des effets indirects sur l'autophagie et la synthèse protéique. Les protéines de l'autophagie induites par ATF4 permettent le réapprovisionnement en nutriments en faveur de l'activité de mTOR qui favorise la synthèse protéique. Au contraire, la synthèse protéique peut être limitée via l'inhibition de mTOR par REDD1 ou SESN2. De plus, l'expression d'ATF4 entraîne l'expression de GADD34, qui favorise la reprise de la synthèse protéique. Finalement, l'équilibre induit par ATF4 sur l'autophagie et la synthèse protéique détermine le devenir cellulaire. (Wortel et al., 2017)

De plus, de nombreuses protéines pro- et anti-apoptotiques sont retrouvées au RE. Elles peuvent ainsi moduler la teneur en calcium Ca²⁺ dans le RE (Pinton & Rizzuto, 2006) et peuvent participer à l'UPR. Par exemple, BAX, BAK, PUMA, BIM mais également l'anti-apoptotique BCL-2 peuvent favoriser l'activité de IRE1 α et ainsi l'activité de XBP1 (Chonghaile et al., 2015; Hetz et al., 2006; Rodriguez et al., 2012). En particulier, PUMA et BIM interagissent directement avec IRE1 α pour moduler son activité (Rodriguez et al., 2012).

Ainsi, l'UPR favorise la survie des cellules face à de nombreux stimuli de stress, mais favorise l'apoptose, notamment en régulant les protéines de la famille BCL-2, au-delà d'un certain niveau de stress.

III- Les BH3-mimétiques

a) Présentation des BH3-mimétiques

L'identification des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 comme des acteurs majeurs de la progression tumorale a conduit au développement de nouvelles stratégies pour cibler et inhiber ces protéines. Les BH3-mimétiques ont ainsi été développés. Leur nom provient de la ressemblance fonctionnelle de ces protéines avec les protéines pro-apoptotiques BH3-only. En effet, ces petites molécules se lient à la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques empêchant l'interaction avec le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques, qui sont alors déplacées vers d'autres anti apoptotiques ou activent BAX et BAK pour induire la MOMP (Delbridge & Strasser, 2015). Les BH3-mimétiques présentent plus ou moins d'affinité pour certaines protéines anti-apoptotiques (**Figure 17**).

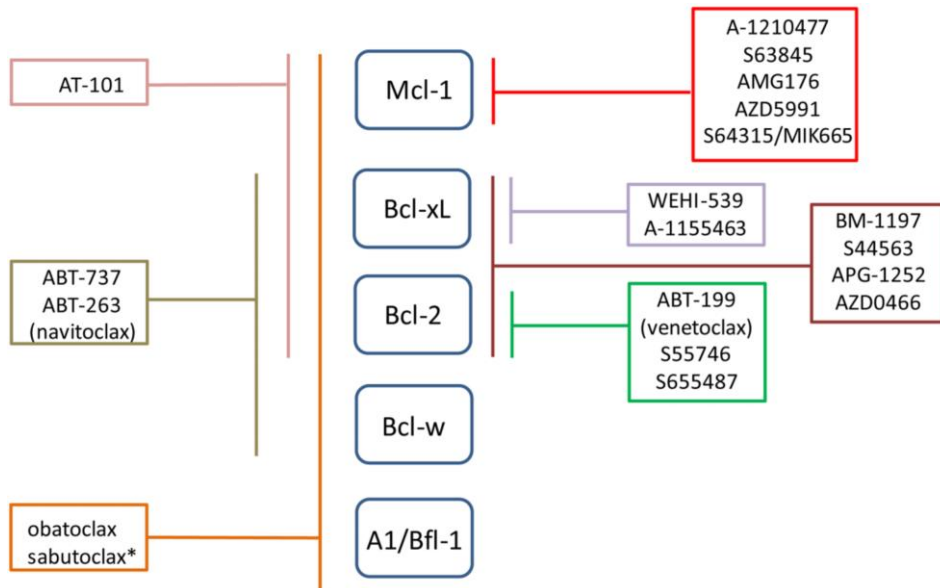


Figure 17 : Ciblage des protéines anti-apoptotiques par les BH3-mimétiques

Les traits représentent l'activité antagoniste des BH3-mimétiques sur une ou plusieurs des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 comme indiqué. (D'Aguanno & Del Bufalo, 2020)

La capacité des BH3-mimétiques à induire l'apoptose dépend de l'équilibre entre les protéines de la famille BCL-2 dans la cellule, en particulier des interactions entre pro- et anti-apoptotiques. Ainsi, le « BH3-profiling », qui utilise des peptides synthétiques dérivés du domaine BH3 de protéines pro-apoptotiques, mesure l'état des complexes pro-/anti-apoptotiques et est donc un outil intéressant permettant de prédire l'efficacité des BH3-mimétiques dans les cellules (Certo et al., 2006; Foight et al., 2014).

Les cellules cancéreuses présentent davantage de complexes pro-/anti-apoptotiques que des cellules saines. De façon générale, plus une cellule présente de complexes entre la protéine anti-apoptotique ciblée et des pro-apoptotiques, plus le BH3-mimétique a de chances d'induire la mort des cellules (on dit que les cellules sont « prêtes à mourir ») (A. G. Letai, 2008). Ainsi, les BH3-mimétiques constituent une stratégie intéressante dans l'optique de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. Nous présenterons certaines de ces molécules en fonction de leurs cibles afin de comprendre leur utilité et les limites de leur utilisation.

b) Le ciblage de BCL-2 et BCL-xL

L'ABT-737 (Oltersdorf et al., 2005) a été le premier BH3-mimétique spécifique et efficace développé. Il se lie à BCL-2, BCL-xL et BCL-w, mais présente une très faible affinité pour MCL-1 et BCL-2A1. L'ABT-263 ou Navitoclax® (Tse et al., 2008), un analogue de l'ABT-737, présente une forme orale

biodisponible en clinique. Ces deux drogues, en agents seuls, induisent *in vitro* l'activation des protéines pro-apoptotiques effectrices dans différents types cellulaires et induisent *in vivo* ou chez les patients la diminution du volume tumoral (Oltersdorf et al., 2005; Roberts et al., 2012; Tse et al., 2008).

L'ABT-737 et l'ABT-263 sont particulièrement efficaces lorsqu'ils sont combinés à d'autres agents thérapeutiques. En effet, certaines résistances aux agents thérapeutiques utilisés sont dues à des augmentations d'expression ou d'activité des protéines BCL-xL ou BCL-2. Ainsi, la combinaison de l'ABT-737 avec le cisplatine a permis de contrer les effets de résistance *in vitro* et diminuer le volume tumoral *in vivo* dans un modèle de cancer du poumon non à petites cellules (E. Y. Kim et al., 2017). La combinaison avec l'étoposide a eu les mêmes effets dans un modèle de cancer du poumon à petites cellules, via la libération de BIM (Hann et al., 2008). De même, dans le cancer du côlon, des cellules KRAS mutées, qui surexpriment BCL-xL, sont bien plus sensibles à des inhibiteurs de MEK en présence de l'ABT-263 *in vivo* (Corcoran et al., 2013). La combinaison de l'ABT-737 avec le docétaxel favorise également la diminution du volume tumoral de tumeurs mammaires dépendantes de BCL-xL *in vivo* (Oakes et al., 2012).

Différentes phases cliniques ont été mises en place avec l'ABT-263 en agent seul ou en combinaison avec d'autres traitements. Dans les cancers circulants tels que les leucémies, l'ABT-263 améliore l'efficacité du fludarabine en cas de résistance (Roberts et al., 2012). Dans les tumeurs solides, comme le cancer du poumon, l'ABT-263 a montré une bonne absorption et a également permis d'augmenter l'efficacité d'agents anti-cancéreux (Gandhi et al., 2011; Rudin et al., 2012). Malheureusement, l'utilisation clinique de ce BH3-mimétique a été interrompue des suites d'un effet majeur retrouvé chez de nombreux patients : la thrombopénie. En effet, les plaquettes sont dépendantes de BCL-xL pour leur survie, et le ciblage de la protéine par l'ABT-263 induit une thrombopénie importante chez les patients (Mason et al., 2007). Cet effet indésirable est d'autant plus problématique qu'il apparaît à des doses d'ABT-263 pour lesquelles l'effet synergique avec d'autres drogues n'est pas si élevé d'après l'étude de Vlahovic et al. (Vlahovic et al., 2014). La plupart des études cliniques utilisant l'ABT-263 se sont donc arrêtées à cause de cet effet secondaire. Un autre inhibiteur ciblant exclusivement BCL-xL, appelé A-1331852, a également été étudié et présente une activité efficace *in vivo* en combinaison avec d'autres traitements (Leverson et al., 2015; L. Wang et al., 2020). Un antagoniste de BCL-xL et BCL-2, l'AZD4320, présentant une forte affinité pour ses cibles, a également été plus récemment développé et semble présenter moins de toxicité plaquettaire aux doses efficaces pour éliminer la tumeur que l'ABT-263 dans un modèle *in vivo* de leucémie myéloïde aiguë (Balachander et al., 2020).

Afin d'éviter les thrombopénies induites par le ciblage de BCL-xL par l'ABT-263, une nouvelle molécule appelée ABT-199 (Venetoclax[®]) a été développée. Elle ressemble à l'ABT-737/ABT-263 mais présente

une forte affinité seulement pour BCL-2 (Souers et al., 2013). La molécule semble tout aussi efficace dans des modèles dépendants de BCL-2 comme les leucémies lymphoïdes (Souers et al., 2013; Vandenberg & Cory, 2013). L'ABT-199 est ainsi testée en phase clinique essentiellement dans les cancers hématopoïétiques, connus pour leur dépendance à BCL-2. Il a montré des résultats très encourageants en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques dans le lymphome du manteau ou le myélome multiple (Rajan & Kumar, 2016; Tam et al., 2018), et a même reçu l'autorisation de mise sur le marché par la FDA (Food and Drug Administration) dans le traitement de leucémies lymphoïdes chroniques avec des anomalies chromosomiques (Roberts et al., 2017) ou encore de leucémies myéloïdes aiguës en combinaison avec d'autres traitements (DiNardo et al., 2019; A. H. Wei et al., 2019). L'ABT-199 a été moins développé dans les tumeurs solides, qui en général présentent davantage de dépendance aux protéines BCL-xL et MCL-1 que BCL-2. Cependant, dans les cancers du sein hormono-dépendants, BCL-2 est souvent surexprimée et est la cause de résistance à certaines hormonothérapies comme le tamoxifène (Musgrove & Sutherland, 2009). La combinaison avec l'ABT-199 augmente considérablement l'efficacité du tamoxifène dans un modèle *in vivo* de cancer mammaire luminal de xénotransgreffe dérivée de patientes (Vaillant et al., 2013). L'ABT-199 en combinaison avec du tamoxifène chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique ER positif améliore également l'efficacité thérapeutique, avec une tolérance jugée acceptable (Lok et al., 2019). Ainsi, les protéines BCL-2, BCL-xL et BCL-w sont impliquées dans des phénomènes de résistance aux traitements, et ABT-737/ABT-263 et ABT-199 permettent de contrer ces résistances. Cependant, notre équipe a montré que la surexpression de BCL-xL pouvait induire une augmentation de l'affinité de BCL-xL pour BIM et PUMA conduisant à des complexes qui ne peuvent plus être rompus par l'ABT-737 (Pécot et al., 2016). De plus, dans des lignées leucémiques, la phosphorylation de BCL-2 stabilise sa fonction anti-apoptotique et empêche l'ABT-737 de s'y fixer (Konopleva et al., 2006).

c) Le ciblage de MCL-1

Comme vu précédemment, MCL-1 est un facteur majeur de résistance dans de nombreux cancers (Beroukhim et al., 2010). Ainsi, des inhibiteurs spécifiques de MCL-1 tels que l'A1210477 (Y. Xiao et al., 2015) et le S63845 (Kotschy et al., 2016) ont été développés.

Dans des lignées de cancer du sein, l'A-1210477 est bien spécifique de MCL-1 et son efficacité nécessite la co-expression de la protéine pro-apoptotique BAK (Y. Xiao et al., 2015). La molécule S63845, plus récente, est 10 à 100 fois plus affine pour MCL-1 que l'A-1210477 et induit bien une mort BAX/BAK dépendante (A. Letai, 2016). Le S63845 induit une mort importante de différentes cellules malignes hématopoïétiques en agent seul ou en combinaison avec d'autres molécules (Kotschy et al., 2016). Des molécules proches du S63845 comme le S64315, l'AMG-397 ou l'AZD5991 présentent de meilleures

propriétés pharmacologiques et sont étudiées en clinique en agents seuls ou en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques dans des cancers hématopoïétiques (Bolomsky et al., 2020). Cependant, un frein majeur à l'utilisation clinique de ces molécules est la toxicité de l'inhibition de MCL-1 sur certaines cellules comme les cardiomyocytes (Rasmussen et al., 2020). Cette toxicité est liée à l'interruption de la proximité entre MCL-1 et DRP1, un acteur clé de la fission mitochondriale. Cette interruption résulte en une fragmentation mitochondriale accrue dans les cardiomyocytes et à leur dysfonctionnement. L'inhibition de MCL-1 dans ces cardiomyocytes entraîne également la désorganisation du réseau d'actine à l'origine de défauts de contraction de ces derniers. L'impact délétère de l'inhibition de MCL-1 sur les cardiomyocytes a également été montré dans des modèles murins *in vivo*, dans lesquels la déplétion génétique de MCL-1 entraîne des défauts importants de structure et respiration mitochondriales de ces cellules (R. L. Thomas et al., 2013; X. Wang et al., 2013).

Le S63845 contre les résistances à certains traitements thérapeutiques. Par exemple, il améliore l'efficacité d'inhibiteurs de tyrosine kinases tel que l'imatinib (compétiteur de la tyrosine kinase constitutive de la protéine chimérique BCR-ABL) dans des leucémies myéloïdes chroniques *in vitro* et dans un modèle de poisson zèbre (Malyukova et al., 2021). De même, le S63845 agit en synergie avec le docétaxel (chimiothérapie appartenant à la classe des taxanes) ou le trastuzumab (anticorps monoclonal du récepteur HER2) dans des modèles murins mammaires de xénogreffes dérivées de patientes (Merino et al., 2017). Dans ces études, la combinaison des thérapies est tolérable pour les organismes.

d) Vers une utilisation clinique des BH3-mimétiques ?

Le réseau de la famille BCL-2 est très dynamique et des compensations s'effectuent rapidement entre les différents membres afin d'assurer la survie des cellules (Juin et al., 2013). Dans des modèles de lignées cancéreuses (poumons, leucémies, lymphomes...), MCL-1, mais également parfois BCL-2A1 et BCL-B, présentent des niveaux protéiques plus élevés des suites du traitement à l'ABT-737 (X. Lin et al., 2007; Mazumder et al., 2012; Rooswinkel et al., 2012; Yecies et al., 2010), participant à la résistance au BH3-mimétique. En particulier, dans le myélome multiple et dans le cancer du poumon à petites cellules, la combinaison de l'A-1210477 et de l'ABT-263 induit la mort drastique des cellules malignes (Leverson et al., 2015). De plus, dans certaines leucémies, la stabilisation de MCL-1 sous ABT-199 participe à la résistance au BH3-mimétique (Bojarczuk et al., 2016) et le S63845 agit alors en synergie avec l'ABT-199 (Z. Li et al., 2018). De même, la combinaison du S63845 et de l'ABT-263 améliore nettement la mort de cellules de certains mélanomes *in vitro* et *in vivo* par rapport aux traitements seuls (Mukherjee et al., 2020). Les BH3-mimétiques agissent ainsi en synergie pour induire la mort des

cellules malignes et la combinaison de ces drogues pourrait permettre de réduire les doses nécessaires et ainsi limiter la toxicité propre à chaque molécule chez les patients. De même, les synergies observées avec d'autres molécules thérapeutiques déjà utilisées en clinique pourrait permettre l'amélioration des traitements tout en réduisant les doses nécessaires.

Ainsi, bien que leur utilisation chez les patients soit limitée par la dynamique du réseau des protéines de la famille BCL-2 et par certains effets délétères sur des cellules saines essentielles à l'organisme, les BH3-mimétiques restent une option intéressante dans les traitements anti-cancéreux. Le Venetoclax est le seul BH3-mimétique utilisé en clinique pour le traitement de certaines leucémies. Des travaux d'optimisation de molécules ciblant notamment MCL-1 sont en cours afin de rendre la molécule plus tolérable et plus affine pour sa cible. Afin de cibler les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2, des études portent désormais sur des molécules favorisant la protéolyse des protéines anti-apoptotiques par adressage à la ligase E3 VHL (Von Hippel Lindau). Par exemple, la molécule protac (proteolysis-targeting chimera) DT2216 ciblant BCL-xL est particulièrement intéressante puisque les plaquettes expriment très peu la ligase E3 VHL et sont donc peu sensibles à l'inhibiteur (Khan et al., 2019). Des études approfondies de ces drogues sont nécessaires.

Indépendamment de leur utilisation clinique, les BH3-mimétiques restent des outils très intéressants pour comprendre les mécanismes de résistance à l'apoptose dans des modèles cellulaires. En effet, par leur capacité à induire la mort cellulaire spécifiquement par apoptose mitochondriale, ils donnent un cadre d'étude précis pour étudier cette mort cellulaire programmée. De plus, ils permettent l'étude approfondie du réseau dynamique complexe des protéines de la famille BCL-2, qui est un frein majeur à l'efficacité des traitements chez les patients.

Chapitre 3- Le métabolisme dans les cancers

I- Caractéristiques du métabolisme dans les cancers

a) Effet Warburg et métabolisme mitochondrial dans les cancers

L'étude du métabolisme dans les cancers a pris un tournant lorsqu'Otto Warburg a découvert que des tranches de tumeurs produisaient du lactate à partir de glucose même en présence d'oxygène (Warburg, 1956). Ce phénomène de glycolyse aérobie quelle que soit la teneur en oxygène est appelé « effet Warburg », et est retrouvé dans différents types de cancer (Koppenol et al., 2011). Les intermédiaires de la glycolyse alimentent alors les voies métaboliques secondaires comme la voie des pentoses-phosphate ou la voie des sérines pour assurer les besoins métaboliques en nucléotides, lipides et acides aminés des cellules proliférantes (Ghergurovich et al., 2021; Heiden & DeBerardinis, 2017; Lunt & Vander Heiden, 2011) (**Figure 18**). Il a été montré que la glycolyse aérobie, par la production de lactate et l'acidification associée du milieu, peut favoriser un microenvironnement protumoral (Liberti & Locasale, 2016). La glycolyse aérobie et l'augmentation de la consommation associée de glucose par les cellules malignes ont permis le développement de la technologie PET (positron emission tomography)-scan qui utilise un analogue du glucose comme traceur radioactif afin de visualiser l'étendue de la maladie et la localisation de nœuds lymphatiques (Antoch et al., 2004; Y. Yuan et al., 2012). Cependant, certaines tumeurs n'absorbent pas de glucose, ce qui suggère une certaine hétérogénéité métabolique tumorale.

Depuis les travaux de Warburg, de nombreuses études ont montré que la majorité des cellules cancéreuses ont également la capacité de produire de l'énergie via le métabolisme mitochondrial (Guppy et al., 2002; LeBleu et al., 2014; A. S. Tan et al., 2015; A. Viale et al., 2014). Le métabolisme mitochondrial a d'ailleurs été montré comme nécessaire à la prolifération cellulaire et à la tumorigenèse (Joshi et al., 2015; Martínez-Reyes et al., 2016; Weinberg et al., 2010). Ainsi, même lorsque l'activité glycolytique est élevée, les cellules malignes génèrent la majorité de leur ATP via la respiration mitochondriale. Le processus exploitant la réduction de l'oxygène pour générer de l'énergie sous forme d'ATP est appelé phosphorylation oxydative (OXPHOS), et repose sur le potentiel énergétique fourni par le cycle de Krebs, dont les intermédiaires métaboliques sont des précurseurs de biosynthèses d'acides aminés, nucléotides et lipides (Ahn & Metallo, 2015) (**Figure 18**). Le maintien du pool de ces intermédiaires du cycle de Krebs est donc nécessaire pour leur utilisation dans les voies de biosynthèses, et est permise par des voies anaplérotiques qui génèrent des intermédiaires autres que l'acétyl-CoA issu du pyruvate (Owen et al., 2002). Parmi ces voies, la glutaminolyse, qui produit de

l'α-cétoglutarate à partir de glutamine, et la carboxylation oxydative, qui produit de l'oxaloacétate à partir de pyruvate sont actives dans différents cancers et participent à la progression tumorale (Kiesel et al., 2021; L. Yang et al., 2017).

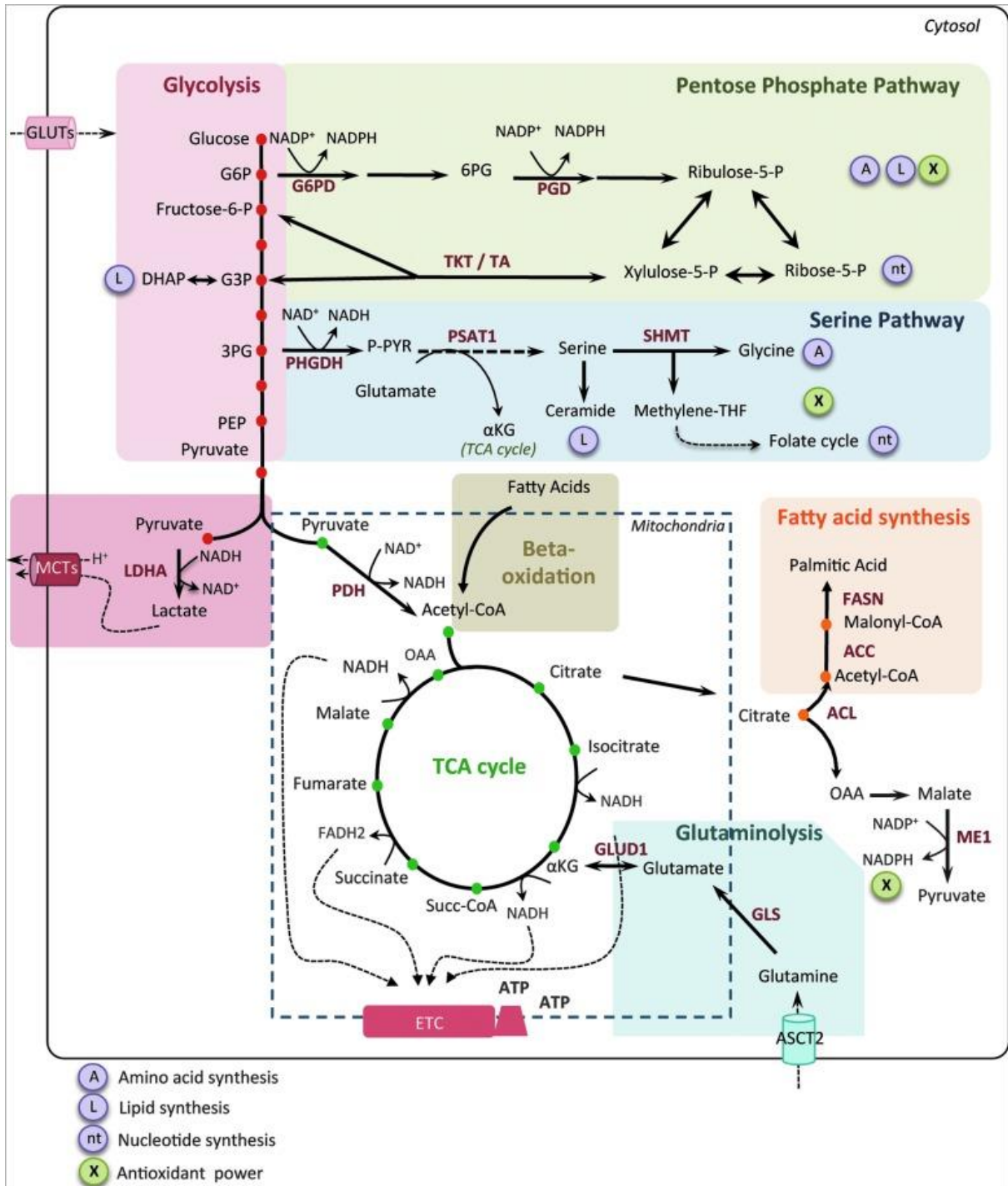


Figure 18 : Principales voies métaboliques modifiées dans les cancers.

Dans les cellules cancéreuses, les voies métaboliques énergétiques canoniques sont souvent tronquées (glycolyse, cycle de Krebs) ou redirigées (glutaminolyse, biosynthèse des sérines et des lipides). Brièvement, le glucose, dont l'entrée cellulaire est permise par les GLUTs, peut fournir du pyruvate via la glycolyse, qui est soit converti en lactate sécrété via les MCTs, soit transporté vers la mitochondrie

pour alimenter le cycle de Krebs (TCA cycle). L'activité du cycle de Krebs apporte le potentiel réducteur nécessaire à la respiration mitochondriale, qui permet une production importante d'énergie sous forme d'ATP. De plus, le citrate, un intermédiaire du cycle de Krebs, est un précurseur de la synthèse des acides gras. D'autres voies alimentent le cycle de Krebs : la glutaminolyse et la β -oxydation des acides gras. De plus, le glucose est une source de G6P et G3P, qui peuvent alimenter les voies des pentoses phosphates et des sérines respectivement, qui fournissent toutes les deux des précurseurs des voies de biosynthèses cellulaires et un pouvoir antioxydant. ETC : Electron Transport Chain (d'après Gentric et al., 2017)

La flexibilité métabolique pour l'alimentation du cycle de Krebs favorise l'adaptation des cellules à leur environnement lors de la progression tumorale. Dans un environnement déprivé en nutriments, des cellules de cancer du pancréas induites par KRAS peuvent utiliser les protéines extracellulaires par macropinocytose pour s'approvisionner en glutamine et autres acides aminés qui viennent alimenter le cycle de Krebs (Kamphorst et al., 2015). L'autophagie fournit également de la glutamine à des cellules de cancer du poumon pour soutenir l'activité mitochondriale (J. Y. Guo et al., 2011; Strohecker et al., 2013). De plus, des cellules de glioblastome cultivées en absence de glutamine présentent une activité de pyruvate carboxylase plus élevée qu'en présence de glutamine, et sont même dépendantes de cette voie anaplerotique pour leur survie (T. Cheng et al., 2011). Une étude sur le cancer du poumon montre également que l'activité de cette voie est modulée en fonction de la disponibilité en pyruvate et glutamine (Christen et al., 2016). De plus, les cellules cancéreuses peuvent s'adapter en limitant leur production d'ATP en conditions nutritives limitantes afin de maintenir le ratio ATP/ADP (DeBerardinis & Chandel, 2016). Si nécessaire, elles peuvent générer davantage d'AMP à partir d'ADP, ce qui a pour conséquence l'augmentation de l'oxydation des acides gras qui favorise la production d'ATP (Hardie et al., 2016; Kamphorst et al., 2013).

Ces différentes études montrent que les cellules malignes subissent des reprogrammations métaboliques leur permettant de s'adapter au contexte nutritif, comme la disponibilité en dioxygène, glucose et glutamine, qui peuvent être rares dans les écosystèmes tumoraux. Il a d'ailleurs été montré que les disponibilités en nutriments peuvent varier considérablement d'un organe à un autre dans un modèle porcin et dans des modèles tumoraux murins de cancers du poumon et du pancréas (Jang et al., 2019; Sullivan, Danai, et al., 2019). L'hypoxie, via les facteurs de transcriptions HIF (hypoxia-inducible factors 1/2) induit une réponse transcriptionnelle qui augmente la glycolyse des cellules (Bertout et al., 2008). L'hypoxie diminue également la synthèse protéique (Heacock & Sutherland, 1990). De plus, le pH interstitiel module le métabolisme des cellules malignes. L'acidose a en effet été montrée comme pouvant réduire la glycolyse et l'activité du cycle de Krebs des cellules de lignées de cancer du sein, tout en augmentant leur glutaminolyse et leur synthèse d'acides gras (J. Gao et al., 2020). Dans cette étude, l'acidose accompagnée d'une augmentation de lactate disponible pour les

cellules augmente quant à elle la voie des pentoses phosphate et le relargage d'acétate par les cellules malignes.

Notons que les cellules malignes ne sont pas les seules cellules de la tumeur capables de modifier leur métabolisme puisque les cellules endothéliales, immunitaires et les fibroblastes de la tumeur subissent également des modulations métaboliques sous l'influence des cellules malignes et de la disponibilité en nutriments (Elia & Haigis, 2021).

b) Régulation du métabolisme des cancers

Le contexte nutritif n'explique pas à lui seul les reprogrammations métaboliques observées au sein des tumeurs. En effet, certaines voies de signalisation qui sont retrouvées perturbées dans les cancers régulent finement le métabolisme des cellules malignes. Ces voies sont en particulier régulées par des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs.

La voie PI3K/AKT/mTOR est une voie de signalisation qui régule particulièrement le métabolisme cellulaire à différents niveaux. En particulier, un des complexes formés à partir de mTOR, mTORC1, favorise la conversion des nutriments et de l'énergie disponibles en macromolécules telles que protéines, acides nucléiques et lipides et diminue le recyclage des macromolécules par autophagie (Valvezan & Manning, 2019). En particulier, l'axe mTORC1/4EBP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-Binding Protein 1) favorise l'activité mitochondriale et la biogenèse (Morita et al., 2013) et l'axe mTORC1/S6K1 (Ribosomal protein S6 Kinase beta-1) favorise la lipogenèse et la voie des pentoses phosphate en activant SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) (Düvel et al., 2010; Peterson et al., 2011). Une étude montre que la voie EGFR/PI3K/AKT/SREBP promeut également la synthèse d'acides gras dans le glioblastome, indépendamment de mTORC1 (D. Guo et al., 2009). De plus, PI3K/AKT régule HIF1. En particulier, HIF1 peut être activé en normoxie par différentes voies de signalisation telles que PI3K/AKT/mTOR, PI3K/AKT/GSK3 et RAS/MAPK (Bárdos & Ashcroft, 2004). Ce facteur augmente la glycolyse des cellules en favorisant l'expression des transporteurs de glucose GLUT1/2/3 (GLUcose Transporters) et d'enzymes glycolytiques comme HK2 (hexokinase 2), enzyme limitante de la première étape de la glycolyse, et LDHA (lactate dehydrogenase A), qui convertit le pyruvate en lactate (**Figure 18**). HIF1 inhibe également l'activité du cycle de Krebs en limitant la transcription de PDK (dehydrogenase kinase), prévenant ainsi la conversion du pyruvate en acétyl-CoA (Brahimi-Horn et al., 2011; J. Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), qui peut être retrouvé diminué ou augmenté dans les cancers (LeBleu et al., 2014; Vazquez et al., 2013; Watkins et al., 2004; Y. Zhang et

al., 2007), régule positivement la respiration mitochondriale dans des cellules de mélanome (Vazquez et al., 2013) ainsi que dans des cellules malignes de cancer du sein invasif (Andrzejewski et al., 2017).

Dans les cancers, la voie PI3K/AKT/mTOR est souvent retrouvée activée dans les cellules malignes sans stimulation de facteurs de croissance mais grâce à différentes mutations comme des mutations activatrices de *PI3KCA* et de *RAS* ou grâce à la perte de *PTEN* (T. Yuan & Cantley, 2008). Il a été montré que la perte de *PTEN* et de *VHL* (Von Hippel-Lindau), et des mutations des oncogènes *RAS* et *SCR* favorisent la stabilité et l'activité d'HIF1 dans les cellules malignes (Bárdos & Ashcroft, 2004; Maxwell et al., 1999).

D'autres oncogènes régulent le métabolisme comme *MYC*. *MYC* peut favoriser la glycolyse, la synthèse d'acides gras, la glutaminolyse, le métabolisme des sérines ainsi que le métabolisme mitochondrial (Stine et al., 2015). L'expression de *MYC* dans les tumeurs agressives augmente notamment la biogenèse mitochondriale en favorisant l'expression du gène *TFAM* (facteur de transcription mitochondrial A) (F. Li et al., 2005). Il a aussi été montré que les oncogènes *MYC* et *MET* (qui code pour le récepteur du HGF_ hepatocyte growth factor_) sont associés à des métabolismes différents *in vivo* dans des cancers du foie et du poumon (Yuneva et al., 2012).

Le gène suppresseur de tumeur *P53*, retrouvé muté dans de nombreux cancers, régule également différentes voies métaboliques, en limitant la glycolyse des cellules en faveur du métabolisme mitochondrial, contribuant à l'adaptation des cellules à un stress métabolique (Kruiswijk et al., 2015). L'activation de *P53* est d'ailleurs favorisée par le senseur de stress nutritif AMPK (kinase AMP-dépendante), en particulier en conditions de déprivation de glucose (Y. Zhou & Liu, 2022). Au contraire, AMPK limite l'activité de mTORC1 (Gwinn et al., 2008; Inoki et al., 2003).

Des mutations de *KEAP1* (Kelch-like ECH-associated protein 1), qui régule négativement *NRF2*, ainsi que des mutations gain de fonction de *NRF2* ont également été observées dans certains cancers du poumon (Sayin et al., 2019). La signalisation *NRF2/ATF4* a été montrée comme favorisant la voie métabolique sérine/glycine, facilitant la détoxification des ROS (Reactive Oxygen Species) et la synthèse nucléotidique dans le cancer du poumon (DeNicola et al., 2015).

Le métabolisme dans les cancers est donc en partie sous le contrôle de différents oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs. Les mutations ou amplifications des gènes codant pour des enzymes métaboliques sont bien plus rares. Parmi elles, la PHGDH (phosphoglycerate dehydrogenase), qui permet la première étape de biosynthèse des sérines et participe à l'anaplérose, est amplifiée dans le cancer du sein et le mélanome (Locasale et al., 2011; Possemato et al., 2011). Cette amplification est particulièrement intéressante dans un environnement appauvri en sérine (Sullivan, Mattaini, et al., 2019). De plus, les isocitrate déshydrogénases *IDH1* et *IDH2* (Isocitrate Dehydrogenases) sont retrouvées mutées dans certains cancers comme les gliomes et certaines leucémies (Mardis et al.,

2009; Yan et al., 2009). Ces mutations induisent l'augmentation du 2HG (2-HydroxyGlutarate), une forme réduite de l'intermédiaire du cycle de Krebs α -cétoglutarate. Il s'agit d'un oncométabolite inhibant les dioxygénases qui nécessitent l' α -cétoglutarate pour fonctionner. Ces inhibitions induisent des modulations d'expression de gènes et en particulier une diminution de l'expression des programmes de différenciation cellulaire (DeBerardinis & Chandel, 2016). Des mutations perte de fonction de la *SDH* (succinate déshydrogénase) et inactivatrices de la *FH* (fumarate hydratase) ont également été retrouvées dans quelques cancers, favorisant l'accumulation d'oncométabolites appartenant au cycle de Krebs que sont le succinate et le fumarate, respectivement (Finley, 2023a). Ces oncométabolites stabilisent HIF1 (Isaacs et al., 2005; Selak et al., 2005), limitent également les programmes de différenciation cellulaire (Sciacovelli & Frezza, 2016) et favorisent l'EMT des cellules malignes (Sciacovelli et al., 2016) ainsi que les programmes antioxydants (Adam et al., 2011; Ooi et al., 2011).

Une étude en spectrométrie de masse sur 225 métabolites réalisée avec 928 lignées issus de 20 types de cancers différents a montré que les mutations de *KEAP1* et *IDH1* étaient associées à la teneur en certains métabolites alors que des modifications d'expression de certains oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur comme *P53*, *PTEN* ou *KRAS* ne sont associés à aucun métabolite (H. Li, Ning, et al., 2019). Il a d'ailleurs été montré *in vivo* que l'oncogène *MYC* n'a pas le même effet sur le métabolisme des cellules malignes dans le cancer du foie et dans le cancer du poumon (Yuneva et al., 2012). Ces études soulignent que le métabolisme des cellules malignes dépend à la fois du contexte mutationnel propre aux cellules malignes et du contexte nutritif (Mayers & Vander Heiden, 2017). En revanche, il apparaît que certaines voies de signalisation incluant PI3K/AKT, bien que modulées par des mutations/contextes différents, sont communément impliquées dans les reprogrammations métaboliques des cancers.

c) Le métabolisme dans les cancers du sein

Les études métaboliques sur les cancers du sein ont montré des différences entre les sous-types (**Figure 19**). En particulier, des lignées de CSTN ont été montrées comme davantage glycolytiques que des lignées luminales, et présentent également une respiration mitochondriale moins élevée, corrélée à une atténuation de la signalisation mTOR (Pelicano et al., 2014). Une autre étude montre par l'utilisation de différents inhibiteurs métaboliques que les lignées de CSTN sont davantage dépendantes de la glycolyse que les lignées luminales, qui dépendent de l'activité du cycle de Krebs (Ripoll et al., 2021). Chez les patientes, des marquages sur coupes tumorales ont également mis en évidence l'hétérogénéité métabolique entre les différents sous-types de cancers du sein (J. Choi et al.,

2013). Dans cette étude, les CSTN présentent des cellules malignes avec un phénotype glycolytique alors que les tumeurs lumineales présentent des cellules malignes moins glycolytiques associées à un stroma glycolytique (J. Choi et al., 2013). De plus, une analyse protéomique et transcriptomique d'échantillons de patientes atteintes de cancer du sein a confirmé que les CSTN présentent des métabolismes différents des cancers lumineaux, en particulier les métabolismes du glucose et de la glutamine (Gámez-Pozo et al., 2015).

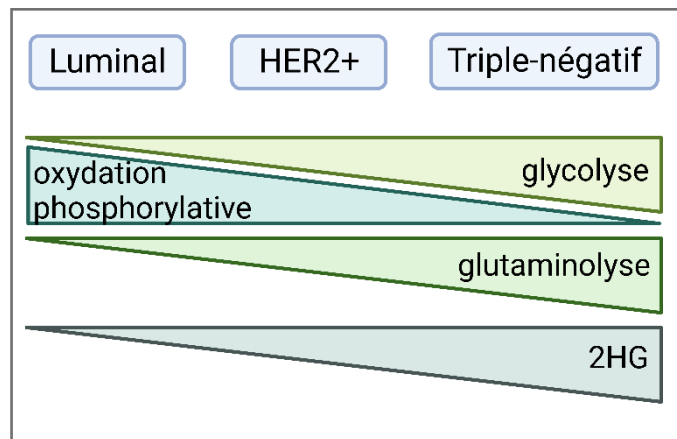


Figure 19 : Schéma général de l'hétérogénéité métabolique entre les sous-types de cancer du sein
Des disparités métaboliques au sein même des sous-types ont également été observées. 2HG : oncométabolite 2 hydroxyglutarate

Il a été montré dans une étude sur des lignées cellulaires que les tumeurs basal-like dépendent davantage de la glutamine exogène que les tumeurs lumineales, en lien avec une expression réduite de glutamine synthétase et une expression augmentée de glutaminase dans les cellules de lignée basal-like (Kung et al., 2011). Une autre étude réalisée sur des dizaines de lignées de cancer du sein confirme que les lignées de CSTN consomment davantage de glutamine que les lignées lumineales (Timmerman et al., 2013). L'addiction pour la glutamine a été montrée comme favorisant l'oxydation du glucose dans les lignées de CSTN (Quek et al., 2022).

Des différences dans la voie des pentoses phosphates ont également été rapportées. En particulier, l'expression des enzymes impliquées dans cette voie varie entre les différents sous-types luminal, HER2+ et triple-négatif (J. Choi et al., 2018).

De plus, une surexpression de la PHGDH a été trouvée dans les CSTN mais pas dans les cancers lumineaux A (J. Choi et al., 2018). Un profilage métabolique de tumeurs mammaires de patientes a également révélé une augmentation de 2HG dans les cancers triple négatifs, non associée à des mutations d'*IDH1/2*, mais à une plus forte activation de MYC et à une surexpression de la glutaminase (Terunuma et al., 2014).

Les différences métaboliques au sein des tumeurs mammaires peuvent être liées à différents facteurs. Notamment, il a été montré que l'œstradiol module la glycolyse et l'activité du cycle de Krebs de lignées luminales via les récepteurs ER α et ER β , avec des effets opposés suivant la teneur en glucose (O'Mahony et al., 2012). Entre autres, les œstrogènes favorisent l'activation de la voie PI3K/AKT (K. Zhou et al., 2016) et le récepteur ER α régule l'expression d'HIF1 (J. Yang et al., 2015). De plus, l'expression de HER2 dans des cellules malignes de cancer du sein augmente la glycolyse en activant HSF1 (heat shock factor 1) qui favorise la transcription de LDHA (Y. H. Zhao et al., 2009) ou encore en inhibant la respiration mitochondriale (Y. Ding et al., 2012). Il a également été montré que HER2 favorise l'expression de FASN (fatty-acid synthase), augmentant la synthèse des acides gras (Vazquez-Martin et al., 2008).

Les mutations génétiques pourraient participer à l'hétérogénéité des métabolismes entre différents cancers du sein. En effet, une étude transcriptomique montre que des tumeurs mammaires de patientes mutées pour le gène *P53* expriment davantage certains gènes de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphate et au contraire expriment moins les gènes de la néoglucogenèse (Harami-Papp et al., 2016). Une autre étude montre que des mutations de *P53* sont associées à une diminution des niveaux de lipides glycérophosphocholines dans des tumeurs de patientes (X. Tang et al., 2014). Cette étude montre aussi que le niveau d'expression de BRCA1 est associé à différents métabolites. D'autres mutations ont été associées à des modifications métaboliques dans les cancers du sein (Kulkoyluoglu-Cotul et al., 2019).

Ainsi, les récepteurs aux hormones, HER2 et les mutations génétiques peuvent moduler le métabolisme des cancers du sein. Certains de ces marqueurs et mutations sont retrouvés dans différents sous-types de cancer du sein et ne peuvent donc pas expliquer à eux seuls expliquer l'hétérogénéité métabolique entre les différents sous-types de cancers.

Une analyse protéomique utilisant des échantillons humains tumoraux et sains révèle que l'hétérogénéité métabolique entre les sous-types de cancers du sein peut être expliquée par l'origine des cellules malignes (Mahendralingam et al., 2021). En effet, les tumeurs basal-like se rapprochent métaboliquement des cellules progénitrices luminales d'échantillons mammaires normaux, les tumeurs claudin-low des cellules basales et enfin les tumeurs luminales se rapprochent métaboliquement des cellules matures luminales. Les cellules malignes auraient donc des métabolismes proches de leurs cellules d'origine présumées (Lim et al., 2009; Visvader, 2009).

Il a de plus été montré une certaine hétérogénéité métabolique entre les cancers du sein du même sous-type. Dans les cancers luminaux A, une étude transcriptomique d'échantillons de patientes identifie en particulier 3 clusters, qui diffèrent dans l'expression de gènes impliqués dans les métabolismes du glucose, d'acides aminés et des lipides (Borgan et al., 2010). De plus, dans les CSTN,

une étude indique des disparités des taux glycolytique et de respiration mitochondriale entre différentes lignées cancéreuses (Lanning et al., 2017). En particulier, les différentes lignées cellulaires ne présentent pas la même sensibilité à différents inhibiteurs métaboliques. Etant donné que les tumeurs de sein sont composées d'un mélange des différents sous-types cellulaires malins luminaux et basaux, l'ensemble de ces résultats suggère une hétérogénéité métabolique intra-tumorale dans les cancers du sein.

Ainsi, les mutations et variations d'expression génétique retrouvées dans les cancers du sein ainsi que le microenvironnement tumoral participent à l'hétérogénéité métabolique dans les cancers du sein. Cette hétérogénéité est retrouvée entre les tumeurs de différents types mais également au sein des tumeurs elles-mêmes. Une hétérogénéité métabolique a également été retrouvée dans des cancers provenant d'autres organes comme le pancréas (Camelo & Le, 2021) ou le poumon, au sein duquel une hétérogénéité inter et intra-tumorale du métabolisme du glucose a été montrée avec des tumeurs de patients (Hensley et al., 2016), et une hétérogénéité métabolique a été mise en avant parmi de nombreuses lignées (P.-H. Chen et al., 2019). De plus, Gentric et al ont identifié, au sein de patientes atteintes de cancer de l'ovaire, deux groupes de tumeurs métaboliquement distinctes. Le groupe « low OXPHOS » est caractérisé par un métabolisme glycolytique tandis que l'autre, « high OXPHOS », repose davantage sur la phosphorylation oxydative, soutenue par la glutamine et les acides gras, et présente un stress oxydatif plus important (Gentric et al., 2019).

II- Implication du métabolisme dans la progression tumorale

a) Initiation et prolifération

La glycolyse et la biosynthèse lipidique sont des caractéristiques communes aux cellules hautement proliférantes (Fritz & Fajas, 2010). Des cellules souches adultes quiescentes présentent généralement un métabolisme faible dépendant principalement de la glycolyse et associé à une faible prolifération (Ito & Suda, 2014; Panopoulos et al., 2012; Rossi et al., 2008). Les cellules souches cancéreuses (CSCs) sont métaboliquement différentes. En effet, dans les cancers pancréatiques, mammaires et ovariens, les CSCs ont été décrites comme reposant davantage sur la phosphorylation oxydative que les cellules souches non cancéreuses (non-CSCs) (Feng et al., 2014; Pastò et al., 2014; Sancho et al., 2015; A. Viale et al., 2014). L'utilisation du pyruvate par les cellules malignes est modulée au cours des différentes

phases de la progression tumorale dans un modèle murin de cancer du foie induit par *MYC* (S. Hu et al., 2011). Plus particulièrement, l'étude a montré que la conversion de pyruvate radiomarqué en alanine prédomine dans les tissus pré-cancéreux, suggérant que des modulations métaboliques précèdent la tumorigenèse. En revanche, les CSCs de cancers du poumon semblent être métaboliquement moins actives que les non-CSCs avec une consommation de glucose et d'oxygène moins importante et une production d'énergie moins élevée (X.-Q. Ye et al., 2011). Comme pour les cellules malignes différenciées, il existe ainsi une hétérogénéité métabolique entre les CSCs de différents cancers.

Comme vu précédemment, la disponibilité en nutriments est variable au sein d'une tumeur solide et l'autophagie est une voie importante d'adaptation métabolique. En particulier, cette voie favorise la tumorigenèse (J. Y. Guo et al., 2011) et la prolifération des cellules malignes (Bosc et al., 2020; Poillet-Perez & White, 2019). Il a été montré que le senseur de stress métabolique AMPK présente des effets anti-tumoraux mais peut également favoriser la tumorigenèse et la prolifération des cellules malignes (C.-C. Hsu et al., 2022). L'utilisation de glutamine par des cellules malignes invasives de l'ovaire favorise également la prolifération (L. Yang et al., 2014). De plus, la respiration mitochondriale participe à la prolifération cellulaire en soutenant la synthèse d'aspartate dans des cellules malignes (Birsoy et al., 2015).

Les ROS qui incluent l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (Murphy, 2009), modulent également la progression tumorale. Ils peuvent être issus de la respiration mitochondriale et des NADPH oxydases (NOXs) cytosoliques qui produisent du superoxyde, rapidement converti en H_2O_2 dans le cytosol ou la mitochondrie (M. D. Brand, 2010). Des faibles niveaux de ROS, en particulier d' H_2O_2 , peuvent oxyder des résidus de cystéine de certaines protéines pour favoriser la prolifération cellulaire et l'adaptation cellulaire au stress métabolique (Finkel, 2012). Les cellules malignes présentent une élévation des taux localisés de ROS issus de la mitochondrie ou des NOXs par rapport aux cellules normales. Ces taux élevés sont en lien avec les lésions oncogéniques et le microenvironnement tumoral, et favorisent l'activation à proximité des voies de signalisation PI3K et MAPK et des facteurs de transcription HIF1 α et NF κ B (nuclear factor-kappa B) nécessaires à la tumorigenèse (DeBerardinis & Chandel, 2016). Des antioxydants ciblant la mitochondrie et des inhibiteurs de NOXs peuvent ainsi limiter la prolifération de cellules malignes dépendantes de KRAS (Weinberg et al., 2010). La production accrue de ROS nécessite cependant une détoxification afin de limiter l'activation par les ROS de voies de signalisation conduisant à des altérations protéiques, des dommages à l'ADN et la mort cellulaire. Les cellules malignes peuvent éliminer l' H_2O_2 sous forme d'eau via l'action de différentes enzymes comme les glutathion peroxydases (DeBerardinis & Chandel, 2016). Le NADPH est requis pour maintenir de multiples systèmes de défense anti-oxydants et peut être

régénéré via la voie des pentoses phosphate, l'enzyme malique 1, IDH1/2 ou encore le métabolisme du carbone et est régulé par NRF2. Il a aussi été montré que des taux élevés de ROS sont toxiques pour les cellules et réduisent la tumorigenèse (DeNicola et al., 2011; Garama et al., 2015; Harris et al., 2015). Ainsi, la régulation de l'équilibre redox est requise pour la tumorigenèse, et les reprogrammations métaboliques des cellules malignes régulent cette balance.

Le métabolisme cellulaire participe ainsi à l'initiation et la prolifération des cellules malignes, qui modulent leur métabolisme au cours de la progression tumorale.

b) Métastases

Des études montrent que les cellules invasives présentent un métabolisme différent des cellules non-invasives. Dans le cancer de l'ovaire, les lignées invasives dépendent davantage de la glutamine pour leur survie et l'activité du cycle de Krebs que les lignées peu invasives (L. Yang et al., 2014). De même, une étude *in vivo* montre que des cellules invasives de mélanome présentent une activité mitochondriale accrue par rapport aux cellules primaires non-invasives, avec notamment une augmentation des intermédiaires du cycle de Krebs (Porporato et al., 2014). Ces résultats sont en accord avec l'étude de LeBleu et al qui montre chez la souris que les cellules invasives et métastatiques présentent une plus forte biogenèse mitochondriale et production d'énergie sous forme d'ATP que les cellules tumorales primaires de cancer mammaire (LeBleu et al., 2014).

Il a également été montré dans un modèle murin *in vivo* de tumeur mammaire que les cellules malignes métastatiques dans le poumon reposent davantage sur l'anaplérose dépendante de la pyruvate carboxylase que les cellules malignes primaires (Christen et al., 2016). En particulier, cette étude montre que la disponibilité en pyruvate dans le microenvironnement et l'augmentation du pyruvate mitochondrial favorisent la dépendance à la pyruvate carboxylase des cellules malignes mammaires. En lien avec les propriétés propres au site métastatique, comme la disponibilité en nutriments, des signatures métaboliques métastatiques différentes ont été montrées dans les cancers du sein en fonction de l'organe métastatique (Dupuy et al., 2015). Les cellules métastatiques aux poumons et aux os présentent en effet une augmentation d'expression des gènes de la phosphorylation oxydative et de la glutaminolyse, associée à une augmentation des intermédiaires du cycle de Krebs citrate et succinate alors que les cellules métastatiques du foie montrent une augmentation des gènes de la glycolyse. Cette étude révèle que l'augmentation de la glycolyse propre aux cellules métastatiques du foie repose sur l'axe HIF1 α /PDK1 et que l'inhibition de l'expression de PDK1 limite l'apparition de métastases dans le foie.

Ainsi, les reprogrammations métaboliques semblent favoriser l'invasion et les métastases. Lee et al ont montré dans un modèle murin *in vivo* de mélanome que la reprogrammation métabolique des cellules malignes orchestrée par YAP en faveur de la β -oxydation des acides gras est nécessaire à la formation de métastases dans les ganglions lymphatiques (C.-K. Lee et al., 2019). L'implication de la β -oxydation des acides gras dans l'apparition de métastases pulmonaires et hépatiques a été également mise en avant *in vivo* dans le CSTN (J. H. Park et al., 2016). De plus, Porporato et al ont montré que l'activité mitochondriale accrue dans les cellules malignes de mélanome, via la génération d'anion superoxyde, est nécessaire au processus de formation de métastases aux poumons (Porporato et al., 2014). De plus, l'activité mitochondriale accrue observée dans les cellules invasives par LeBleu et al dépend de PGC1 α et l'inhibition de PGC1 α entraîne une diminution de la biogenèse mitochondriale ainsi que du potentiel invasif et métastatique des cellules malignes (LeBleu et al., 2014). Une autre étude montre l'implication de PGC1 α dans l'apparition de métastases aux poumons en plus de son effet sur l'activité mitochondriale accrue dans un modèle murin *in vivo* de tumeur mammaire HER2+ (Andrzejewski et al., 2017). Il a également été montré que l'augmentation du catabolisme de l'acide aminé proline dans les cellules malignes mammaires triple négatives favorise la formation de métastases pulmonaires (Elia et al., 2017). De plus, Elia et al ont montré *in vivo* que les cellules cancéreuses mammaires reposent sur le pyruvate pour produire du collagène qui participe à la formation de la niche métastatique pulmonaire (Elia et al., 2019). Enfin, la glycolyse, en acidifiant la MEC, peut favoriser la migration des cellules malignes, notamment en promouvant l'activation de métalloprotéinases qui dégradent la MEC (Y. Kato et al., 1992; Martínez-Zaguilán et al., 1996; Schlappack et al., 1991).

Ainsi, ces différentes études mettent en avant la participation des reprogrammations métaboliques des cellules malignes à la progression métastatique des cancers.

c) Immunorégulation

Le métabolisme impacte également les fonctions des cellules immunitaires au sein de la tumeur, en particulier les fonctions des macrophages associés à la tumeur (TAMs) et des lymphocytes T infiltrant la tumeur (TILs).

Tous d'abord, des différences métaboliques ont été décrites en fonction de la nature des TILs et des TAMs. Il a ainsi été décrit que les lymphocytes T effecteurs (Teff), qui induisent une réponse immunitaire, sont fortement glycolytiques et lipogéniques alors que les lymphocytes T régulateurs (Treg) reposent davantage sur la lipolyse et l'oxydation lipidique (Michalek et al., 2011). De même, le

métabolisme des macrophages est différent suivant leur polarisation. Les macrophages pro-inflammatoires M1 sont glycolytiques alors que les M2 anti-inflammatoires reposent sur la phosphorylation oxydative (Gentric et al., 2017).

Ainsi, il a été montré que la différenciation des cellules immunitaires tumorales est régulée par des programmes métaboliques distincts. Des études montrent que la diminution ou la déprivation en glucose modulent le fonctionnement des lymphocytes T (C.-H. Chang et al., 2015; Ho et al., 2015; Jacobs et al., 2008). Le blocage de la phosphorylation oxydative des macrophages induit leur polarisation en M1, alors que la stimulation de la phosphorylation oxydative et de la β -oxydation des acides gras favorise la polarisation en macrophages M2 (S. C.-C. Huang et al., 2014; Rodríguez-Prados et al., 2010; Vats et al., 2006). Il a été montré que le manque de glutamine limite l'activité des macrophages (Rodríguez-Prados et al., 2010; Wallace & Keast, 1992) et favorise la différenciation lymphocytaire en Treg FOXP3+ (Klysz et al., 2015). De plus, les disponibilités en L-arginine et sérine favorisent l'activité anti-tumorale des lymphocytes T (Geiger et al., 2016; E. H. Ma et al., 2017). L'hypoxie peut également favoriser la fonction cytotoxique des lymphocytes T en stabilisation HIF1 α (Doedens et al., 2013) mais si l'hypoxie persiste, l'activation des lymphocytes T cytotoxiques est limitée (Lukashev et al., 2006). L'hypoxie peut également favoriser le phénotype pro-inflammatoire des macrophages (Cramer et al., 2003). Cependant, une carence double en oxygène et glucose favorise le phénotype immunosuppresseur des macrophages, pouvant expliquer la présence de macrophages immunosuppresseurs dans les zones tumorales hypoxiques (Corchado-Cobos et al., 2022).

Le lactate et l'acidose favorisent également la polarisation des macrophages en M2 via le récepteur GPR132 (G Protein coupled Receptor 132) (P. Chen et al., 2017; Colegio et al., 2014; Dietl et al., 2010; Goetze et al., 2011; Mu et al., 2018) et régulent le fonctionnement des Teff (A. Brand et al., 2016; Fischer et al., 2007). Enfin, la production de ROS module les capacités pro-inflammatoires des macrophages (Freemerman et al., 2014; Y. Zhang et al., 2013). Les ROS mitochondriaux régulent également la réponse des lymphocytes T et leur fonctionnement (Kaminski et al., 2010; Kamiński et al., 2012; Sena et al., 2013).

Ainsi, le métabolisme des cellules immunitaires de la tumeur et la disponibilité en nutriments dans le microenvironnement tumoral, qui est en grande partie influencée par les cellules malignes, affectent la différenciation et le fonctionnement des cellules immunitaires et régulent ainsi la réponse inflammatoire cancéreuse.

III- Le métabolisme dans la résistance aux traitements

a) Résistance aux traitements

De plus en plus d'études montrent l'implication des reprogrammations métaboliques dans la résistance des cellules malignes aux traitements (Gonçalves et al., 2021). Au sein d'un même type cellulaire tumoral, les adaptations métaboliques peuvent d'ailleurs être différentes pour des traitements similaires. Par exemple, la résistance à deux anthracyclines comme la doxorubicine et l'épirubicine est associée à des vulnérabilités métaboliques distinctes dans une même lignée de cancer du sein (McGuirk et al., s. d.). Plus précisément, les cellules résistantes à la doxorubicine reposent sur le métabolisme de la glutamine pour la phosphorylation oxydative et la synthèse du glutathion alors que les cellules résistantes à l'épirubicine présentent des capacités bioénergétiques et une production d'ATP médiée par l'OXPPOS plus élevées.

De nombreuses études montrent que la glycolyse soutient la résistance aux thérapies anti-cancéreuses dans divers types de cancer (Marcucci & Rumio, 2021) (**Figure 20**). La résistance aux drogues induite par la glycolyse est notamment associée à l'inhibition de l'apoptose, l'activation de l'EMT, l'augmentation de l'autophagie et la régulation de l'influx/efflux des traitements, et intervient en réponse à des stimuli externes et internes variés. Dans les cancers du sein luminaux, la résistance au tamoxifène est associée à l'augmentation de la glycolyse via l'activation de la voie de signalisation EGFR (M. He et al., 2019). Dans le cancer du foie, la surexpression dans les cellules cancéreuses d'HK2 induite par HIF1 α mène à l'augmentation de la glycolyse et à la résistance au sorafenib, un inhibiteur de kinases (R. Gao et al., 2021). Au contraire, des études montrent que l'adaptation à la déprivation en glucose peut favoriser la résistance aux traitements (**Figure 20**). En effet, dans le cancer du sein HER2+, les lignées résistantes au lapatinib présentent une augmentation du réseau de déprivation en glucose, qui inclut la signalisation du glucagon, la néoglucogenèse et l'UPR (Komurov et al., 2012). De façon concordante, la déprivation en glucose rend les cellules malignes plus résistantes au traitement dans cette étude. Dans le cancer du pancréas, l'hyperglycémie favorise la sensibilité à différentes chimiothérapies en induisant une diminution de la synthèse de glutathion, ce qui favorise les dommages oxydatifs induits par les traitements (Vaziri-Gohar et al., 2023). De plus, une déprivation en glucose favorise la résistance des cellules de cancer colorectal au 5-Fu et à l'oxaliplatine via l'activation de la voie PERK/ATF4 (Y.-L. Hu et al., 2016). Une étude montre également que la déprivation en glucose ou l'inhibition pharmacologique de la glycolyse par le 2DG (2-Deoxy-D-Glucose) favorisent l'expression de la glycoprotéine P-gp, un transporteur transmembranaire impliqué dans la résistance aux traitements (Ledoux et al., 2003). En particulier, cet effet peut être reproduit par la thapsigargine, un

inducteur de la réponse au stress du réticulum endoplasmique, et est atténué par l'utilisation d'antioxydants.

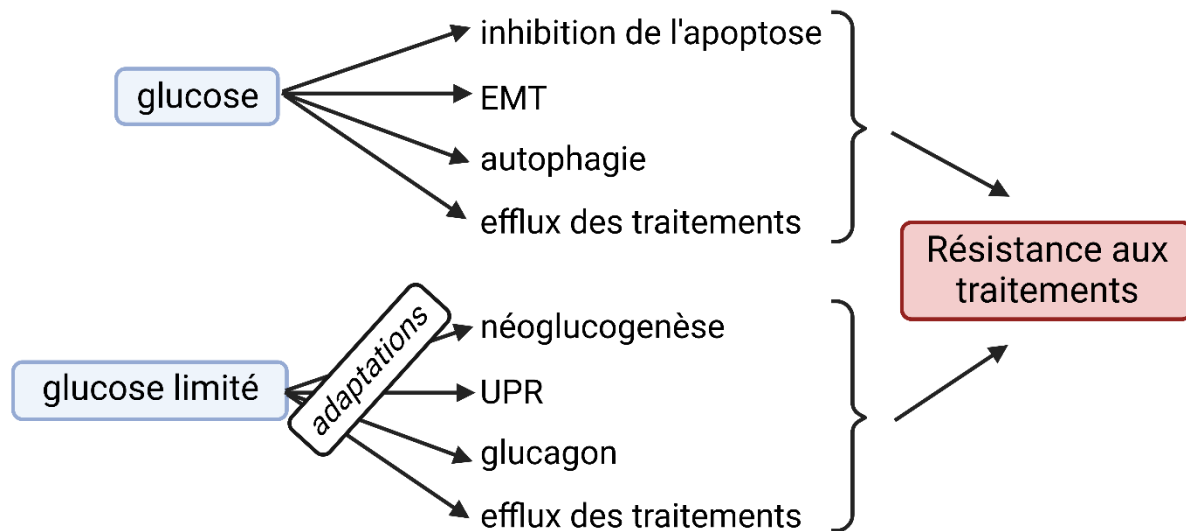


Figure 20 : Mécanismes de résistance des cellules malignes aux traitements induite par la disponibilité en glucose

La résistance aux traitements peut être favorisée par le glucose mais également par une diminution de son accessibilité.

D'autres modulations et adaptations du métabolisme et voies cellulaires à la disponibilité des nutriments modulent la réponse aux traitements des cellules malignes (**Figure 21**).

En particulier, le métabolisme mitochondrial oxydatif contribue à la résistance aux traitements. Une dépendance accrue des cellules malignes au métabolisme énergétique mitochondrial, en particulier l'OXPPOS, a été montrée dans divers cancers comme le cancer de l'ovaire, du côlon, de la prostate et du sein (Gonçalves et al., 2021). Des cellules de cancer du poumon non à petites cellules mutées *EGFR* et des cellules de mélanome mutées *BRAF* qui sont résistantes à certains traitements subissent une reprogrammation métabolique vers l'OXPPOS (Hirpara et al., 2019). De même, Ippolito et al ont montré que les cellules de cancer de la prostate résistantes au docétaxel subissent une reprogrammation métabolique en faveur de l'OXPPOS (Ippolito et al., 2016). El-Botty et al ont d'ailleurs récemment montré que l'inhibition pharmacologique de l'OXPPOS par l'IACS-010759 améliore l'efficacité de la combinaison palbociclib/fulvestrant dans des modèles *in vivo* de cancers du sein luminaux métastatiques résistants à cette combinaison (El-Botty et al., 2023). La dépendance accrue à l'OXPPOS donne un avantage énergétique et de biosynthèse aux cellules malignes (Bosc et al., 2020). De plus, la production d'ATP par la mitochondrie peut favoriser l'efflux des traitements via l'augmentation de l'activité des transporteurs ABC (Giddings et al., 2021).

Le pyruvate, un métabolite critique au carrefour entre la glycolyse et l'OXPHOS, a été décrit notamment comme favorisant la résistance aux traitements (Corbet & Feron, 2017a). Par exemple, l'inhibition pharmacologique du transporteur mitochondrial de pyruvate sensibilise les cellules malignes à la radiothérapie en diminuant l'hypoxie (Corbet et al., 2018). Cependant, des expressions diminuées du transporteur mitochondrial de pyruvate sont également associées à des résistances au témozolomide dans le glioblastome (Chai et al., 2019) et à la radiorésistance dans le cancer du pancréas (Takaoka et al., 2019).

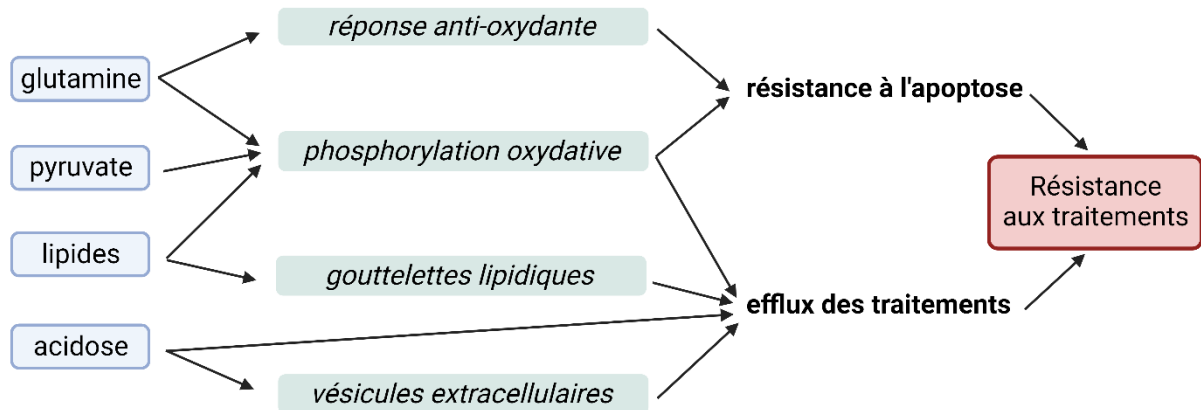


Figure 21 : Mécanismes de résistance des cellules malignes aux traitements induite par d'autres substrats nutritifs et conditions environnementales

L'utilisation de la glutamine par les cellules malignes peut également favoriser la réponse antioxydante des cellules en permettant la production des agents réducteurs GSH et NADPH (Shah & Chen, 2020). De nombreuses études montrent que l'inhibition de la glutaminase (GLS) limite la résistance aux traitements dans divers cancers. Par exemple, l'inhibition de la GLS diminue la résistance à des inhibiteurs de BRAF dans le mélanome (Baenke et al., 2016; Hernandez-Davies et al., 2015), à la gemcitabine dans des cellules de cancer du pancréas mutées *KRAS* (Mukhopadhyay et al., 2020), et au palbociclib dans le cancer de l'œsophage (Qie et al., 2019). De plus, l'activité de certains transporteurs d'acides aminés peut être modifiée dans les cellules malignes et est impliquée dans la résistance aux traitements. Par exemple, le transporteur SLC1A5, qui est induit par l'hypoxie, favorise la production d'ATP via la glutamine ainsi que la production de GSH, conférant la résistance de cellules de cancer du pancréas à la gemcitabine (Yoo et al., 2020). La privation en glutamine sensibilise également les cellules cancéreuses de poumon et d'ovaire au cisplatine en diminuant la biosynthèse nucléotidique (Obrist et al., 2018). De plus, la résistance à l'hormonothérapie dans le cancer du sein a été associée à une diminution de l'expression du transporteur d'acides aminés neutres et basiques SLC6A14 et une augmentation du transporteur d'acides aminés tels que l'aspartate et le glutamate (Bacci et al., 2019). Le transporteur de cystine et glutamate est également impliqué dans la résistance aux traitements

dans divers types cellulaires (Gonçalves et al., 2021). Les métabolismes de la sérine, de l'asparagine et de l'arginine ont aussi été montrés comme favorisant la résistance aux traitements (Montrose et al., 2021; Ross et al., 2017; J. Sun et al., 2019; R. T. Williams et al., 2020; Yoo et al., 2020).

Le métabolisme des lipides contribue via différentes voies à la résistance aux signaux de stress (Corbet & Feron, 2017b). Il a notamment été montré que l'enzyme LPCAT 2 (Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2), impliquée dans la synthèse des phosphatidylcholines, favorise l'accumulation de gouttelettes lipidiques, diminuant le stress du réticulum endoplasmique provoqué par les chimiothérapies et conduisant à la résistance à l'oxaliplatine et au 5-Fu dans le cancer colorectal (Cotte et al., 2018). De plus, des cellules de CSTN résistantes à la doxorubicine montrent une accumulation de gouttelettes lipidiques en plus de l'augmentation de leur contenu en mitochondries (Sirois et al., 2019). En particulier, cette étude montre que les cellules résistantes à la chimiothérapie reposent davantage sur les acides gras et la phosphorylation oxydative que les cellules sensibles. Il a été montré que la dynamique de synthèse et d'oxydation des acides gras module l'équilibre entre énergie et apport en éléments de base du métabolisme, et peut rendre les cellules moins dépendantes du glucose et de la glutamine et moins sensibles aux chimiothérapies (DeBerardinis & Thompson, 2012). Les cellules tumorales résistantes aux chimiothérapies peuvent d'ailleurs présenter simultanément une augmentation de l'oxydation et de la synthèse des acides gras, sous le contrôle d'HIF1 α (Belisario et al., 2020). La synthèse des acides gras est en particulier impliquée dans la résistance à la gemcitabine dans le cancer du pancréas (Tadros et al., 2017). Le métabolisme des lipides régule également la présence des drogues dans les cellules. Par exemple, les gouttelettes lipidiques peuvent séquestrer les traitements lipophiles, comme le docetaxel dans le cancer du sein (Schlaepfer et al., 2012). De plus, le cholestérol favorise la rigidité de certains domaines membranaires où sont situés les transporteurs ABC, les rendant davantage actifs dans l'efflux des molécules thérapeutiques (Gelsomino et al., 2013).

L'acidose peut également moduler la réponse des cellules malignes aux traitements. Dans des cellules de cancer de la prostate chez le rat, l'activité de la pompe à efflux P-gp est favorisée par la diminution du pH extracellulaire, qui limite la sensibilité des cellules malignes à la daunorubicine (Sauvant et al., 2008). En particulier, cette modulation de l'activité de P-gp est médiée par l'activation de P38. Dans l'ostéosarcome, l'acidose à court terme (24h-48h) favorise la résistance des cellules malignes à différentes chimiothérapies (doxorubicine, cisplatine et méthotrexane) (Avnet et al., 2016). L'acidose limite également l'assimilation du cisplatine par des lignées de mélanome, et est associée au relargage de vésicules extracellulaires enrichies en cisplatine, favorisant la résistance à la chimiothérapie (Federici et al., 2014). L'augmentation de la sécrétion de vésicules extracellulaires sous acidose est retrouvée dans d'autres types de cancers (Logozzi et al., 2018; Ralph et al., 2020).

Les adaptations métaboliques des cellules malignes à leur environnement modulent la production de ROS par les cellules, qui peut induire un stress cellulaire et endommager les cellules jusqu'à la mort cellulaire, via le stress oxydatif (Nita & Grzybowski, 2016). Le stress oxydatif peut activer les mécanismes apoptotiques ou de survie cellulaire, en fonction du niveau et de la durée d'exposition (Q. Cui et al., 2018). Certaines drogues et radiations tuent ainsi les cellules malignes en augmentant le stress induit par les ROS (Gupta et al., 2012; Zou et al., 2015). Gentric et al ont montré que le stress oxydatif favorise la sensibilité à une combinaison de carboplatine et paclitaxel de cellules de patientes de cancer de l'ovaire (Gentric et al., 2019). Plus précisément, les cellules reposant sur la phosphorylation oxydative présentent un stress oxydatif chronique plus important que les autres cellules reposant sur la glycolyse, associé à des niveaux plus élevés de protéines oxydées et de produits d'oxydation lipidique, ainsi qu'une diminution des intermédiaires du glutathion. Ce stress oxydatif active en particulier PML (promyelocytic leukemia protein), qui favorise à son tour l'activité de PGC1 α et est associée à l'augmentation de la sensibilité des cellules aux chimiothérapies. Au contraire, des études montrent qu'une exposition chronique des cellules malignes à des niveaux modérés ou élevés de ROS peut augmenter la résistance à certaines thérapies (Mahalingaiah & Singh, 2014). Dans ce cas, le stress oxydatif induit par des chimiothérapies peut favoriser des réponses d'adaptation au stress ayant pour conséquence l'augmentation de molécules réductives, qui stimulent la survie et la résistance des cellules aux chimiothérapies (Chun et al., 2021). Par exemple, la thiorédoxine réductase 2 est retrouvée surexprimée dans certains cancers et est associée à la résistance à l'apoptose (Scalcon et al., 2018). De même, une augmentation de GSH est observée dans les cellules malignes résistantes aux traitements dans des cellules de leucémie lymphoïde (Sarmiento-Ribeiro et al., 2012). Certains facteurs de transcription sensibles au stress oxydatif, comme NF κ B ou NRF2, sont d'ailleurs activés par les ROS et participent à la résistance aux traitements en favorisant les voies antioxydantes (Q. Cui et al., 2018).

Enfin, l'autophagie peut également protéger les cellules malignes de la mort induite par les chimiothérapies. Entre autres, il a été montré que l'inhibition pharmacologique de l'autophagie par le 3-méthyladénine sensibilise des cellules de CSTN à la doxorubicine (Aydinlik et al., 2017) et cellules cancéreuses de poumon au cisplatine et au paclitaxel (LIU et al., 2013).

Ainsi, les adaptations métaboliques des cellules malignes leur confèrent une plus forte résistance aux traitements. Bien que des voies communes sont retrouvées dans l'interaction entre adaptation métabolique et réponse aux traitements, des effets divergents peuvent être observés en fonction des cellules malignes et des traitements utilisés.

b) Régulation de l'apoptose par le métabolisme

Le métabolisme cellulaire module la réponse aux traitements principalement en régulant l'apoptose induite par ces traitements. En particulier, la disponibilité en nutriments régule l'apoptose via la régulation des niveaux et des interactions des protéines de la famille BCL-2 (**Figure 22**).

L'absence de glucose ainsi que l'utilisation du 2DG, inhibiteur de la première étape de la glycolyse, diminuent les niveaux de MCL-1 via l'inhibition de sa traduction par l'activation du senseur de stress AMPK et l'inhibition de mTOR dans différentes lignées cancéreuses (Pradelli et al., 2010). Coloff et al ont également montré que la déprivation en glucose diminue la synthèse protéique de MCL-1 (Coloff, Macintyre, et al., 2011a). Le métabolisme du glucose peut aussi augmenter les niveaux de MCL-1 en favorisant la phosphorylation inactivatrice de GSK3, prévenant ainsi la phosphorylation de MCL-1 et sa dégradation (Y. Zhao et al., 2007).

Cette inhibition de MCL-1 induite par une diminution du métabolisme du glucose favorise la sensibilité des cellules de lymphome à l'ABT-737 (Meynet et al., 2012). Le 2DG favorise également l'apoptose induite par l'ABT-737 via l'augmentation du pro-apoptotique BIM (Zagrodna et al., 2012). La protéine pro-apoptotique NOXA favorise également l'apoptose en condition déprivée en glucose ou en présence de 2DG, associée à une diminution de MCL-1 dans différents cancers (Alves et al., 2006; Ramírez-Peinado et al., 2011). De plus, l'ajout de pyruvate permet de contrer l'apoptose induite par la déprivation en glucose en supprimant l'induction de PUMA (Coloff, Mason, et al., 2011). PUMA est d'ailleurs augmenté en conditions limitées en glucose via l'induction de P53 dans des lignées cancéreuses et lymphocytes T (Y. Zhao et al., 2008). De plus, l'interaction à la mitochondrie de BAX et du transporteur mitochondrial de métabolites de petites tailles VDAC2 (voltage-dependent anion carrier 2) est essentielle pour la fonction pro-apoptotique de BAX dans des cellules murines (Chin et al., 2018).

Une étude montre qu'une voie précoce d'adaptation à la limitation en glucose impliquant PERK/AKT est mise en place avant d'être supplantée par la voie de mort cellulaire ERK2/p-EIF2 α /ATF4 et l'augmentation de BID lorsque la limitation en glucose est prolongée. Ces voies pro-apoptotiques peuvent être contrées par la supplémentation en glutamate et α -cétooglutarate (Shin et al., 2015). Des études décrivent la voie GCN2 (general-control non-repressible 2)/p-EIF2 α /ATF4 comme favorisant la mort cellulaire en condition pauvre en glucose (Shin et al., 2015) ou en glutamine (Qing et al., 2012), via l'augmentation des niveaux des protéines pro-apoptotiques telles que BID, PUMA ou NOXA. Au contraire, la voie GCN2/p-EIF2 α /ATF4 a aussi été décrite comme favorisant la survie des cellules malignes dans des conditions de privation en glucose ou en acides aminés non essentiels (J. Ye et al., 2010). La voie GCN2/ATF4 induite par ces conditions nutritives restreintes induit notamment la voie de biosynthèse des hexosamines, entraînant l'O-GlcNAcylation des protéines (Chaveroux et al., 2016), qui a été montrée comme favorisant la survie des cellules malignes (Ferrer et al., 2014; Z. Ma et al., 2013). Ainsi, il semble que l'impact du glucose sur les protéines pro/anti-apoptotiques via la réponse au stress du réticulum endoplasmique dépend des voies intermédiaires impliquées et du degré d'activation d'ATF4.

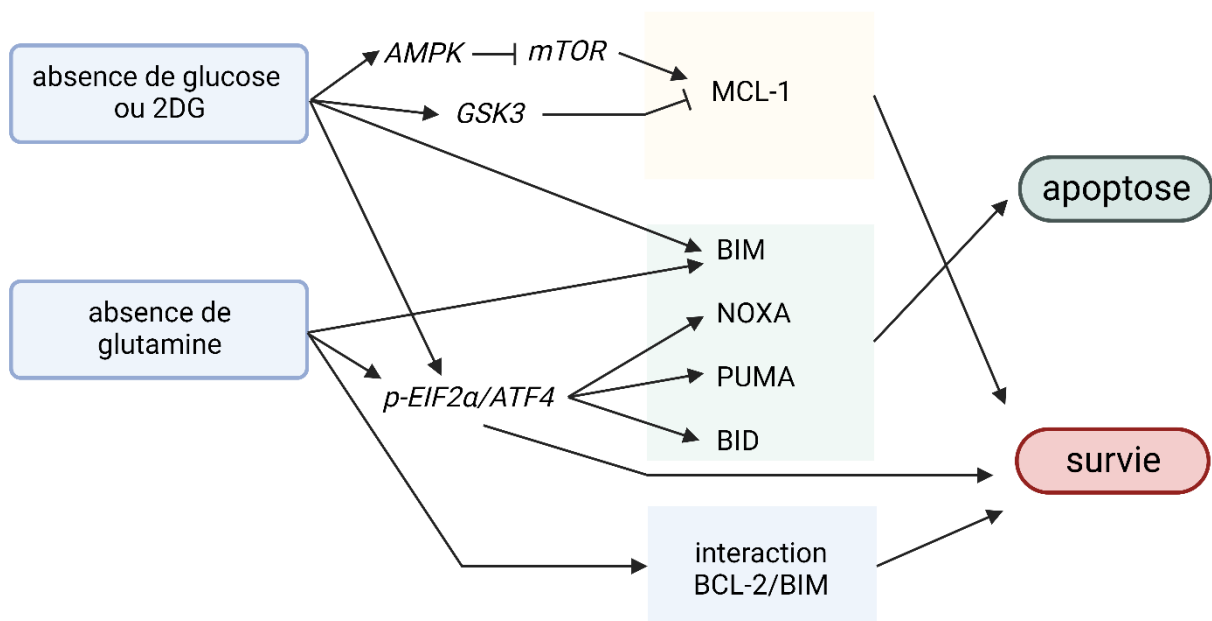


Figure 22 : Impact de l'absence de glucose ou de glutamine sur les membres de la famille BCL-2 et le devenir des cellules malignes

Une forte dépendance des cellules malignes à BCL-2, mesurée par la sensibilité au venetoclax, a été retrouvée dans des cellules de leucémie myéloïde aiguë (AML) présentant des mutations d'IDH1/2, via l'accumulation de l'oncométabolite 2HG qui inhibe le complexe IV de la chaîne respiratoire (Chan et al., 2015). Des criblages de perte de fonction de gènes par CRISPR-Cas9 ont aussi permis d'identifier que la diminution du fonctionnement de la chaîne respiratoire et plus largement la perturbation de

l'activité et de la dynamique mitochondriale augmentent la dépendance des cellules malignes d'AML à BCL-2 (X. Chen et al., 2019; K. H. Lin et al., 2019). L'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale par l'oligomycine ainsi que l'inhibition du senseur de stress nutritif AMPK permettent ainsi de limiter la résistance au venetoclax dans des lignées cellulaires de lymphome (Guièze et al., 2019). De plus, les inhibitions pharmacologiques de la glutaminolyse, de la carboxylation réductive ou encore de la lipogénèse ont été montrées comme favorisant la sensibilité à des BH3-mimétiques dans des lignées de cancers hématologiques résistantes à ces BH3-mimétiques (Al-Zabeeby et al., 2019). Enfin, des lignées de myélome multiple peuvent s'adapter à un manque de glutamine, malgré l'augmentation du pro-apoptotique BIM, grâce à l'augmentation de la liaison de BIM à BCL-2, résultant en une sensibilisation des cellules au venetoclax (inhibiteur de BCL-2) (Bajpai et al., 2016). Cette sensibilisation au venetoclax peut être contrée par ajout d' α -cétoglutarate.

Dans le cancer du sein, le ciblage pharmacologique de la synthèse d'acides gras par un inhibiteur de FASN (fatty acid synthase) augmente également la dépendance de cellules de lignées à BCL-2 puisqu'il augmente la sensibilité de ces cellules au venetoclax et au navitoclax (inhibiteur de BCL-xL/BCL-2) (Schroeder et al., 2021). De plus, Daniels et al ont montré parmi les 192 petites molécules inhibitrices du métabolisme testées que seuls les inhibiteurs de l'enzyme NAMPT (phosphoribosyltransférase nicotinamide) favorisent l'état « prêt-à-mourir » des cellules de lignée de CSTN et non des lignées non-cancéreuses. En particulier, l'étude révèle que l'inhibition de NAMPT abaisse la concentration de NAD⁺ en dessous d'un seuil critique qui résulte en l'épuisement en adénine, favorisant ainsi l'apoptose des cellules malignes en présence de BH3-mimétiques (Daniels et al., 2021). Ces résultats confirment l'interaction entre le métabolisme et l'apoptose mitochondriale dans les cellules malignes de cancer du sein.

Enfin, l'autophagie régule également l'apoptose négativement ou positivement en fonction du contexte (Rosenfeldt & Ryan, 2011). L'autophagie induite suite à des déprivations en nutriments ou en facteurs de croissance peut protéger les cellules malignes de l'apoptose (Boya et al., 2005; Lum et al., 2005). De façon plus générale, l'autophagie peut prévenir la mort cellulaire en diminuant certains régulateurs de l'apoptose comme la caspase 8 dans l'apoptose extrinsèque (Han et al., 2008) ou encore en séquestrant les mitochondries endommagées, limitant ainsi le relargage de cytochrome c dans le cytosol (Ravikumar et al., 2006). Il a été montré également que l'autophagie peut promouvoir la mort des cellules malignes de manière caspases-dépendante ou -indépendante (Denton et al., 2012).

Ainsi, les adaptations métaboliques des cellules malignes modulent les acteurs de l'apoptose et particulièrement les membres de la famille BCL-2. Nous avons vu que l'utilisation de certains

inhibiteurs du métabolisme peut ainsi favoriser la sensibilité des cellules malignes aux BH3-mimétiques.

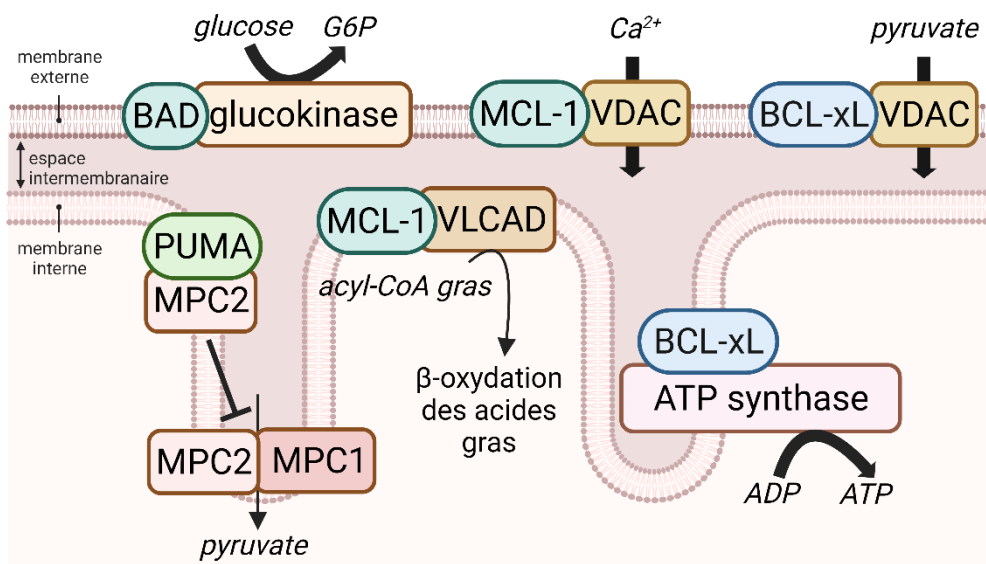
c) Régulation du métabolisme par les protéines de la famille BCL-2

A l'inverse, les protéines de la famille BCL-2 présentent des fonctions non-canoniques leur permettant de moduler le métabolisme cellulaire (**Figure 23**). Il a ainsi été montré que BCL-2 favorise la respiration mitochondriale dans les cellules malignes, résultant en un état pro-oxydatif dans des conditions basales (Z. X. Chen & Pervaiz, 2007). BCL-xL peut également moduler le métabolisme mitochondrial de neurones en stabilisant le potentiel de la membrane mitochondriale interne (Y. Chen et al., 2011). De plus, la surexpression de BCL-xL ou de BCL-2 induit une meilleure efficacité de la chaîne respiratoire, associée à une plus grande résistance à la privation en nutriments (Lucantoni, Salvucci, Düssmann, et al., 2021).

Les fonctions métaboliques des protéines de la famille BCL-2 semblent dépendre de leur localisation, qui régule leurs interactions avec des enzymes et transporteurs métaboliques (Nocquet et al., 2020, Revue en ANNEXES). Par exemple, l'interaction de MCL-1 avec VDAC augmente l'entrée mitochondriale d'ions calcium Ca^{2+} et la génération de ROS mitochondriaux dans des cellules malignes de poumon (H. Huang et al., 2014). L'interaction de BCL-xL avec VDAC a également des conséquences métaboliques en favorisant l'ouverture de VDAC et ainsi le passage de métabolites à travers la membrane mitochondriale externe dans des lignées de lymphocytes pro-B murins (Vander Heiden et al., 2001). L'interaction de BCL-xL avec VDAC1 a également été montrée dans des lignées de CSTN, favorisant la production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale, et contribuant ainsi à la migration cellulaire, indépendamment de l'activité anti-apoptotique de BCL-xL (Bessou et al., 2020). BCL-xL interagit de plus avec la sous-unité B de l'ATP-synthase F(1)F(0) dans des neurones, favorisant la production d'ATP (Alavian et al., 2011). De plus, la localisation matricielle de MCL-1 favorise la respiration de fibroblastes embryonnaires murins (Perciavalle et al., 2012). MCL-1 peut également interagir avec VLCAD (very long chain acyl-CoA dehydrogenase), une enzyme clé de la β -oxydation des acides gras (Escudero et al., 2018). Cette interaction se produit seulement lorsque MCL-1 est situé du côté matriciel mitochondrial et la liaison est réalisée via l'hélice BH3 de MCL-1. Cette étude indique que le domaine BH3 présente une dualité fonctionnelle anti-apoptotique et métabolique. En particulier, la perte de MCL-1 dans cette étude entraîne une activité anormalement élevée de la β -oxydation des acides gras. Au contraire, une autre étude indique que la perte de MCL-1 dans des cellules de leucémie lymphoblastique aiguë induit une diminution de la β -oxydation des acides gras indépendamment de sa fonction anti-apoptotique (Prew et al., 2022). Les cellules dépendantes de MCL-1 sont ainsi davantage sensibles à l'inhibition de la β -oxydation des acides gras.

Les protéines pro-apoptotiques peuvent également interagir avec des enzymes et transporteurs métaboliques. PUMA peut en effet se lier spécifiquement à la sous-unité MPC2 (transporteur mitochondrial de pyruvate 2), empêchant sa liaison avec MPC1 qui permet l'activité du transporteur MPC, et limite ainsi l'entrée de pyruvate dans la mitochondrie de cellules de cancer hépatique (J. Kim et al., 2019). Cette interaction limite donc l'alimentation du TCA par le pyruvate et augmente la glycolyse des cellules malignes. Elle nécessite la phosphorylation de PUMA par IκB mais ne semble pas empêcher la liaison de PUMA avec les anti-apoptotiques (D. R. Green, 2019).

Il a de plus été montré que la phosphorylation du pro-apoptotique BAD sur la sérine 155 favorise l'oxydation du glucose via une interaction à la mitochondrie avec une isoenzyme d'HK2, la glucokinase, qui catalyse la première étape de la glycolyse dans des hépatocytes (Danial et al., 2003). La surexpression de NOXA dans des cellules lymphocytaires augmente également la consommation de glucose, qui est davantage utilisé pour alimenter la voie des pentoses phosphates (Lowman et al., 2010). De plus, tBID peut inhiber CPT1 (carnitine palmitoyl-transferase-1), limitant ainsi le transport lipidique et la β-oxydation des acides gras dans la mitochondrie, résultant en l'accumulation de palmitoyl-CoA (Giordano et al., 2005), qui peut affecter l'intégrité mitochondriale et permettre la synthèse de céramide, un médiateur important de la mort cellulaire programmée (de Pablo et al., 1999; Listenberger et al., 2001; Pettus et al., 2002).



➡ mécanisme favorisé par l'interaction avec la protéine de la famille BCL-2
 ➔ mécanisme limité par l'interaction avec la protéine de la famille BCL-2

Figure 23 : Interaction des protéines de la famille BCL-2 et de transporteurs et enzymes mitochondriaux

Les protéines de la famille BCL-2 modulent également la dynamique mitochondriale, qui a été montrée comme régulatrice de la phosphorylation oxydative et de l'efficacité respiratoire des cellules (Cogliati et al., 2013; Yao et al., 2019). Il a été montré que BAX et BAK favorisent la fusion mitochondriale (Brooks et al., 2007; Karbowski et al., 2006). De plus, notre équipe a montré que l'inhibition pharmacologique de MCL-1 induit la fragmentation mitochondriale dans des fibroblastes associés au cancer, perturbant leur phénotype sans induire la mort cellulaire (Bonneaud et al., 2022, en ANNEXES). Une autre étude montre que le ciblage de MCL-1 induit la fission mitochondriale de cardiomyocytes, perturbant leurs capacités contractiles (Rasmussen et al., 2020). La perte de MCL-1 dans des neurones induit également des défauts de morphologie des mitochondries (Perciavalle et al., 2012). A l'inverse, la surexpression de BCL-xL et BCL-2 favorise la fusion mitochondriale dans des cellules mammaires (Lucantoni, Salvucci, Dussmann, et al., 2021). Une autre étude dans des neurones montre que BCL-xL augmente la biomasse mitochondriale et induit la fusion mais également la fission mitochondriales (Berman et al., 2009).

De plus, la surexpression de BCL-xL dans des lignées cellulaires entraîne la réduction des niveaux d'acétyl-Coa et de protéines N- α -acétylées de façon indépendante de BAX et BAK (Yi et al., 2011). La restauration des niveaux d'acétyl-CoA par ajout d'acétate ou de citrate restaure la N- α -acétylation dans ces cellules surexprimant BCL-xL et leur confère une plus forte sensibilité à l'apoptose induite par la doxorubicine.

Enfin, les protéines anti-apoptotiques de la famille (BCL-2, MCL-1 et BCL-xL) peuvent se lier directement à Beclin-1, qui joue un rôle majeur dans l'initiation de l'autophagie (Hardwick & Soane, 2013; C. He & Klionsky, 2009; Pattingre et al., 2005). La liaison de ces protéines anti-apoptotiques à Beclin-1 inhibe la formation de structures pre-autophagosomales et prévient ainsi l'autophagie. La diminution de MCL-1, induite notamment par une déprivation en glucose, peut atténuer son effet inhibiteur sur l'autophagie ou l'apoptose suivant l'expression de Beclin-1 ou BAX (Germain et al., 2011). De plus, Beclin-1 peut être déplacé des protéines anti-apoptotiques par les protéines BH3-only comme BID, PUMA, BAD et NOXA (Erlich et al., 2007; Maiuri et al., 2007). Ainsi, les niveaux de protéines de la famille BCL-2 modulent l'autophagie des cellules malignes et modulent donc leur adaptation à leur environnement et leur état métabolique.

Ces études mettent donc en avant l'existence de fonctions non-canoniques métaboliques des protéines de la famille BCL-2. En particulier, MCL-1, BCL-xL et BCL-2 présentent ainsi des fonctions pro-survie qui peuvent être indépendantes de leurs domaines BH3, et sont des acteurs clés dans le couplage entre sensibilité à l'apoptose et métabolisme.

IV- Vers une utilisation clinique d'inhibiteurs du métabolisme ?

Certains traitements utilisés chez les patients sont des antimétabolites, qui sont caractérisés par leur effet disruptif sur la biosynthèse des acides nucléiques (Kaye, 1998). Parmi ces antimétabolites, le 5-Fu et le methotrexate restent des chimiothérapies couramment utilisées pour traiter différents types de cancers (Harrison et al., 2018; M. Kato & Manabe, 2018; Ngoi et al., 2020). Cependant, les problèmes de cytotoxicité sur les tissus sains et de pharmacocinétique et dynamique limitent l'utilisation de traitements métaboliques en clinique. De plus, les phénomènes de résistance limitent l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs métaboliques (Gonçalves et al., 2021). Les spécificités et vulnérabilités métaboliques identifiées ont permis le développement de traitements déjà approuvés ou en phases d'essai clinique pour traiter les cancers. Ces traitements ciblent principalement la consommation de glucose, les voies glycolytiques, et les voies qui modulent le métabolisme des nucléotides, des acides aminés et de la synthèse des acides gras, ainsi que l'immunométabolisme (Gonçalves et al., 2021), et peuvent être utilisés dans différentes stratégies thérapeutiques.

L'ivosidenib et l'enasidenib, deux inhibiteurs de déshydrogénases, ont été approuvés dans le traitement des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë en rechute ayant respectivement une mutation des gènes IDH1 et IDH2 (DiNardo et al., 2018; Stein et al., 2019). Comme vu précédemment, la plasticité métabolique des cellules malignes leur permet de s'adapter aux conditions du microenvironnement et d'échapper aux stress induits par les traitements. Ainsi, le ciblage du métabolisme, en particulier le ciblage d'une seule voie métabolique, est complexe dans la majorité des cas. Certaines études suggèrent que le ciblage simultané de plusieurs voies métaboliques peut être une stratégie intéressante pour surmonter la plasticité métabolique des cellules malignes. Par exemple, la combinaison d'un inhibiteur de la lactate déshydrogénase avec un inhibiteur du complexe I mitochondrial (IACS-010759) améliore nettement la réponse anti-tumorale dans des modèles de cancer du pancréas *in vitro* et *in vivo* (Oshima et al., 2020), et la metformine, utilisée pour limiter la glycémie dans le diabète de type II, peut agir en synergie avec l'inhibiteur du transporteur de lactate MCT1 (AZD3965) dans des lignées de lymphome (Belouche-Babari et al., 2017). L'efficacité de la metformine sur les cellules cancéreuses est d'ailleurs plus élevée en absence de glucose ou en présence de 2DG dans des lignées de CSTN (Y. Li et al., 2023a; Samuel et al., 2023).

Comme nous l'avons vu précédemment, les inhibiteurs métaboliques peuvent moduler l'équilibre des membres de la famille BCL-2 favorisant leur sensibilité à des inducteurs de stress apoptotiques, suggérant que la combinaison d'inhibiteurs du métabolisme avec des BH3-mimétiques pourrait être une stratégie intéressante. En particulier, cette stratégie pourrait rendre les BH3-mimétiques efficaces

à des doses plus faibles et donc à des doses présentant moins d'effets secondaires pour les patients. Peu d'inhibiteurs spécifiques du métabolisme sont actuellement utilisables en clinique, et les efforts se portent ainsi sur l'utilisation de traitements déjà utilisés dans d'autres pathologies en combinaison avec des traitements anti-cancéreux. Les statines, qui limitent la synthèse de cholestérol ont notamment été montrées comme pouvant agir en synergie avec certaines chimiothérapies en augmentant la cytotoxicité et la teneur des cellules malignes en chimiothérapies (Ahmadi et al., 2018). En particulier, la simvastatine agit en synergie avec le venetoclax pour induire de l'apoptose dans des cellules de lymphome et de leucémie (J. S. Lee et al., 2018).

De plus, l'utilisation séquentielle d'inhibiteurs métaboliques avec d'autres traitements semble prometteuse. Cette stratégie prend en compte l'adaptation des cellules malignes à une première ligne de traitements, qui induit des vulnérabilités nouvelles. Des études montrent l'intérêt de bien penser la chronologie des traitements dans l'optique de l'utilisation d'inhibiteurs métaboliques (Gonçalves et al., 2021). Entre autres, dans une étude *in vivo*, le traitement séquentiel de chimiothérapies en première ligne et d'inhibiteur du métabolisme de la glutamine en seconde ligne limite nettement la chimiorésistance, contrairement à une combinaison simultanée des drogues (van Gastel et al., 2020).

Ainsi, les altérations du métabolisme et l'échappement à l'apoptose sont des caractéristiques des cellules cancéreuses. Le ciblage des dépendances métaboliques semble être une stratégie intéressante dans le développement thérapeutique. Cependant l'efficacité d'inhibiteurs métaboliques en monothérapie est limitée par diverses adaptations métaboliques. En revanche, les inhibiteurs métaboliques, qui modulent l'équilibre des membres de la famille BCL-2 favorisant l'état « prêt à mourir » des cellules malignes, pourraient agir en synergie avec les traitements actuels et les BH3-mimétiques.

Chapitre 4 : Les Fibroblastes Associés au Cancer (CAFs)

I- Caractéristiques des CAFs

a) Les fibroblastes

1- Description et origines

Les fibroblastes ont été décrits pour la première fois en 1858 par Rudolph Virchow comme des « cellules en fuseau du tissu conjonctif » (Virchow, 1858). Le terme « fibroblaste » a ensuite été proposé par Ernst Ziegler pour décrire une cellule qui produit du tissu conjonctif lors d'une blessure (Ziegler 1895). Les fibroblastes sont des cellules adhérentes, de morphologie allongée ou étoilée avec de nombreux prolongements cytoplasmiques (Kalluri, 2016). Ces cellules présentent un noyau de grande taille avec plusieurs nucléoles. Dans le tissu sain, les fibroblastes sont retrouvés généralement dans l'espace interstitiel, et peuvent également se situer près des capillaires, encastrés dans la matrice extracellulaire (MEC) fibrillaire de l'espace interstitiel (Kalluri, 2016). Les fibroblastes présentent un important réseau cytosquelettique, ce qui les distingue des cellules épithéliales. Dans le tissu sain, ils sont généralement considérés comme indolents, avec des activités métaboliques et transcriptomiques faibles (Kalluri, 2016).

Durant le développement embryonnaire, une partie des cellules du mésenchyme primaire (durant la gastrulation) se différencie en fibroblastes primaires, qui constituent les principaux prédécesseurs des fibroblastes matures des différents tissus durant le développement (LeBleu & Neilson, 2020) (**Figure 24**). Dans les tissus adultes, une grande proportion de fibroblastes résidents est issue du mésenchyme. Ces fibroblastes sont quiescents et jouent un rôle dans le maintien de la matrice extracellulaire et l'homéostasie structurelle (Gabbiani, 2003). Des cellules déjà différenciées, comme les cellules endothéliales, adipocytes et péricytes, partagent une origine mésodermique commune avec les fibroblastes et peuvent acquérir des caractéristiques mésenchymateuses en réponse à différents signaux (LeBleu & Neilson, 2020) (**Figure 24**). Elles peuvent même aboutir à l'apparition de cellules « fibroblast-like », comme les cellules endothéliales qui entrent en transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT) lors du développement cardiovasculaire (Kovacic et al., 2012). Les fibroblastes partagent également de grandes similarités de marqueurs et de fonctions avec les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) issues du mésoderme (Denu et al., 2016; T. E. Ichim et al., 2018).

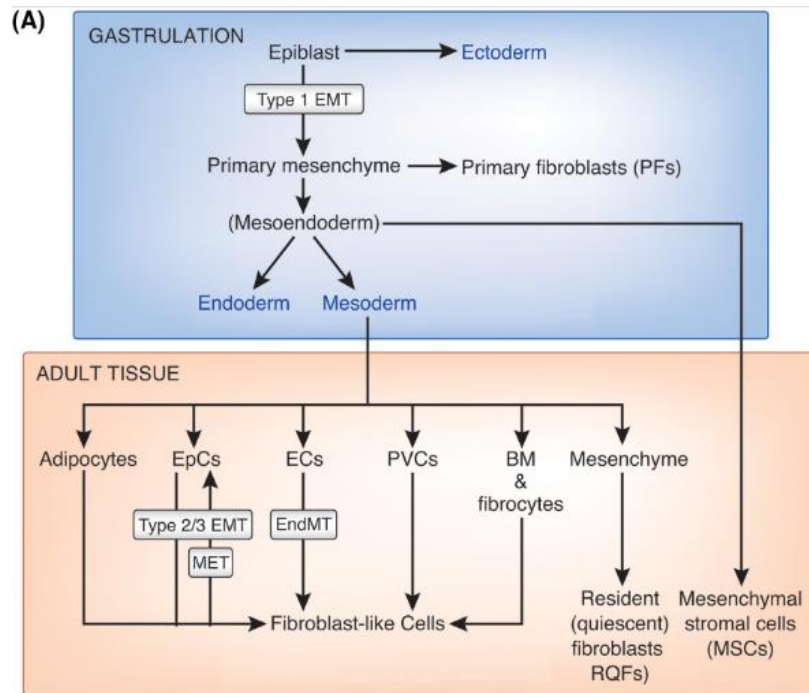


Figure 24 : Origines des fibroblastes

EpCs, cellules épithéliales, ECs, cellules endothéliales, PVCs, cellules prévasculaires, BM, moelle osseuse (LeBleu & Neilson, 2020)

Il n'existe pas de marqueur exclusif permettant de discriminer les fibroblastes des autres cellules (Sahai et al., 2020). C'est pourquoi les fibroblastes sont souvent identifiés par enrichissement de certains marqueurs, mais également par l'absence concomitante de marqueurs d'exclusion (LeBleu & Neilson, 2020) (**Figure 25**). Par exemple, la vimentine peut être utilisée pour discriminer les fibroblastes des cellules épithéliales qui ne l'expriment pas, mais est retrouvée dans d'autres cellules mésenchymateuses (Busch et al., 2017). FSP1 (Fibroblast-specific protein 1) a longtemps été décrite comme bon marqueur de fibroblastes (Kalluri & Zeisberg, 2006; Strutz et al., 1995), mais peut aussi être retrouvée dans des macrophages et des cellules épithéliales. Les marqueurs de surface et intracellulaires des fibroblastes les plus couramment utilisés sont : PDGFR α/β (platelet-derived growth factor receptor-alpha et -beta), podoplanine, cavéoline 1, DDR2 (discoidin domain receptor 2), FAP (fibroblast activation protein), FSP1, CD90 (Cluster of Differentiation 90) et α -SMA (alpha-smooth muscle actin) (LeBleu & Neilson, 2020). Parmi les marqueurs d'exclusion, nous pouvons citer le CD45 restreint aux cellules immunitaires, l'E-Cadherine et les cytokératines propres aux cellules épithéliales, ou encore NG2 (Neural/Glial antigen 2) caractéristique des péricytes (LeBleu & Neilson, 2020).

Il existe ainsi de nombreux marqueurs dissociatifs des fibroblastes et des autres types cellulaires. Il apparaît également que certains marqueurs de fibroblastes dépendent de l'organe et du tissu étudiés (Muhl et al., 2020), rendant l'établissement d'une liste exhaustive de marqueurs de fibroblastes

d'autant plus complexe. Par exemple, la desmine est un marqueur de fibroblastes de la peau, mais est fortement exprimée par des cellules musculaires dans d'autres organes (Lazarides & Baizer, 1978).

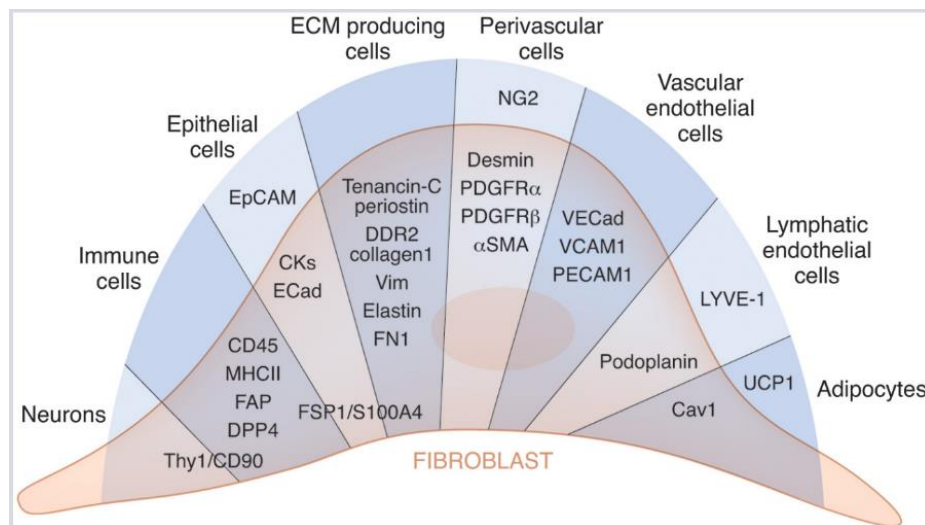


Figure 25 : Marqueurs d'inclusion et d'exclusion relatifs aux fibroblastes

En rose : les marqueurs d'inclusion des fibroblastes, en bleu : les marqueurs d'exclusion des fibroblastes. Les marqueurs d'inclusion des fibroblastes sont partagés avec d'autres types cellulaires, rendant l'identification des fibroblastes complexe. (LeBleu & Neilson, 2020)

2- Activation et fonctions des fibroblastes

Dans le développement normal et l'homéostasie, les fibroblastes sont les producteurs majeurs de la MEC des tissus conjonctifs. Ils sécrètent entre autres du collagène de type I, de la laminine et de la fibronectine (Kalluri, 2016). Ils deviennent actifs lors de dommages tissulaires et jouent alors un rôle essentiel dans la réparation tissulaire (Gabbiani, 2003).

Ces fibroblastes « activés » ont été observés pour la première fois dans des tissus en cours de cicatrisation et ont été nommés « myofibroblastes » en raison de leur morphologie et de leur phénotype contractile proche des cellules myoépithéliales. Ils acquièrent en effet un réseau de filaments composés essentiellement d' α -SMA (Gabbiani, 2003; Majno et al., 1971; Rockey et al., 2013). Ces myofibroblastes sont retrouvés dans les cas d'inflammation, de régénération de tissus et de fibroses.

Les fibroblastes sont recrutés et activés lors de la phase de prolifération et de réparation de la cicatrisation d'une lésion (Rajkumar et al., 2006; Steed, 1997). Les myofibroblastes sont essentiellement issus des fibroblastes résidents proches de la lésion (Grinnell, 1994; Higashiyama et al., 2011). Dans certains organes, d'autres types cellulaires peuvent être recrutés et devenir des myofibroblastes, comme les péricytes (Desmoulière et al., 2003; Rajkumar et al., 2005) ou encore les

fibrocytes (Abe et al., 2001). L'activation en myofibroblastes est permise par un enrichissement en TGF- β (transforming growth factor β) provenant des cellules présentes sur le site de la lésion. LE TGF- β induit l'activation d'une voie de signalisation SMAD dépendante qui induit l'expression d' α -SMA et de composants de la MEC (collagène, fibronectine, métalloprotéinases...). Le TGF- β active également d'autres voies indépendantes de SMAD comme les voies PI3K, RhoA/ROCK ou RAS/ERK qui favorisent la prolifération cellulaire et la sécrétion d'autres facteurs de la MEC (E. Cheng et al., 2012). Les myofibroblastes sont caractérisés par une activité contractile importante leur permettant de modifier l'architecture du tissu. Ils prolifèrent et présentent des activités métaboliques et transcriptionnelles accrues à l'origine d'une sécrétion élevée de facteurs leur conférant de nombreuses fonctions (Kalluri, 2016) (**Figure 26**).

Des études montrent que les fibroblastes activés peuvent influencer le comportement des cellules souches épithéliales locales (Brizzi et al., 2012; Le Guen et al., 2015). Ils peuvent également promouvoir l'angiogenèse via la production de VEGFA (vascular endothelial growth factor A) (Fukumura et al., 1998) et coordonnent le fonctionnement immunitaire via la production de chimiokines et cytokines (Buechler & Turley, 2018; Kraman et al., 2010; Philippeos et al., 2018). Ils permettent également la formation de conduits dans la MEC favorisant la migration des leucocytes à travers les ganglions lymphatiques (Rozenaal et al., 2008). Certaines fonctions ne sont pas réalisées par l'ensemble des fibroblastes mais par des sous-types particuliers. Des rôles propres aux organes où se situent les fibroblastes ont ainsi été décrits. Par exemple, les cellules étoilées, un type de fibroblastes retrouvés dans le foie et le pancréas, ont la capacité de stocker des gouttelettes lipidiques (Blaner et al., 2009).

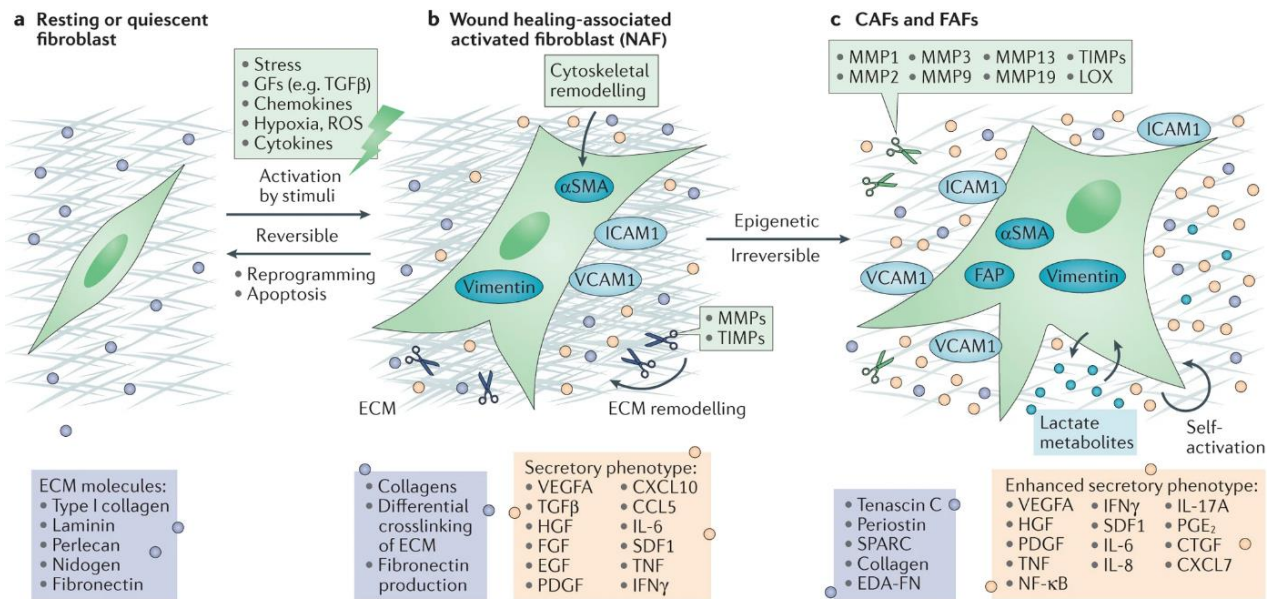


Figure 26 : Différentes étapes de l'activation du fibroblaste

a) fibroblaste résident quiescent b) fibroblaste normal activé (NAF, normal activated fibroblast) c) fibroblaste activé lors de la fibrose ou dans le cancer (CAF, cancer-associated fibroblast, FAF, fibrosis-associated fibroblast) (Kalluri, 2016)

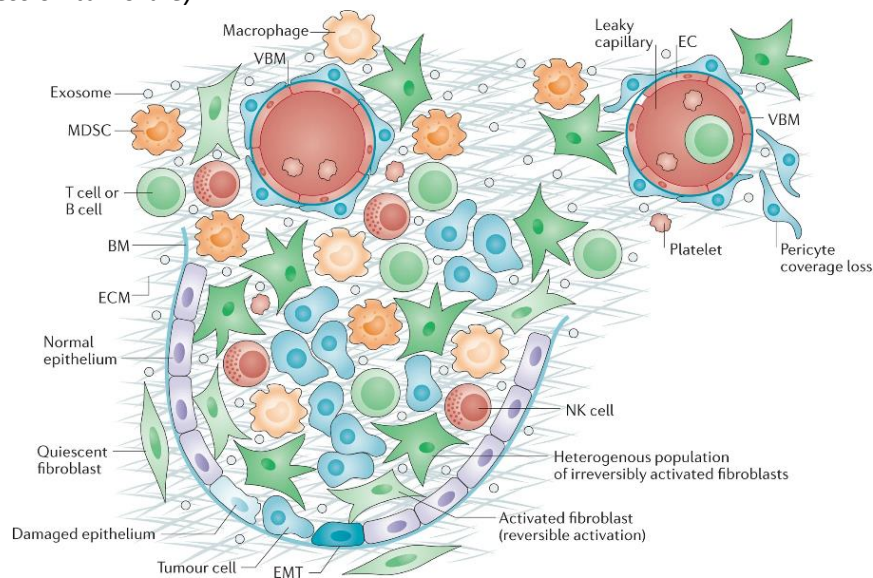
Les myofibroblastes ont un phénotype réversible. Ils peuvent en effet redevenir des fibroblastes quiescents au sein du tissu conjonctif à la fin de la cicatrisation. Les fibroblastes activés peuvent également dans certains contextes se différencier en d'autres cellules mésenchymateuses comme des chondrocytes, adipocytes ou cellules endothéliales, permettant de régénérer le tissu conjonctif (Kalluri, 2016). Dans la majorité des cas, les fibroblastes en surplus entrent dans un processus de mort pour être éliminés. Il est admis que cette mort est de nature apoptotique (Darby et al., 2014; Desmoulière et al., 1995). La dérégulation de l'apoptose des myofibroblastes entraîne des maladies telles que les fibroses, caractérisées par une forte production de MEC et une contraction importante du tissu environnant induisant un dysfonctionnement de celui-ci (Wynn & Ramalingam, 2012).

Dans les cancers solides, une contraction de l'organe touché est également observée. Dvorak définissait d'ailleurs les tumeurs comme «des blessures qui ne guérissent pas » (« Tumours : wounds that do not heal ») (Dvorak, 1986).

b) Les CAFs

Le microenvironnement tumoral ou stroma tumoral est l'environnement qui entoure, au sein de la tumeur, les cellules malignes, et qui comprend des vaisseaux sanguins, des cellules immunitaires, des fibroblastes, des molécules de signalisation et la MEC (Kalluri, 2016) (Figure 27). Les fibroblastes

associés au cancer (CAFs) sont des fibroblastes situés au sein du stroma tumoral qui ont un phénotype modifié proche de celui des fibroblastes associés à la cicatrisation (Durning et al., 1984; Ryan et al., 1973; Schor et al., 1988; Tsukada et al., 1987). Lors de l'analyse d'une biopsie, ils sont identifiés par une morphologie allongée, par l'absence de marqueurs de cellules épithéliales, endothéliales ou leucocytaires et mutations retrouvées dans les cellules cancéreuses, ainsi que par l'expression de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine (Sahai et al., 2020). Comme les fibroblastes normaux activés lors de la cicatrisation, les CAFs présentent une prolifération élevée, produisent de nombreux composants de la MEC et cytokines, et ont des capacités d'invasion considérables (Kalluri, 2016) (**Figure 26**). Les CAFs sont certainement les cellules du microenvironnement les plus efficaces dans le dépôt et le remodelage de la MEC. Il produit collagènes, fibronectine, ténascine, enzymes de réticulation matricielle et autres composants de la matrice extracellulaire, induisant ainsi des forces au sein de la tumeur, ce qui augmente considérablement la rigidité tumorale (Sahai et al., 2020). Le remodelage de la MEC par les CAFs est également permis par la production de différentes protéases matricielles (Tomasek et al., 2002). Via la MEC et d'autres modes d'échange, les CAFs interagissent étroitement avec les cellules malignes et les autres cellules du microenvironnement favorisant la tumorigénèse, la progression tumorale et la résistance aux thérapies (*Chapitre 4- II- Importance des CAFs dans la progression tumorale*).



Nature Reviews | Cancer

Figure 27 : La composition du microenvironnement tumoral

Les fibroblastes sont des composants majeurs du stroma tumoral. Le microenvironnement tumoral est constitué également d'une membrane basale (BM) et d'une matrice extracellulaire (ECM). Différents types cellulaires composent le microenvironnement : les cellules immunitaires comme les plaquettes, les cellules myéloïdes suppressives (MSDC), les macrophages, les natural killers (NK), les lymphocytes T ou B (T cell or B cell), les cellules endothéliales (EC) et les péricytes. EMT : transition épithélio-mésenchymateuse. (Kalluri, 2016)

Parmi différents marqueurs mésenchymateux, l' α -SMA a été longtemps utilisée comme un marqueur majeur des CAFs (Desmouliere et al., 2004). Cependant, d'autres types cellulaires peuvent exprimer cette protéine comme les péricytes ou les cardiomyocytes (Wendling et al., 2009) et il a été montré que tous les CAFs n'expriment pas cette protéine (Busch et al., 2017). D'autres marqueurs sont utilisés pour identifier ces fibroblastes activés, comme la FAP, la vimentine ou encore le PDGF α (Platelet-Derived Growth Factor). Comme pour les myofibroblastes de la cicatrisation, ces protéines ne sont pas retrouvées uniquement dans les CAFs et ne sont pas retrouvées dans tous les CAFs. Ainsi, il n'existe pas de définition moléculaire consensus des CAFs.

Contrairement aux fibroblastes de la cicatrisation, mais similairement à ceux de la fibrose, les fibroblastes de la tumeur gardent constamment un phénotype activé (Kalluri, 2016). Les CAFs se distinguent ainsi des fibroblastes associés à la cicatrisation par l'irréversibilité de leur activation dans la tumeur. Des études suggèrent que cette irréversibilité est guidée par des altérations épigénétiques (P. Li et al., 2015; Mrazek et al., 2014; Zeisberg & Zeisberg, 2013). Dans le cancer du sein, une étude montre en effet à partir de tumeurs de patientes que de nombreux loci génomiques sont différenciellement méthylés entre le stroma tumoral et les fibroblastes de tissu mammaire normal, suggérant l'implication d'altérations épigénétiques dans le phénotype des CAFs (M. Hu et al., 2005). Des travaux ont également montré l'importance des altérations épigénétiques dans le maintien du phénotype des CAFs dans des modèles de cancer du sein, du poumon et de la tête et du cou (Albregues et al., 2015). Dans cette étude, la cytokine pro-inflammatoire LIF (leukemia inhibitory factor) induit des modifications épigénétiques qui induisent l'activation constitutive de la voie JAK1 (Janus kinase 1)/STAT3, permettant le maintien du phénotype proinvasif des CAFs.

c) Activation des CAFs

Les MSCs peuvent être une source non négligeable de CAFs (Quante et al., 2011). Par exemple, des MSCs incubés avec du milieu conditionné de cellules cancéreuses acquièrent un phénotype semblable aux CAFs avec l'apparition de marqueurs comme CD90 et de fonctions pro-invasives et pro-survie sur les cellules cancéreuses (Borriello et al., 2017). Les cellules épithéliales peuvent être une autre source de CAFs. En effet, les cellules épithéliales non transformées peuvent subir une EMT et acquérir un phénotype fibroblastique dans la tumeur (Kalluri & Zeisberg, 2006). Les cellules endothéliales, via l'EndoMT, peuvent également acquérir des caractéristiques fibroblastiques comme l'expression d' α -SMA et de FSP1, et la perte du marqueur endothélial CD31. Cette transition est permise par différents facteurs comme le TGF- β (Zeisberg et al., 2007). Enfin, les adipocytes, les fibrocytes, les péricytes et

les cellules souches hématopoïétiques ont été décrits comme pouvant être d'autres sources de CAFs (Hosaka et al., 2016; Jotzu et al., 2010; McDonald et al., 2015).

Les fibroblastes résidents constituent la principale source de CAFs au sein de la tumeur (Allen & Louise Jones, 2011). Le processus d'activation du fibroblaste résident en CAF est appelé transition mésenchymo-mésenchymateuse (MMT, mesenchymal-mesenchymal transition) (Cirri & Chiarugi, 2011). Le recrutement et l'activation des fibroblastes est largement gouverné par les facteurs de croissances et cytokines sécrétés par les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires de la tumeur (Kalluri, 2016).

Comme pour l'activation des fibroblastes en myofibroblastes, la voie TGF- β /SMAD est une voie bien établie de l'activation des fibroblastes normaux en CAFs (Sahai et al., 2020). Le TGF- β est sécrété par les cellules malignes, mais également par les cellules du stroma. Les cellules malignes peuvent aussi sécréter l'activine A, un autre membre de la famille TGF- β , en réponse aux dommages de l'ADN, induisant alors l'activation du métabolisme et l'expression de l' α -SMA par les fibroblastes (Fordyce et al., 2012). Une fois activés, les CAFs peuvent produire eux-mêmes du TGF- β , ce qui leur permet de maintenir leur phénotype agressif. Il a été montré que le maintien de l'activation des CAFs est permis par une double boucle autocrine faisant intervenir les voies TGF- β /SMAD et également SDF1 (stromal cell-derived factor 1)/CXCR4 (C-X-C motif chemokine receptor 4) qui favorisent la sécrétion de TGF- β et SDF1 respectivement (Kojima et al., 2010). Ces voies se croisent puisque l'activation de SMAD favorise la transcription de SDF1, et la signalisation CXCR4 favorise également l'expression de TGF- β . Ces deux voies de signalisation se stimulent ainsi l'une et l'autre, favorisant le maintien du phénotype activé des CAFs, en particulier l'expression du marqueur α -SMA. Le Wnt7a sécrété par les cellules malignes agressives de cancer du sein est également impliqué dans l'activation des fibroblastes, indépendamment de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, en potentialisant la signalisation du récepteur TGF- β (Avgustinova et al., 2016). De plus, le facteur de croissance PDGF, fortement sécrété par les cellules malignes, favorise le recrutement des fibroblastes et leur prolifération dans les cancers du sein et du poumon (Z. M. Shao et al., 2000; Tejada et al., 2006), et le facteur de croissance HGF induit l'activation des fibroblastes normaux en CAFs dans le cancer gastrique (X. Wu et al., 2013).

Des études montrent également que les ROS dans la tumeur, sécrétés notamment par les cellules malignes, sont impliqués dans l'activation des fibroblastes et le maintien de certains marqueurs de CAFs (Costa et al., 2014). Une étude montre notamment que les ROS favorisent la conversion de fibroblastes en myofibroblastes hautement migratoires en induisant l'accumulation du facteur transcriptionnel HIF1 α et la sécrétion autocrine de SDF1 (Toullec et al., 2010).

Des changements physiques dans la MEC peuvent également induire l'activation des CAFs. Des études montrent en effet *in vitro* que l'élongation des fibroblastes, qui peut résulter de l'hyperprolifération des cellules épithéliales transformées et de la rigidification tissulaire, active SRF (Serum Responsive Factor) et YAP1 (Yes-Associated Protein 1)-TEAD (TEA Domain family member 1). Ces facteurs de transcription coopèrent pour induire l'expression de gènes associés aux CAFs (Ao et al., 2015; Calvo et al., 2013; Y. Cui et al., 2015; Foster et al., 2017). Les CAFs activés participent à leur tour à la rigidification tissulaire, favorisant l'activité des facteurs de transcription et donc le maintien des CAFs par une boucle d'auto-régulation positive (Calvo et al., 2013).

Ainsi, les cellules malignes, via la sécrétion de différents facteurs et la participation à un environnement propice, activent les fibroblastes résidents qui présentent alors des fonctions pro-tumorales. Il a été montré dans le cancer du pancréas que la granuline produite par les macrophages induit l'activation des cellules stellaires hépatiques en myofibroblastes, aboutissant à un environnement fibrotique propice à l'apparition de métastases hépatiques (Nielsen et al., 2016). D'autres facteurs peuvent induire l'activation des fibroblastes en CAFs, comme l'interleukine IL-1 β sécrétée par les cellules immunitaires, qui active la voie NF κ B dans les fibroblastes qui présentent alors un sécrétome protumoral (Erez et al., 2010). Ces résultats mettent en avant que des mécanismes d'activation des fibroblastes qui ne dépendent pas directement des cellules cancéreuses peuvent contribuer à l'émergence d'un environnement pro-tumorigénique, retrouvé dans des conditions inflammatoires, associées à des risques de cancer plus élevés (Sahai et al., 2020).

d) Hétérogénéité des CAFs

1- «Polarisation» des CAFs

Les CAFs sont principalement décrits comme ayant des fonctions pro-tumorales en stimulant l'initiation tumorale, la croissance et l'invasion des cellules malignes, la résistance aux traitements et en modulant l'immunité tumorale (Kalluri, 2016, effets que nous préciserons dans le *Chapitre 4- II. Importance des CAFs dans la progression tumorale*).

Cependant, certaines études indiquent que des populations de CAFs peuvent avoir une activité anti-tumorale. Ainsi, Augsten propose, par analogie avec d'autres types cellulaires comme les macrophages, le concept de « polarisation » des CAFs (Augsten, 2014). Quelques études montrent en effet que certaines molécules sécrétées par les CAFs ont des activités anti-tumorales. Des CAFs sécrétant le ligand SLIT2 peuvent en effet inhiber la tumorigenèse par liaison au récepteur ROBO1

(Roundabout Homolog 1), qui inhibe la voie PI3K/AKT et la translocation au noyau de la β -caténine, et ainsi bloque la prolifération des cellules malignes (P.-H. Chang et al., 2012). De plus, le Wnt3A sécrété par certains fibroblastes peut favoriser mais également inhiber la croissance des cellules malignes dans différents modèles de xénogreffes de tumeurs mammaires dérivées de patientes (J. L. Green et al., 2013). Les mécanismes régulant l'expression de ces protéines par les CAFs ne sont pas encore bien décrits.

Une étude *in vivo* de cancer du pancréas montre d'ailleurs que l'élimination des CAFs α -SMA+ au sein de la tumeur peut favoriser l'EMT et augmenter l'invasion des cellules malignes, avec pour conséquence une diminution de la survie des souris (Özdemir et al., 2014).

2- Hétérogénéité des marqueurs

Comme nous l'avons déjà évoqué, il existe de nombreux marqueurs de CAFs mais aucun n'est spécifique de la population fibroblastique. Tous les CAFs n'expriment d'ailleurs pas les mêmes marqueurs. Il semble donc attendu que les CAFs présentent des sous-populations sur la base d'expression de marqueurs différents, et présentent donc des fonctions variées.

En effet, Sugimoto et al mettent en avant l'hétérogénéité des populations de CAFs au sein d'une même tumeur *in vivo* dans des cancers du pancréas et du sein métastatique (Sugimoto et al., 2006). Dans cette étude, en immunofluorescence, parmi différents marqueurs fibroblastiques, une population exprime les marqueurs α -SMA, NG2 et PDGFR β alors que l'autre exprime seulement FSP1. Différents sous-types de CAFs ont également été identifiés à partir d'une analyse transcriptomique réalisée sur des cultures de CAFs issus de patients atteints de cancer du pancréas (Neuzillet et al., 2019). Dans cette étude, les sous-types de CAFs présentent des marqueurs fibroblastiques différents, et peuvent coexister au sein d'une même tumeur tout en présentant des fonctions différentes. Une analyse transcriptomique en cellules uniques à partir de cultures de CAFs de patientes de cancer du sein montre également que des populations de CAFs présentent des marqueurs fibroblastiques différents et des fonctions distinctes comme le remodelage de la MEC ou l'activité sécrétoire (Busch et al., 2017). Une autre étude transcriptomique en cellules uniques dans le cancer du sein a identifié à partir de CAFs issus directement de patientes quatre populations de fibroblastes appelées S1 à S4 sur la base de 6 marqueurs (CD29, FAP, FSP1, α -SMA, PDGFR β , CAV1_caveolin 1_) (Costa et al., 2018). En particulier, la sous-population S1 contribue à l'immunosuppression tumorale. Les cancers du sein CSTN sont enrichis en sous-populations S1 et S4 alors que les cancers du sein luminaux A sont enrichis en la population S2 (**Figure 28**). Les sous-populations S2 et S3 présentent des phénotypes moins activés que les sous-populations S1 et S4. Ces résultats indiquent ainsi que les populations de CAFs varient en proportion en fonction du sous-type de cancer du sein. Une autre étude montre de plus que les CAFs

issus de tumeurs mammaires HER2+ présentent une expression plus importante de gènes des voies associées au cytosquelette et aux intégrines que les CAFs issus des autres sous-types de cancers du sein (Tchou et al., 2012).

En lien avec cette hétérogénéité inter-tumorale, une pan-analyse de cancers humains de rein, vessie et mélanome métastatique identifie la présence de six mêmes populations de CAFs dans chaque type de cancer, mais ces populations sont différenciellement abondantes en fonction du type de cancer (Galbo et al., 2021).

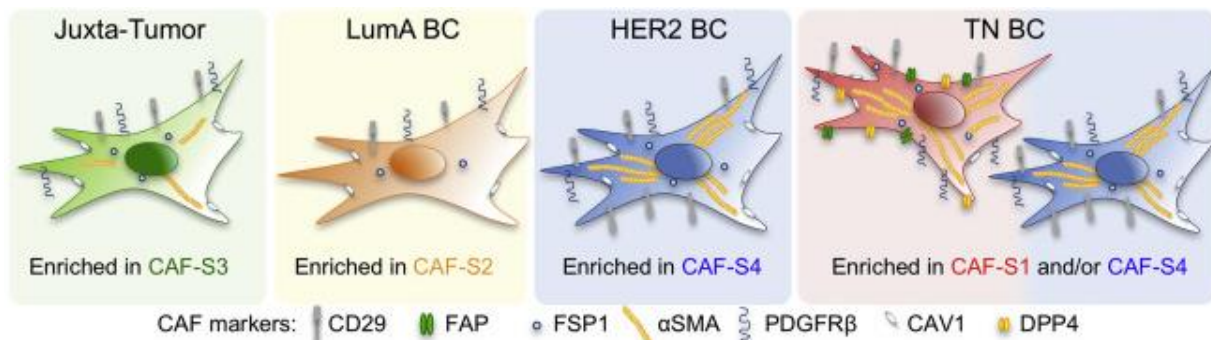


Figure 28 : Hétérogénéité des CAFs au sein des tumeurs mammaires

Quatre populations de CAFs sont identifiées sur la base de l'expression de six marqueurs. Ces populations sont plus ou moins enrichies dans la zone péri-tumorale et dans certains types de cancer du sein (Costa et al., 2018).

De plus, des études mettent en avant que le phénotype des CAFs peut varier en fonction de la proximité avec les cellules malignes. En effet, la sous-population S3 décrite par Costa et al est principalement retrouvée en périphérie des tumeurs (Costa et al., 2018). L'hétérogénéité spatiale des CAFs au sein d'une même tumeur est étayée par une étude identifiant deux populations de CAFs dans le mélanome dont l'une est principalement retrouvée au cœur du stroma alors que l'autre est retrouvée davantage en périphérie (Wietecha et al., 2023). Ces populations sont identifiées sur l'expression de marqueurs retrouvés habituellement lors des phases de cicatrisation précoces (dont le collagène) ou tardives (dont l'élastine). De plus, deux populations de CAFs ont été identifiées dans des modèles *in vivo* et chez les patients atteints de cancer pancréatique (Öhlund et al., 2017). La population myofibroblastique (myCAF) est caractérisée par l'expression d' α -SMA et par sa proximité avec les cellules malignes, tandis que la population inflammatoire (iCAF) présente une plus faible expression d' α -SMA, la sécrétion d'IL-6 et autres médiateurs inflammatoires, et est plus distante des cellules malignes. En particulier, cette étude suggère que le phénotype myCAF nécessite un contact direct avec les cellules malignes.

La coexistence de CAFs myofibroblastiques et inflammatoires au sein de la tumeur a été confirmée en transcriptomique en cellules uniques dans des tumeurs mammaires de patientes (Kieffer et al., 2020).

En effet, au sein même de la sous-population immunosuppressive S1 identifiée par Costa et al. (Costa et al., 2018), de nouvelles sous-populations ont été caractérisées suivant leurs profils myofibroblastiques (populations myCAFs) ou inflammatoires (populations iCAFs). En particulier, les myCAFs sont caractérisés par un profil d'expression de protéines de la MEC et de la signalisation TGF- β , et sont impliqués dans la résistance à l'immunothérapie.

Dans notre étude, la méthode d'extraction sur plastique et les conditions de culture mises en place nous permettent d'affirmer que nous cultivons des CAFs S1 principalement myCAFs d'après Kieffer et al. (Kieffer et al., 2020).

De plus, le phénotype des CAFs au sein d'une tumeur semble évoluer avec le temps. Une analyse transcriptomique en cellules uniques sur un modèle *in vivo* de cancer du sein à haut potentiel métastatique (modèle 4T1) montre en effet que les sous-populations de CAFs sont modifiées en proportion lors de la progression tumorale (Friedman et al., 2020). L'étude de Busch et al. suggère également une évolution des sous-populations de CAFs au cours du temps (Busch et al., 2017). Enfin, un enrichissement de la sous-population de CAFs S1 décrite par Costa et al. a été observée dans la tumeur primaire lors de la rechute à distance de cancer du sein luminal, confirmant l'évolution des sous-populations de CAFs lors de la progression tumorale (Bonneau et al., 2020). Pelon et al ont de plus montré une accumulation des populations S1 et S4 dans les ganglions lymphatiques métastatiques du cancer du sein, favorisant l'EMT et les capacités invasives des cellules malignes (Pelon et al., 2020).

Des études montrent également que les CAFs sont plastiques et peuvent évoluer d'un phénotype à un autre. Deux populations de CAFs ont été identifiées dans un modèle *in vivo* de cancer oral (OSCC, oral squamous cell carcinoma) (Costea et al., 2013). La première population est caractérisée par la synthèse d'acide hyaluronique qui aide au maintien d'un phénotype pro-invasif et motile des CAFs, tandis que la deuxième population sécrète drastiquement du TGF- β qui agit sur les capacités invasives des cellules malignes. En particulier, la stimulation des CAFs de la première population par le TGF- β induit un changement phénotypique qui les rapprochent de la deuxième sous-population. Cette étude suggère que la quantité de TGF disponible à proximité des fibroblastes, même ceux déjà activés, module leur évolution phénotypique, et est en faveur de l'existence d'un continuum d'états d'activation des CAFs. Les facteurs de croissance HGF et FGF (Fibroblast Growth Factor) présents dans le stroma modulent d'ailleurs l'activité du TGF- β et peuvent ainsi modifier le phénotype des CAFs (Denys et al., 2008; Mou et al., 2009). Biffi et al montrent également que l'interleukine IL-1 active des voies de signalisation responsables de la différenciation en iCAFs alors que le TGF- β antagonise ces mêmes voies de signalisation, favorisant le phénotype myCAF dans le pancréas (Biffi et al., 2019). En particulier, l'inhibition de la voie de signalisation JAK/STAT induit le changement phénotypique des iCAFs en myCAFs. L'étude d'Öhlund et al montre également que les iCAFs peuvent être convertis en myCAFs

lorsqu'ils sont placés en monocouche *in vitro* dans le cancer du pancréas (Öhlund et al., 2017). Notre équipe a également montré la réversibilité du phénotype myCAF puisque l'inhibition pharmacologique et l'extinction génique par CRISPR-Cas9 de la protéine MCL-1 dans des CAFs issus de patientes atteintes de cancer du sein suffit à atténuer les caractéristiques myofibroblastiques des CAFs, en modulant notamment l'organisation et la contractilité de l'actomyosine (Bonneaud et al., 2022, en ANNEXES).

Ainsi, les CAFs sont un ensemble de sous-populations avec des marqueurs et des fonctions variées. Cette grande hétérogénéité peut provenir de l'origine multiple des CAFs, mais également de l'ensemble des signaux extérieurs auxquels sont soumis les CAFs et qui évoluent au sein de la tumeur spatialement et temporellement. Les CAFs peuvent ainsi être considérés non plus comme un type cellulaire avec des marqueurs et des fonctions précises mais plutôt comme des états cellulaires activés évoluant en fonction de l'environnement.

II- Importance des CAFs dans la progression tumorale

Nous avons précédemment montré que les cellules malignes activent les fibroblastes environnants. Cette activation est en retour bénéfique aux cellules malignes, puisque les CAFs participent à la formation d'un environnement propice aux cellules malignes. Ils échangent activement avec les cellules malignes mais également avec les autres cellules stromales endothéliales et immunitaires.

a) Interactions avec les cellules malignes

1- Via des cytokines et facteurs de croissance

Les CAFs sécrètent de nombreux facteurs de croissances et cytokines qui favorisent l'initiation, la croissance et l'invasion tumorales, ainsi que les résistances aux traitements dans les cancers.

La chimiokine CCL2 (C-C Motif Chemokine Ligand 2) sécrétée par des CAFs issus de patientes atteintes de cancer du sein favorise la formation de sphères mammaires et le caractère souche des cellules de lignées de cancer du sein via l'induction de l'expression de NOTCH1 (Neurogenic locus notch homolog protein 1) dans les cellules malignes (Tsuyada et al., 2012). De même, la sécrétion du facteur de croissance IGF2 (insulin-like growth factor 2) par les CAFs favorise la tumorigenèse et les caractéristiques souches de cellules de lignées de cancer du poumon non à petites cellules (W.-J. Chen et al., 2014). Dans le cancer du foie, les CAFs peuvent également favoriser la tumorigenèse en sécrétant un autre facteur de croissance, HGF, qui augmente dans les cellules malignes les marqueurs de cellules initiatrices de tumeurs via la voie de signalisation c-MET/FRA1/HEY1 (Lau et al., 2016).

La sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance par les CAFs participe également aux effets pro-tumoraux des CAFs en favorisant la croissance tumorale. La sécrétion de la chimiokine SDF1 par les CAFs favorise en effet la prolifération cellulaire via l'activation du récepteur CXCR4 des cellules malignes dans le cancer du sein (Orimo et al., 2005) et de l'endomètre (Teng et al., 2016). Dans la dernière étude, le SDF1 sécrété par les CAFs induit les voies de croissance cellulaire PI3K/AKT et MAPK/ERK. La cytokine IL-6 est également capable d'induire ces voies de prolifération cellulaire (Heinrich et al., 2003), et il a en effet été montré que l'IL-6 sécrétée par les CAFs favorisent la prolifération des cellules de lignée de cancer du sein (Z. Guo et al., 2023; Osuala et al., 2015). Cette cytokine compte d'ailleurs parmi les plus étudiées dans le dialogue entre les CAFs et les cellules malignes (F. Wu et al., 2021). De plus, les facteurs de croissance FGF1 et FGF3 favorisent la prolifération de cellules de lignée de cancer du côlon, probablement via l'induction de la voie MEK/ERK (Bai et al., 2015). Le FGF1 sécrété par les CAF est également impliqué dans les effets prolifératifs des CAFs sur des cellules de cancer de l'ovaire (Y. Sun et al., 2017). Dans le cancer anal, la sécrétion d'IGF2 par les CAFs

augmente la prolifération des cellules malignes via la liaison au récepteur IGFR1 (Cacheux et al., 2019). Enfin, le facteur de croissance NODAL sécrété par les CAFs induit aussi la prolifération des cellules de cancer gastrique via l'activation de la voie SMAD2/3/AKT dans les cellules malignes (Pang et al., 2020).

L'IL-6 a été largement décrite comme médiatrice des effets pro-invasifs des CAFs. Cette interleukine participe notamment à l'induction de l'EMT des cellules malignes par les CAFs dans les cancers de l'œsophage, de la vessie, du foie, du poumon et de l'estomac (Ebbing et al., 2019; Goulet et al., 2019; Jia et al., 2020; Shintani et al., 2016; X. Wu et al., 2017). En particulier, ces études montrent que l'IL-6 sécrétée par les CAFs induit l'expression de marqueurs de l'EMT dans les lignées malignes et augmentent leurs capacités migratoires et invasives. Cet effet est souvent médié par l'activation de STAT3 qui augmente par exemple l'expression de la transglutaminase 2 (Jia et al., 2020) ou de l'ostéopontine (Qin et al., 2018) dans les cellules malignes. L'interleukine IL-17a est aussi impliquée dans les effets pro-invasifs des CAFs dans le cancer gastrique puisqu'elle augmente les capacités migratoires et invasives des cellules malignes, et l'expression de métalloprotéinases MMP2/9 (Matrix MetalloProteinases 2/9)(J. Zhang et al., 2020). Là encore, ces effets sont médiés par la phosphorylation de STAT3. Il a également été montré que les CAFs favorisent la migration et l'invasion de cellules de cancer du poumon via la sécrétion d'IL-22 (H. Li, Zhang, et al., 2019). Le SDF1 sécrété par les CAFs possède de même un effet pro-invasif sur les cellules cancéreuses (Jung et al., 2013; Teng et al., 2016; X. Zhu et al., 2019). En effet, Jung et al ont montré que la sécrétion de SDF1 par les CAFs induit des marqueurs de l'EMT dans des cellules malignes dans un modèle murin de cancer de la prostate (Jung et al., 2013), et Zhu et al ont précisé que l'effet pro-invasif de SDF1 est médié par l'axe ERK/AKT-TWIST1-MMP1/E-cadhérine dans des lignées de cancer de l'œsophage (X. Zhu et al., 2019). De plus, l'étude de Curtis et al suggère que les cytokines sécrétées par les CAFs (IL-6, IL-8 et SDF1) sont responsables de l'utilisation accrue de glycogène par les cellules malignes de l'ovaire, à l'origine de meilleures capacités migratoires et invasives (Curtis et al., 2019). Les effets pro-invasifs des CAFs peuvent aussi être médiés par la sécrétion de facteurs de croissance. Le TGF- β 1 sécrété par les CAFs augmente les capacités migratoires et invasives des cellules malignes de cancer du sein ainsi que l'expression de marqueurs de l'EMT (Y. Yu et al., 2014). Dans la vessie, Zhuang et al ont montré que l'effet pro-invasif du TGF- β 1 est médié au moins en partie par l'induction de l'ARN long non codant ZEB2NAT dans les cellules malignes (Zhuang et al., 2015). De plus, le facteur de croissance HGF produit par les CAFs augmente la migration des cellules malignes et leur adhésion aux cellules endothéliales via l'activation du récepteur MET qui induit l'expression de CD44 dans le côlon (R. Zhang et al., 2019).

Le soutien apporté par les CAFs aux cellules cancéreuses est également caractérisé par l'induction de résistances aux traitements. L'IL-6 sécrété par les CAFs favorise notamment la résistance au cisplatine de cellules de lignées de cancer du poumon (Shintani et al., 2016) et la résistance à la gemcitabine dans

le cancer du pancréas (Duluc et al., 2015). Notre équipe a également montré que les CAFs issus de cancer du sein favorisent la résistance à l'apoptose induite par l'ABT-737 (un inhibiteur de BCL-2/BCL-xL/BCL-w) via la sécrétion d'IL-6 qui active la voie ERK dans les cellules malignes luminales et conduit à la stabilisation de la protéine MCL-1 (Louault et al., 2019). Une autre interleukine, l'IL-11, est également responsable des effets protecteurs des CAFs contre le cisplatine dans le poumon via la phosphorylation de STAT3 qui induit l'expression des protéines anti-apoptotiques BCL-2 et survivine (Tao et al., 2016). L'implication de la phosphorylation de STAT3 dans les effets protecteurs des CAFs contre le cisplatine a également été montrée dans le cancer de l'ovaire, bien que les facteurs sécrétés par les CAFs responsables de ces effets n'ont pas été identifiés (Yan et al., 2016). De plus, l'IGF1 sécrété par les CAFs est responsable de leurs effets protecteurs contre le cisplatine dans la vessie via l'activation de la voie IGFR1/AKT/ER β /BCL-2 (Long et al., 2019). D'autres protéines sécrétées par les CAFs participent à la résistance à l'apoptose induite par des chimiothérapies. Par exemple, l'annexine A3 sécrétée par les CAFs induit la résistance de cellules cancéreuses de poumon contre le cisplatine via l'activation de JNK (L. Wang et al., 2019). Enfin, les CAFs peuvent limiter l'anoïkis des cellules malignes, c'est-à-dire l'apoptose induite par le détachement des cellules de la MEC, en sécrétant des IGFbps (Insulin-like growth factor-binding protein) qui inhibent GSK3 β , ce qui favorise la stabilisation de la protéine MCL-1 et ainsi protège les cellules cancéreuses de l'apoptose induite par le détachement des cellules (Weigel et al., 2014).

2- Via des nutriments

Nous avons vu précédemment que les adaptations métaboliques des cellules malignes jouent un rôle majeur dans la progression tumorale (Chapitre 3 – Le métabolisme dans les cancers). L'intérêt pour l'impact des CAFs sur le métabolisme des cellules malignes est apparu avec le modèle de l'effet Warburg inverse (Pavlidis et al., 2009a). Pavlidis et al ont proposé que les cellules cancéreuses induisent l'effet Warburg dans les fibroblastes environnants, qui sécrètent alors des produits de la glycolyse comme le lactate et le pyruvate. Les cellules malignes peuvent utiliser ces nutriments pour leur respiration et produire ainsi de l'énergie efficacement sous forme d'ATP, leur conférant de meilleures capacités de prolifération.

Ce modèle a été conforté par différentes études mettant en avant l'implication du lactate et du pyruvate sécrétés par les CAFs dans leurs effets pro-tumoraux dans les cancers de la prostate (Fiaschi et al., 2012; Ippolito et al., 2019), du sein (K. Sun et al., 2019a) et lymphomes (Sakamoto et al., 2019). Dans ces études, le lactate et le pyruvate apportés par les CAFs favorisent l'activité mitochondriale à travers une augmentation de l'activité du cycle de Krebs et de la respiration mitochondriale, et augmentent également la biosynthèse dans les cellules malignes. Ces modifications ont des effets

positifs sur la prolifération des cellules malignes (Fiaschi et al., 2012; Ippolito et al., 2019) ainsi que sur leurs capacités invasives (Ippolito et al., 2019; K. Sun et al., 2019a). Les reprogrammations métaboliques des cellules malignes induites par les CAFs peuvent aussi être médiées par l'apport d'acides aminés comme l'aspartate (Bertero et al., 2019), l'alanine (Sousa et al., 2016) et la glutamine (Yang et al., 2016). Dans ces études, les CAFs augmentent alors l'activité mitochondriale et la croissance tumorale. De telles modulations métaboliques sont particulièrement utiles dans des environnements pauvres en nutriments. Ces modulations induisent également la formation de ROS mitochondriaux (Fiaschi et al., 2012; Ippolito et al., 2019), ce qui pourrait participer à d'autres mécanismes de progression tumorale puisqu'une production soutenue de ROS peut favoriser la résistance aux traitements et les instabilités génétiques (Pelicano et al., 2004).

Une symbiose métabolique entre CAFs et cellules malignes peut alors s'établir puisque les cellules malignes ont été montrées comme étant nécessaires au phénotype métabolique des CAFs. En effet, Fiaschi et al ont montré qu'un contact avec les cellules malignes, qui induisent une diminution de la déacétylase SIRT3 (Sirtuin 3) mitochondriale des CAFs, est nécessaire à la production de lactate par les CAFs (Fiaschi et al., 2012). Des cellules malignes de carcinome épidermoïde buccal peuvent également reprogrammer métaboliquement des fibroblastes normaux en induisant des dysfonctionnements mitochondriaux comme l'accumulation de ROS, l'hypoxie et la mitophagie, associés à une augmentation de la glycolyse (D. Zhang et al., 2015). De même, un switch glycolytique des CAFs a été rapporté dans le cancer du sein sous l'influence des cellules malignes via la sécrétion de peroxyde d'hydrogène (Martinez-Outschoorn et al., 2011) ou d'intégrine ITGB4 (Integrin Subunit Beta 4) exosomale (Sung et al., 2020) qui induisent de l'autophagie et de la mitophagie dans les CAFs. La sécrétion d'alanine par les CAFs dans le pancréas dépend également de l'autophagie des CAFs qui est stimulée par les cellules malignes (Sousa et al., 2016). De même, la production de glutamine par les CAFs est stimulée par les cellules malignes ovariennes qui favorisent l'activité du cycle de Krebs dans les CAFs pour maintenir les niveaux de glutamate et citrate permettant la synthèse de glutamine (L. Yang et al., 2016). De plus, une étude sur les cancers de la tête et du cou montre que le dialogue métabolique établi entre les CAFs et les cellules malignes favorise la phosphorylation oxydative dans les CAFs et la glycolyse dans les cellules malignes via la sécrétion d'HGF par les CAFs et de bFGF par les cellules malignes (D. Kumar et al., 2018).

Les CAFs ont été caractérisés dans plusieurs études par l'effet Warburg avec une forte consommation de glucose et production de lactate, et une faible respiration mitochondriale (Fiaschi et al., 2012; Knudsen et al., 2016; K. Sun et al., 2019a; D. Zhang et al., 2015). Cependant, des études montrent que différentes sous-populations de CAFs peuvent présenter des phénotypes métaboliques différents. Lemons et al montrent en effet que des CAFs quiescents et proliférants présentent des métabolismes

différents (Lemons et al., 2010). Dans cette étude, les fibroblastes quiescents semblent métaboliquement actifs, et dépendent davantage de la voie des pentoses phosphates que les fibroblastes proliférants. De plus, ils présentent un taux de carboxylation réductive accrue dans le réapprovisionnement des intermédiaires du cycle de Krebs, ainsi qu'une dégradation des acides gras plus importante.

L'hétérogénéité métabolique des CAFs au sein même de la tumeur a été décrite par Givel et al qui montrent que la population de CAFs S4 a une expression accrue des gènes codant pour les protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale par rapport à la population S1 dans le cancer de l'ovaire (Givel et al., 2018). Les abondances différentielles des populations de CAFs en fonction du sous-type de cancer du sein suggèrent également que les interactions sont hétérogènes entre les types de cancer. En effet, Choi et al ont montré par marquages immunohistochimiques que les interactions métaboliques entre le stroma et les cellules cancéreuses semblent varier en fonction du sous type de cancer du sein chez les patientes (J. Choi et al., 2013). En particulier, par marquages histochimiques, il semble que les CSTN présentent un profil Warburg (cellules malignes glycolytiques et stroma plutôt non glycolytique) ou mixte, alors que les cancers du sein luminaux présentent un profil Warburg inversé (cellules malignes non glycolytiques et stroma glycolytique). L'hétérogénéité métabolique des CAFs est retrouvée par Xiao et al dans les cancers de la tête et du cou avec une population glycolytique et l'autre population reposant sur la phosphorylation oxydative (Z. Xiao et al., 2019).

Finalement, les CAFs peuvent exercer leurs effets protumoraux en induisant une reprogrammation métabolique dans les cellules malignes via notamment l'apport direct de nutriments qui dépend de leur propre métabolisme.

3- Via les protéines de la MEC

Les CAFs, via la production notamment de collagène de type I, fibronectine, laminine et MMPs, participent activement à la production et au remodelage de la MEC.

Les composants de la MEC sécrétés par les CAFs peuvent exercer diverses fonctions pro-tumorales. La périostine sécrétée par les CAFs favorise en effet la croissance tumorale dans une étude *in vitro* et *in vivo* de cancer gastrique (Kikuchi et al., 2014). De plus, une matrice de collagène de type I confère une résistance à l'apoptose induite par le 5-Fu dans des cellules malignes de pancréas en comparaison à un support plastique (Armstrong, 2004). De même, l'attachement de cellules malignes au collagène de type I, à la fibronectine ou à la lamine peut induire la résistance au paclitaxel de cellules de lignées de cancer du sein (Aoudjit & Vuori, 2001). Dans cette étude, l'intégration du signal est médiée par l'intégrine $\beta 1$ à la surface des cellules cancéreuses. Une étude montre notamment que la lamine induit

la phosphorylation de FAK (Focal Adhesion Kinase), molécule centrale dans la signalisation déclenchée par la liaison de la MEC avec les intégrines, et ce phénomène induit la résistance de cellules pancréatiques cancéreuses à la gemcitabine (Huanwen et al., 2009). Une autre étude montre également l'importance de l'activation de FAK, cette fois-ci dans les CAFs, pour la formation de pistes de matrices extracellulaires utilisées par les cellules malignes pour leur envahissement (Zaghdoudi et al., 2020). L'activation des signalisations AKT et MAPK dans les cellules malignes de poumon induite par la sécrétion de la protéine d'adhésion cellulaire VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) par les CAFs est elle aussi médiée par une intégrine, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (Z. Zhou, Zhou, et al., 2020). Cette intégration du signal a pour conséquence une augmentation de la prolifération et des capacités migratoires et invasives des cellules malignes. Il a été montré que les CAFs eux-mêmes peuvent induire l'expression de certaines intégrines par les cellules cancéreuses de poumon de façon paracrine (An et al., 2013). D'autres récepteurs membranaires peuvent intégrer les signaux de la MEC. Par exemple, dans le cancer de la vessie, les CAFs sécrètent MFAP1 (Microfibril Associated Protein 1), un composant des microfibrilles élastiques, qui active la voie NOTCH/HEY1 (Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1) en se liant au récepteur NOTCH2, favorisant là encore la prolifération et le potentiel invasif des cellules malignes (Z. Zhou, Cui, et al., 2020).

Les CAFs sécrètent de nombreuses enzymes protéolytiques extracellulaires comme les MMPs qui ont la capacité de cliver certains composants de la MEC, mais également de libérer le TGF- β et d'autres facteurs solubles tels que les cytokines (Karagiannis et al., 2012). Ainsi, les CAFs peuvent favoriser la biodisponibilité de certains facteurs solubles impliqués dans la progression tumorale décrits précédemment. De plus, certaines MMPs induisent directement des signaux protumoraux. Par exemple, MMP1, qui est sécrétée par les CAFs, favorise la migration des cellules malignes via le clivage du récepteur PAR1 (Proteinase-Activated Receptor 1) qui induit des signaux calciques intracellulaires (Boire et al., 2005). Une autre protéase de la MEC sécrétée par les CAFs, l'uPA (Urokinase plasminogen activator), favorise la prolifération, la migration et l'invasion des cellules malignes de l'œsophage via les voies de signalisation PI3K/AKT et ERK (Tian et al., 2017).

En produisant et réarrangeant la MEC, les CAFs participent également à la rigidité matricielle et modulent ainsi les forces exercées au contact des cellules malignes. Il a été montré que la rigidité matricielle participe à la tumorigenèse dans différents cancers (Jiang et al., 2022), et la rigidité matricielle peut atteindre 4 à 10kPa dans les tumeurs de cerveau, poumon, sein et pancréas alors que la pression dans les organes sains correspondants est habituellement inférieure à 100Pa (Piersma et al., 2020). Grasset et al ont montré que la rigidité matricielle induite par les CAFs favorise la migration et l'invasion des cellules malignes en induisant la voie de signalisation EGFR par méchanotransduction. Ce phénomène est accompagné de l'augmentation du transporteur membranaire de calcium Cav1.1

et de l'influx d'ions Ca^{2+} dans les cellules malignes, qui conduit à une augmentation de la contractilité de la myosine (Grasset et al., 2018). De plus, la rigidité matricielle coordonne les reprogrammations métaboliques entre CAFs et cellules malignes décrites précédemment (Bertero et al., 2019). Dans cette étude, la mécanotransduction dépendante de YAP-TAZ (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) permet la mise en place du dialogue métabolique entre CAFs et cellules malignes en condition de rigidité matricielle élevée. Enfin, en coculture, les CAFs peuvent produire des pistes matricielles migratoires facilitant la migration des cellules malignes. Ces pistes sont notamment composées de collagène, fibronectine et télescine C (Gaggioli et al., 2007).

4- Autres types d'interactions

Les CAFs exercent également leurs effets pro-tumoraux via la sécrétion d'exosomes. En particulier, les miARNs qu'ils contiennent participent activement aux effets des CAFs par leur capacité à réguler les niveaux de transcrits cibles au sein des cellules. Ces miARNs présents dans les exosomes des CAFs participent notamment à leurs effets protecteurs contre certains traitements. Par exemple, le miR-93-5p exosomal participe à la radio-résistance de cellules malignes colorectales (X. Chen et al., 2020), le miR-98-5p à la résistance au cisplatine dans le cancer de l'ovaire (H. Guo et al., 2019), et le miR-211 à la résistance au fulvestrant dans le cancer du sein luminal via l'activation de la voie NOTCH3 (Sansone, Savini, et al., 2017). De plus, il a été montré que le contenu en miARNs des exosomes de CAFs, contrôlé par l'expression de la protéine FAK, module les capacités invasives et prolifératives des cellules malignes receveuses (H.-J. Wu et al., 2020).

Les exosomes sécrétés par les CAFs peuvent également augmenter la capacité des cellules malignes à former des sphères et augmenter l'expression du marqueur souche CD133, ainsi que favoriser la radio-résistance dans le côlon (L. Liu et al., 2020).

Il a été montré que les CAFs peuvent apporter des métabolites via les exosomes qu'ils sécrètent (H. Zhao et al., 2016). Zhao et al montrent en particulier que les exosomes sécrétés par les CAFs contenant des métabolites variés favorisent la glycolyse aux dépens de la phosphorylation oxydative dans les cellules malignes de la prostate. De plus, Sansone et al ont montré que les exosomes des CAFs peuvent contenir de l'ADN mitochondrial, qui, assimilé par les cellules malignes de sein, limite la « dormance métabolique » (caractérisée par une faible activité de phosphorylation oxydative et un faible contenu en ADN mitochondrial) induite par le fulvestrant et favorise la résistance à ce même traitement (Sansone, Berishaj, et al., 2017).

De plus, des transferts de mitochondries intactes des CAFs vers les cellules malignes ont été rapportés dans le cancer de la prostate (Ippolito et al., 2019) et la leucémie aigüe lymphoblastique (Burt et al., 2019) via des ponts cellulaires appelés « nanotubes ». Le transfert horizontal de mitochondries fonctionnelles des CAFs aux cellules malignes augmente la masse et l'activité mitochondriales des

cellules malignes, favorisant leur respiration et leur motilité (Ippolito et al., 2019). Dans cette étude, les cellules pré-incubées avec des milieux conditionnés de CAFs sont plus enclines à recevoir les mitochondries, suggérant qu'une éducation préliminaire par les CAFs est nécessaire à ce genre d'interaction. Burt et al ont également montré que le transfert de mitochondries par des CAFs obtenus à partir de cellules mésenchymateuses sous cytarabine augmente la masse mitochondriale des cellules malignes et leur résistance à cette même chimiothérapie (Burt et al., 2019).

La compréhension des contacts directs entre CAFs et cellules malignes est plus difficile et fait l'objet de peu d'études. Un approfondissement est nécessaire pour identifier la nature même des contacts directs entre cellules malignes et CAFs et leur implication dans la progression tumorale. Nous savons pourtant que la proximité des cellules malignes avec les CAFs favorise le phénotype invasif des cellules (Marusyk et al., 2016), et que des contacts directs sont parfois nécessaires aux effets protecteurs des CAFs (Fiaschi et al., 2012).

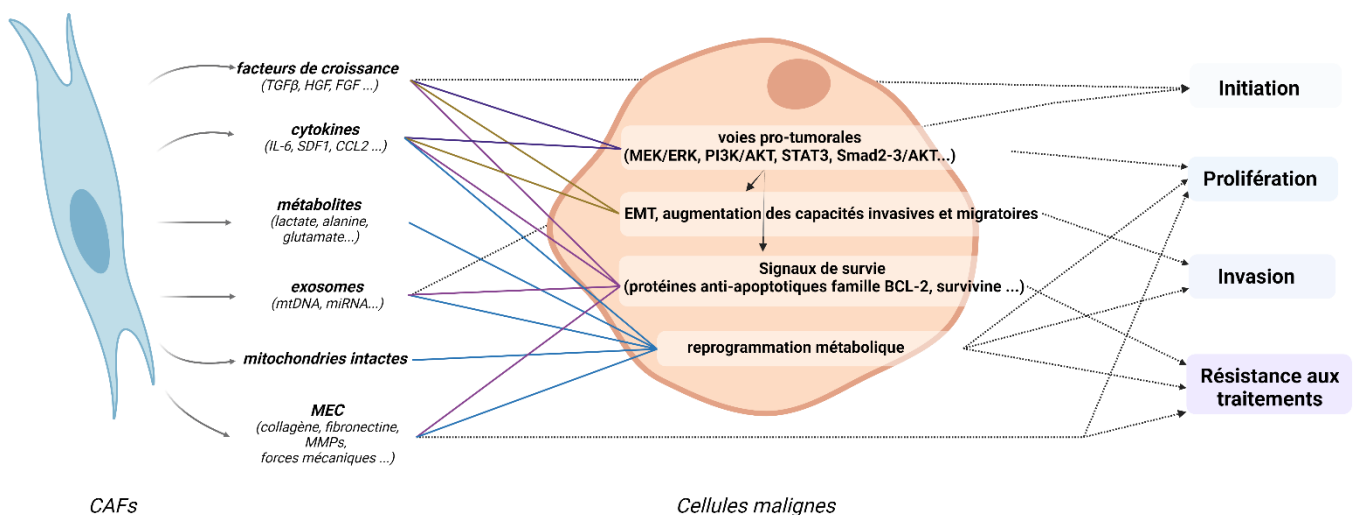


Figure 29 : Impact des CAFs sur les cellules malignes dans les cancers et implication dans la progression tumorale

Les CAFs, via la sécrétion de divers facteurs solubles comme des facteurs de croissance, des cytokines et des métabolites, mais également via la sécrétion d'exosomes et de composants de la matrice extracellulaire (MEC), modulent différentes voies de signalisation et le métabolisme des cellules malignes, participant à la progression tumorale et à la résistance aux traitements. EMT : transition épithélio-mésenchymateuse, MMPs : métalloprotéinases, miRNA : microARN, mtDNA : ADN mitochondrial

Ainsi, les CAFs échangent étroitement avec les cellules cancéreuses. Ils supportent les cellules cancéreuses en fournissant une niche et des éléments variés propices à l'initiation tumorale et à sa progression (**Figure 29**). Une caractérisation plus précise du dialogue entre CAFs et cellules

cancéreuses ouvre la voie à de nouvelles cibles thérapeutiques pour limiter la progression tumorale et la résistance aux traitements actuels.

b) Interactions avec les cellules endothéliales

La néo-angiogenèse est un mécanisme essentiel à la progression tumorale. Elle favorise l'apport de nutriments et autres éléments propices à la tumeur. Elle nécessite un remodelage de la MEC et implique cytokines et facteurs de croissance (Shiga et al., 2015). Dans un modèle murin de cancer de la peau, la présence de CAFs dans les tumeurs augmente la vascularisation, associée à une diminution de la nécrose au sein des tumeurs (Erez et al., 2010).

Il a été montré que les CAFs favorisent la néoangiogenèse en particulier via la sécrétion des facteurs angiogéniques SDF1 et VEGF. Les sécrétions de ces facteurs par les CAFs induisent en effet le recrutement de cellules endothéliales progénitrices (EPCs) dans le cancer du sein (De Francesco et al., 2013; Orimo et al., 2005). Dans un modèle murin de cancer mammaire, le SDF1 stromal, en plus d'induire le recrutement d'EPCs, favorise l'intravasation des cellules malignes en diminuant les jonctions serrées entre cellules endothéliales (Ahirwar et al., 2018).

La sécrétion de SDF1 et de VEGF par les CAFs est favorisée par l'accumulation d'HIF1 α dans ces CAFs, qui est induite par un environnement hypoxique (De Francesco et al., 2013; Hlatky et al., 1994). Ces études montrent ainsi que les CAFs permettent l'apport d'oxygène et de nutriments via la néoangiogenèse dans des environnements appauvris.

D'autres facteurs, comme CXCL14 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 14) et MMP9, sécrétés par les CAFs, favorisent également le recrutement d'EPCs dans des modèles de cancer du sein et de la prostate (Augsten et al., 2009; Heissig et al., 2002).

Les CAFs favorisent donc l'angiogenèse au sein de la tumeur via le recrutement des cellules endothéliales, favorisant l'apport de nutriments et de facteurs de croissance, et permettant ainsi la prolifération des cellules malignes et leur dissémination.

c) Interactions avec les cellules immunitaires

Le microenvironnement tumoral module également la réponse immunitaire. L'immunomodulation tumorale médiée par les CAFs facilite la tumorigenèse en induisant un environnement inflammatoire chronique pour les cellules cancéreuses, puis la progression tumorale en atténuant la réponse immunitaire anti-tumorale (Dvorak, 1986; Ziani et al., 2018). Parmi les facteurs sécrétés par les CAFs,

de nombreuses cytokines (IL-6, SDF1...), facteurs de croissance (TGF- β , VEGF...), hormones (prostaglandine PGE2), facteurs métaboliques (arginase 2...) et composants de la MEC (MMPs, collagène de type I) confèrent aux CAFs leurs effets modulateurs sur les réponses immunitaires innées et adaptatives (Ziani et al., 2018) (**Figure 30**).

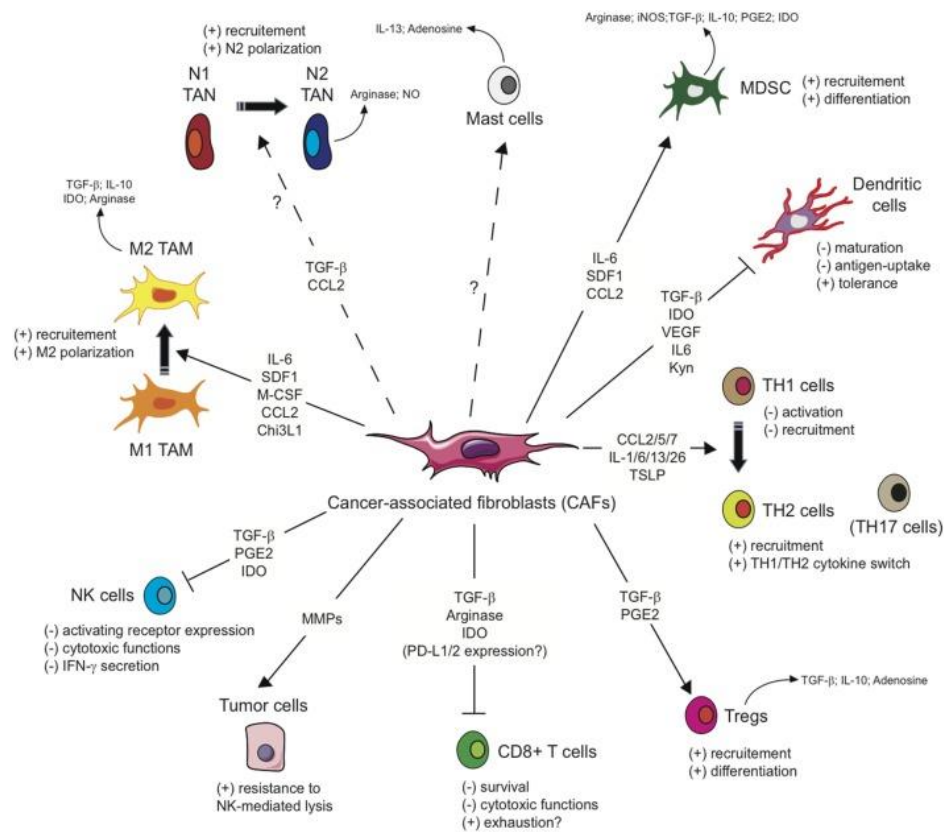


Figure 30 : Influence des CAFs sur les cellules immunitaires lors de la réponse immunitaire anti-tumorale

Les facteurs de croissance, cytokines et métabolites sécrétés par les CAFs modulent le recrutement, l'activation et la survie de nombreuses cellules immunitaires au sein de la tumeur. MDSC : myeloid-derived suppressor cell, NK : lymphocytes natural killers, TAM : macrophages associés à la tumeur, TAN : neutrophiles associés à la tumeur (Ziani et al., 2018)

Les CAFs, en sécrétant par exemple les facteurs IL-6, CCL2 et TGF- β , favorisent activement le recrutement de monocytes à la tumeur et leur différenciation en macrophages immunosuppresseurs (Chomarat et al., 2000; Takahashi et al., 2017; J. Zhang et al., 2011). Dans les cancers du sein, il a en particulier été montré que les CAFs recrutent les monocytes via la sécrétion de CXCL16 et CCL2 (Allaoui et al., 2016; Silzle et al., 2003). De plus, la sécrétion de CXCL1/2/5/6/8 et CCL2 par les CAFs pourrait être impliquée dans le recrutement des neutrophiles associés à la tumeur (Ziani et al., 2018), dont la présence est associée à un pronostic défavorable dans divers cancers (Ocana et al., 2017). Il a également été montré que les CAFs peuvent décroître l'expression de certains récepteurs activateurs

sur les lymphocytes NK (natural killer) dans différents cancers (Balsamo et al., 2009; T. Li et al., 2012, 2013). Ce phénomène est permis notamment par la sécrétion d'IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) et de PGE2 par les CAFs et aboutit à l'atténuation de l'activité cytotoxique des NK (diminution de l'expression de perforines et de granzyme B). Le TGF- β est lui aussi impliqué dans la diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK (Castriconi et al., 2003; Donatelli et al., 2014; Y. P. Park et al., 2011).

Les CAFs régulent également la réponse immunitaire adaptative. La déplétion *in vivo* de CAFs FAP+ dans un modèle murin de cancer du sein métastatique 4T1 diminue en effet le recrutement de macrophages et lymphocytes T régulateurs, mais augmente le recrutement des cellules dendritiques et des lymphocytes T cytotoxiques (Liao et al., 2009). Dans les cancers, les CAFs modulent en particulier le recrutement et la survie des lymphocytes T, ainsi que leur fonction présentatrice d'antigènes via la sécrétion de nombreux facteurs comme le TGF- β , l'IL-6, VEGF et SDF1 (Ziani 2018). Par exemple, le TGF- β inhibe la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8+ (Ahmadzadeh & Rosenberg, 2005; D. A. Thomas & Massagué, 2005), et promeut leur mort en inhibant l'expression de la protéine BCL-2 dans ces cellules (Sanjabi et al., 2009). Il a été montré que la sécrétion de SDF1 par les CAFs contribue à l'exclusion spatiale des lymphocytes T des régions contenant les cellules cancéreuses dans des cancers du poumon et du pancréas (Feig et al., 2013). Ce résultat est confirmé dans des études sur les cancers du sein et de l'ovaire montrant que la sécrétion de SDF1 par les CAFs S1 promeut un microenvironnement immunosuppresseur en favorisant l'attraction et la rétention de cellules T CD4+/CD25+ et leur différenciation en Tregs CD25+/FoxP3+ protumoraux (Costa et al., 2018; Givel et al., 2018). La sécrétion de facteurs métaboliques, comme l'IDO, l'arginase 2 et les galectines par les CAFs régule la prolifération, les fonctions et la survie des lymphocytes T (Ziani 2018). Il a été montré que le lactate sécrété par les CAFs glycolytiques module également la polarisation des lymphocytes CD4+ et induit un environnement immunosuppresseur en favorisant les lymphocytes Tregs, qui limitent les réponses immunitaires anti-tumorales, et en diminuant les lymphocytes helper pro-tumoraux Th1 (Comito et al., 2019). Une autre étude montre aussi que les CAFs promeuvent la réponse immunitaire des lymphocytes helper CD4+ pro-tumoraux aux dépens de la réponse immunitaire des lymphocytes helper CD4+ anti-tumoraux (Haniffa et al., 2007; Liao et al., 2009). Le TGF- β et PGE2 induisent également la différenciation et le fonctionnement des lymphocytes Tregs (Baratelli et al., 2005; W. Chen et al., 2003; Sharma et al., 2005). Enfin

De façon indirecte, les CAFs peuvent moduler la réponse immunitaire tumorale en modulant la composition et la rigidité de la MEC qui peut alors constituer une barrière physique, limitant ainsi l'infiltration lymphocytaire (Salmon et al., 2012). Au contraire, l'infiltration des macrophages associés à la tumeur est favorisée par la présence d'acide hyaluronique (N. Kobayashi et al., 2010) et la

concentration élevée de collagène (Acerbi et al., 2015), tous les deux largement sécrétés par les CAFs. La téna-scine de la MEC protège de la mort médiée par les lymphocytes T en limitant leur activation dans la prostate et le glioblastome (J.-Y. Huang et al., 2010; Jachetti et al., 2015). Ziani et al ont montré que des CAFs issus de mélanome diminuent indirectement l'activité cytotoxique des NK via la sécrétion de MMPs qui empêchent l'activité cytotoxique des NK en clivant certains récepteurs d'activation de NKs à la surface des cellules malignes (Ziani et al., 2017). Les MMPs régulent d'ailleurs largement l'inflammation au niveau de la tumeur en clivant et rendant actives diverses molécules présentes dans la MEC, modulant ainsi le chimiotactisme, l'activation, la différenciation et la survie des leucocytes (Sorokin, 2010).

Finalement, le rôle immunitaire propre à la population de CAFs S1 (Costa et al., 2018; Givel et al., 2018), et l'identification par Kieffer et al de différentes populations inflammatoires au sein de cette population (Kieffer et al., 2020) suggèrent une forte hétérogénéité dans la réponse immunitaire au sein même d'une tumeur.

Ainsi, les CAFs échangent ainsi avec les autres cellules de la tumeur, malignes ou non, pour contrôler le devenir tumoral, de la tumorigenèse à la dissémination des cellules malignes. Nous avons mis en avant dans cette partie l'hétérogénéité du dialogue entre les CAFs et les autres cellules au sein de la tumeur, et en particulier la diversité des échanges avec les cellules malignes. La nature du dialogue dépend des cellules malignes elles-mêmes, qui ont des caractéristiques particulières. En effet, en fonction du type ou du sous-type de cancer, les facteurs sécrétés par les CAFs n'ont pas le même impact. De plus, les interactions entre CAFs et cellules malignes sont hétérogènes au sein d'une même tumeur, ce qui appuie la complexité de la compréhension du dialogue entre les deux types cellulaires.

III- Vers un ciblage des CAFs ?

L'émergence de différentes sous-populations de CAFs et la compréhension de leurs rôles dans la progression tumorale et la résistance aux traitements permet d'envisager plusieurs stratégies afin de contrer les CAFs, et en particulier leurs effets pro-tumoraux.

Ainsi, une première stratégie consiste à éliminer les CAFs de la tumeur (**Figure 31**). En effet, de nombreuses études s'intéressent à cibler les CAFs exprimant la FAP à l'aide d'anticorps ou de lymphocytes CAR-T (X. Chen & Song, 2019). Par exemple, des études ont montré *in vivo* que les lymphocytes CAR-T ciblant les cellules FAP+ diminuent la croissance tumorale (Kakarla et al., 2013; Lo

et al., 2015), restaurant notamment une réponse immunitaire adaptative (H. Wang et al., 2014). Deux études cliniques de phase I semblent indiquer la bonne tolérance de cette méthode dans le mésothéliome pleural, sans évaluer l'efficacité de la méthode (Curioni et al., 2019; Hiltbrunner et al., 2021). L'utilisation d'un vaccin à ADN favorisant la mort des CAFs FAP+ par les lymphocytes CD8+ est encourageante *in vivo* en association avec d'autres thérapies (Duperret et al., 2018; Loeffler et al., 2006). Une étude clinique de type II montre en revanche une efficacité limitée d'anticorps anti-FAP dans le cancer colorectal métastatique (Hofheinz et al., 2003). D'autres marqueurs peuvent être ciblés, comme le GPR77, dont le ciblage par anticorps *in vivo* favorise également la mort des CAFs, en plus de celle des cellules cancéreuses, en combinaison avec le docétaxel (Su et al., 2018). Au contraire, le ciblage des populations de CAFs α -SMA+ ne semble pas bénéfique *in vivo*. En effet, le ciblage des cellules α -SMA+ entraîne une diminution de la survie des souris dans le cancer du pancréas, associée à l'augmentation de l'immunosuppression (McAndrews et al., 2022; Özdemir et al., 2014). Notons que ces travaux étudient le ciblage de l'ensemble des cellules α -SMA+ et non seulement des CAFs α -SMA+. De plus, des expériences de BH3-profiling montrent que les myofibroblastes activés sont davantage « prêts à mourir » que les fibroblastes quiescents, ce qui suggère une vulnérabilité intéressante pour éliminer les CAFs dans les tumeurs (Lagares et al., 2017). Dans cette étude, les myofibroblastes sont plus sensibles à l'inhibiteur de BCL-xL/BCL-2 Navitoclax que les fibroblastes quiescents. De même, Martens et al ont montré dans le cholangiocarcinome que le Navitoclax induit l'apoptose des CAFs mais pas des cellules malignes et des fibroblastes quiescents (Mertens et al., 2013). La même équipe a montré que le PDGF, qui favorise l'activation des fibroblastes, induit le priming apoptotique des CAFs, probablement en augmentant la liaison de BAK et BCL-2, expliquant ainsi la sensibilité des CAFs à l'ABT-199, inhibiteur de BCL-2 utilisé en clinique dans d'autres types de cancer (Rizvi et al., 2014). Ainsi, l'élimination des CAFs pourrait, en combinaison, améliorer l'efficacité des thérapies actuelles. Cependant, plusieurs risques sont associés à cette stratégie. En effet, l'élimination pas assez ciblées des CAFs présente les risques d'éliminer également les CAFs qui restreignent la progression tumorale. De plus, il y a un risque d'endommager les tissus sains en ciblant d'autres types cellulaires.

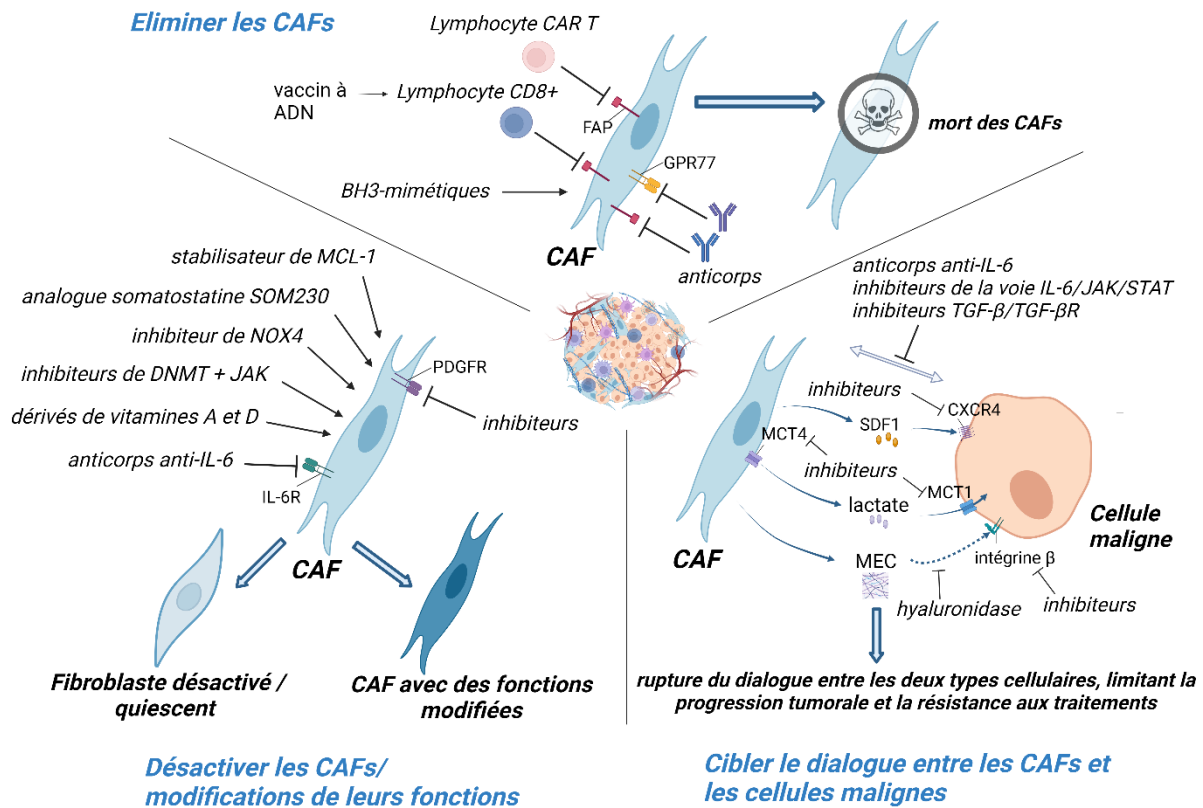


Figure 31 : Les différentes stratégies envisagées pour cibler les CAFs

Une première stratégie consiste à éliminer les CAFs via des vaccins à ADN, des anticorps spécifiques ou des BH3 mimétiques. La deuxième stratégie vise à désactiver les CAFs ou à modifier leurs fonctions, via différents inhibiteurs et anticorps. Enfin, une troisième stratégie s'intéresse davantage à limiter l'impact des CAFs sur les cellules malignes en rompant le dialogue entre les deux types cellulaires. MEC : matrice extracellulaire

Une autre stratégie est activement considérée, visant non plus à tuer les CAFs mais à les détourner de leur fonctionnement voire les « normaliser ». En effet, des études *in vivo* dans le pancréas montrent que l'inactivation des CAFs, induite par des reprogrammations métaboliques permises par l'apport de dérivés de vitamine A ou D, ralentit la progression tumorale et la chimiorésistance (Froeling et al., 2011; Sherman et al., 2014) (**Figure 31**). De même, des traitements anti-PDGFR comme le dasatinib, parviennent à réverser l'activation des CAFs issus de poumon (Haubeiss et al., 2010). La désactivation des CAFs sur la base de la perte d'expression de marqueurs et de fonctions est également montrée dans d'autres études, parmi lesquelles l'utilisation d'un inhibiteur de NOX4 (Sampson et al., 2018), ou encore l'utilisation combinée d'inhibiteurs de DNMT (DNA-méthyltransférase 1) et de JAK (Albregues et al., 2015). Des travaux montrent également que l'analogue de la somatostatine SOM230, en se liant

à son récepteur SST1 (Somatostatin Receptor 1) exprimé par les CAFs, diminue les fonctions pro-tumorales des CAFs dans le cancer du pancréas (Duluc et al., 2015; Moatassim-Billah et al., 2016; Samain et al., 2021). En particulier, ces travaux montrent que SOM230 diminue la synthèse protéique des CAFs en inhibant la voie mTORC1, résultant notamment en la diminution de la sécrétion d'IL-6 et de CSF-1, une chimiokine pro-métastatique et attractive des macrophages. Ces modulations fonctionnelles des CAFs entravent leurs effets protecteurs contre la chimiothérapie ainsi que leurs effets immunosuppresseurs et pro-métastatiques. Notre équipe a également montré dans le cancer du sein que l'inhibition de la protéine anti-apoptotique MCL-1 dans les CAFs induit un changement phénotypique des CAFs associé à une diminution de leur propriétés pro-invasives et pro-métastatiques (Bonneaud et al., 2022, en ANNEXES). Comme vu précédemment, le phénotype des CAFs peut passer d'un état actif à un autre (populations myCAF et iCAF, (Biffi et al., 2019; Öhlund et al., 2017)). Ce phénomène suggère un avantage supplémentaire au détournement phénotypique des CAFs si nous parvenons à transformer les CAFs pro-tumoraux en CAFs anti-tumoraux. Cependant, il révèle également le risque de détourner des fonctions pro-tumorales des CAFs vers d'autres fonctions pro-tumorales, rendant la stratégie de détournement inefficace.

Enfin, une stratégie étudiée pour surmonter les effets pro-tumoraux des CAFs consiste à cibler le dialogue entre CAFs et cellules malignes (**Figure 31**). Tout d'abord, les échanges réciproques des CAFs et cellules malignes en faveur de la tumeur peuvent être contrés par des inhibiteurs de TGF- β ou de ses récepteurs (C.-Y. Huang et al., 2021), et des anticorps anti-IL-6 (Sunami et al., 2021) ou des inhibiteurs de la voie IL-6/JAK/STAT3 (Hurwitz et al., 2015). Des inhibiteurs de la voie IL-6/JAK/STAT3 sont d'ailleurs déjà utilisés pour traiter certaines pathologies. De plus, la metformine, utilisée dans le diabète de type II, a montré son efficacité à rompre le dialogue entre CAFs et cellules malignes en inhibant la signalisation du TGF- β , empêchant ainsi l'activation des CAFs par les cellules malignes (S. Shao et al., 2020). De même, la metformine diminue la sécrétion d'IL-6 par les CAFs, sensibilisant ainsi les cellules malignes de l'ovaire au cisplatine (Xu et al., 2018).

Des stratégies sont envisagées pour contrer en particulier les signalisations enclenchées par les CAFs dans les cellules malignes. Par exemple, l'AMD3100, un inhibiteur spécifique de CXCR4, récepteur du SDF1 sécrété par les CAFs, pourrait être envisagé puisqu'il améliore l'immunothérapie dans le cancer du pancréas *in vivo* (Feig et al., 2013), et l'efficacité du cisplatine dans le cancer du col de l'utérus *in vivo* (Lecavalier-Barsoum et al., 2018). Cet inhibiteur est d'ailleurs déjà utilisé lors de transplantations osseuses dans certains lymphomes et myélomes (De Clercq, 2019). De plus, le métabolisme entre CAFs et cellules cancéreuses pourrait être rompu par des inhibiteurs de transporteurs de lactate (Doherty & Cleveland, 2013).

Afin de limiter l'effet des CAFs sur les cellules malignes via la MEC, l'inhibition des intégrines β exprimées par les cellules malignes peut constituer une stratégie intéressante. Des essais cliniques montrent en effet dans différents cancers une bonne tolérance et une amélioration de l'efficacité des thérapies avec des inhibiteurs d'intégrines β (Alday-Parejo et al., 2019; Besse et al., 2013).

De plus, les CAFs, en produisant et modulant la MEC, participent à la barrière stromale qui limite la biodisponibilité des traitements (Togo et al., 2013, p. 201). L'ajout de traitements induisant une déplétion d'acide hyaluronique en faveur de l'augmentation de la microvascularisation et d'une meilleure pénétration du traitement dans la tumeur a montré des résultats prometteurs en essai clinique de phase III dans le cancer du pancréas métastatique, sans pour autant montrer un réel bénéfice sur la survie globale des patients (Van Cutsem et al., 2020). De nombreux inhibiteurs des MMPs sont étudiés pour augmenter l'efficacité des traitements mais des études cliniques de phase III se sont révélées non concluantes, en lien avec la complexité de cette famille de protéines (Vandenbroucke & Libert, 2014).

Finalement, le ciblage des CAFs regroupe différentes stratégies afin de limiter les effets pro-tumoraux des CAFs. La stratégie ciblant spécifiquement le dialogue entre CAFs et cellules malignes semble être une stratégie particulièrement prometteuse puisqu'elle vise à rompre les effets des CAFs sur les cellules malignes sans induire de changement drastique sur les populations de CAFs qui pourrait aboutir à un stroma encore plus agressif. Une compréhension fine des mécanismes d'échanges entre CAFs et cellules cancéreuses est nécessaire afin d'envisager cette stratégie en combinaison avec les traitements actuels.

OBJECTIFS DU PROJET

Ainsi, le cancer du sein est une maladie hétérogène caractérisée par l'existence de sous-types sur la base d'expression des récepteurs aux hormones et de l'amplification du gène codant pour HER2. Les cancers du sein dits triple négatifs (CSTN) sont les cancers du sein présentant le moins bon pronostic. La résistance aux chimiothérapies est une des raisons principales de ce mauvais pronostic. Au sein même des tumeurs mammaires, une grande hétérogénéité a été décrite entre les cellules malignes, favorisant également l'échappement aux traitements.

Les agents chimiothérapeutiques visent à limiter la prolifération tumorale ou à induire la mort des cellules malignes, principalement sous forme d'apoptose. La résistance à l'apoptose est un frein majeur à l'efficacité des chimiothérapies. Elle repose principalement sur l'équilibre entre les protéines pro et anti-apoptotiques de la famille de protéines BCL-2. En particulier, les cellules malignes de CSTN expriment des niveaux de protéines anti-apoptotiques élevés, leur conférant un avantage pour leur survie. Pour contrer ces protéines au sein des tumeurs, des petites molécules, appelées BH3-mimétiques ont été développées. Malheureusement, dans les cancers du sein, l'utilisation de ces petites molécules est compromise par leur toxicité cardiaque ou plaquettaire aux doses efficaces pour sensibiliser la tumeur. Cependant, elles sont des outils intéressants pour étudier l'apoptose dans des modèles *in vitro*, et la compréhension des mécanismes de résistance à ces drogues pourrait permettre de les repositionner à des doses plus faibles.

De plus, le microenvironnement tumoral apporte un soutien crucial aux cellules malignes, leur permettant de résister davantage à l'apoptose induite par les chimiothérapies. Par exemple, des modulations métaboliques, induites en fonction du contexte nutritif ou sous l'impulsion de signaux provenant d'autres types cellulaires, permettent aux cellules malignes de s'adapter à leur environnement et de survivre à des stress apoptotiques. Les CAFs sont un élément majeur du stroma tumoral dans les cancers du sein, et peuvent interagir de manières variées avec les cellules malignes. Ils protègent les cellules cancéreuses des chimiothérapies en apportant nutriments, cytokines et facteurs de croissance. L'équipe a précédemment publié dans un contexte de cancer du sein luminal que les CAFs favorisent la résistance à l'apoptose en sécrétant l'interleukine IL-6, qui favorise la stabilisation de la protéine anti-apoptotique MCL-1 dans les cellules malignes. Dans cette étude, les mécanismes mis en avant dans le contexte luminal n'ont pas été retrouvés dans le contexte triple négatif.

Ainsi, les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 et les CAFs sont deux facteurs de résistance majeurs aux chimiothérapies dans le CSTN. *L'objectif de ma thèse a été de mieux comprendre l'influence des CAFs sur la sensibilité à l'apoptose des cellules malignes de CSTN dans le but de proposer des cibles thérapeutiques potentielles permettant de rompre le dialogue entre CAFs et cellules cancéreuses.*

Tout d'abord, ma thèse a visé à mieux comprendre l'implication des protéines anti-apoptotiques dans la résistance à une combinaison de chimiothérapies conventionnelles dans les cellules malignes et à étudier cette implication sous influence des CAFs. Nous montrons que les protéines anti-apoptotiques BCL-xL et MCL-1 sont des protéines majeures de la survie de base des cellules cancéreuses de CSTN et que BCL-xL joue un rôle crucial dans la résistance des cellules malignes à la chimiothérapie. De plus, nous mettons en évidence que les CAFs ont la capacité de protéger les cellules malignes de la chimiothérapie même lorsque BCL-xL est absent. Ces résultats soulignent l'importance de mieux comprendre le dialogue entre CAFs et cellules malignes dans un contexte de mort cellulaire induite par le ciblage de BCL-xL.

Ainsi, le deuxième objectif de ma thèse a été de décrypter la nature du dialogue entre les CAFs et les cellules malignes en présence d'ABT-737, un antagoniste de BCL-xL, BCL-2 et BCL-w qui induit l'apoptose des cellules malignes de CSTN. Dans cette étude, nous montrons que les milieux conditionnés de CAFs protègent les cellules malignes de l'inducteur d'apoptose en privant le milieu de glucose. Les cellules de CSTN étudiées sont en effet plus résistantes à l'apoptose en absence de glucose, et l'ajout de glucose sur les milieux conditionnés de CAFs suffit à réduire considérablement leurs effets protecteurs. De manière intéressante, ces résultats nous ont permis d'identifier la metformine comme une thérapie potentielle permettant d'éliminer l'effet protecteur des CAFs. De plus, nous montrons dans cette étude que la protéine MCL-1 est largement impliquée dans les effets protecteurs des CAFs.

Finalement, ces travaux confirment le rôle protecteur majeur des CAFs contre l'efficacité des traitements dans le CSTN et mettent en avant l'intérêt d'étudier le dialogue entre les deux types cellulaires afin d'identifier des vulnérabilités thérapeutiques et améliorer le pronostic des patientes.

RESULTATS

ARTICLE 1





**Cancer-associated fibroblasts mitigate the efficacy of
the combination of chemotherapy and BCL-xL targeting
in triple negative breast cancer cells**



New Results

 [Follow this preprint](#)

Cancer associated fibroblasts mitigate the efficacy of the combination of chemotherapy and BCL-xL targeting in triple negative breast cancer cells

 Lisa Nocquet, Julie Roul, Laurine Duarte,  Mario Campone,  Philippe P. Juin,  Frédérique Souazé

doi: <https://doi.org/10.1101/2023.09.26.559287>

Résumé de l'article 1

Dans cet article, nous nous intéressons particulièrement au CSTN. Dans ces cancers, les protéines anti-apoptotiques BCL-xL et/ou MCL-1 ont été retrouvées surexprimées dans différentes études par rapport au tissu normal et associées à la résistance aux traitements conventionnels (C. M. Goodwin et al., 2015; Olopade et al., 1997; Petrocca et al., 2013). Les BH3-mimétiques sont des outils précieux permettant l'étude approfondie des mécanismes apoptotiques reposant sur les protéines de la famille BCL-2 (Vogler, 2014). L'extinction génique des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 par Crispr-Cas9 permet également d'étudier les fonctions de ces protéines dans les cellules.

Les CAFs protègent les cellules malignes de l'apoptose en apportant des cytokines, facteurs de croissance et nutriments (Sahai et al., 2020). Ce dialogue favorise notamment les niveaux des protéines anti-apoptotiques et diminue ceux des protéines pro-apoptotiques (Nocquet et al., 2020, Revue en ANNEXES).

Le but de ce travail est de préciser les dépendances des cellules de CSTN aux protéines anti-apoptotiques pour leur survie, en particulier sous chimiothérapie conventionnelle, et d'évaluer l'influence des CAFs lorsque les freins à l'efficacité de la chimiothérapie sont outrepassés.

Dans notre étude, la combinaison de BH3-mimétiques et de l'extinction génique des protéines anti-apoptotiques a permis de mettre en avant que les lignées de CSTN MDA-MB-468 et MDA-MB-231 dépendent conjointement des protéines BCL-xL et MCL-1 pour leur survie basale. De plus, la résistance de ces cellules à une combinaison de chimiothérapies comprenant la doxorubicine, le cisplatine et le 5-fluorouracile est principalement médiée par la protéine BCL-xL. Nos résultats suggèrent également que l'expression de BCL-xL détermine la réponse de tumeurs dérivées de patientes naïves de traitement à la chimiothérapie. Enfin, dans un contexte plus intégré de coculture en 2 dimensions avec des CAFs issus de patientes, nous montrons que même lorsque le frein majeur BCL-xL est éliminé, les CAFs protègent nettement les cellules malignes de la chimiothérapie, confirmant le rôle protecteur du microenvironnement contre l'apoptose même massive des cellules malignes.

Ainsi, nos résultats confirment que les protéines BCL-xL et MCL-1 compensent leurs activités anti-apoptotiques permettant de promouvoir la survie des cellules malignes, et suggère en particulier que MCL-1 joue un rôle compensatoire plus important que BCL-xL dans les cellules étudiées. Lors d'un stress apoptotique induit par des chimiothérapies, la protéine BCL-xL est la protéine principalement impliquée dans la survie cellulaire. Le maintien de l'effet protecteur des CAFs dans un contexte d'apoptose massive, même lorsque les CAFs eux-mêmes sont sensibilisés, souligne l'importance

majeure de mieux comprendre le dialogue entre les CAFs et les cellules cancéreuses à l'origine de la résistance à l'apoptose. Une meilleure compréhension de ce dialogue vise à proposer des thérapies complémentaires afin d'améliorer les traitements actuels. En particulier, la compréhension du phénomène de résistance à l'apoptose induite par l'inhibition de BCL-xL sous l'influence des CAFs pourrait permettre de diminuer les doses de chimiothérapies ou de BH3-mimétiques nécessaires à l'induction de mort cellulaire dans les tumeurs mammaires.

Résumé graphique

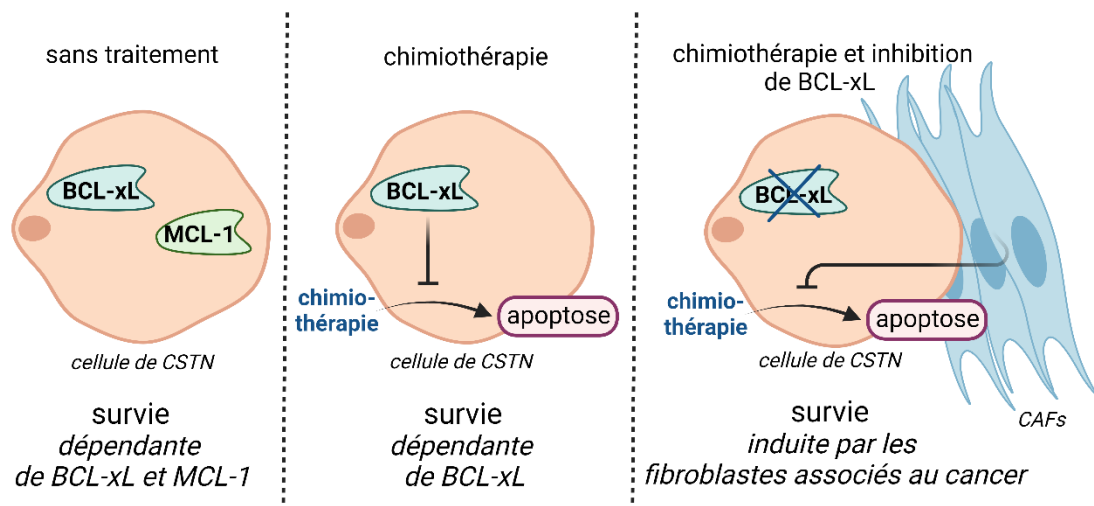


Figure 32 : Les fibroblastes associés au cancer limitent l'efficacité de la combinaison d'une chimiothérapie et du ciblage de BCL-xL sur des cellules malignes de cancer du sein triple négatif
CSTN : cancer du sein triple négatif, CAFs : fibroblastes associés au cancer

Cancer-associated fibroblasts mitigate the efficacy of the combination of chemotherapy and BCL-xL targeting in triple negative breast cancer cells

Lisa Nocquet^{1,2,3}, Julie Roul^{1,2,3,4}, Laurine Duarte^{1,2,3}, Mario Campone^{1,3,4}, Philippe P. Juin^{1,2,3,4} and Frédérique Souazé^{1,2,3}

1. Université de Nantes, INSERM, CNRS, CRCI²NA, F-44000 Nantes, France.
2. Equipe Labellisée LIGUE Contre le Cancer, Paris, France
3. SIRIC ILIAD, Nantes, Angers, France.
4. ICO René Gauducheau, Saint Herblain, France.

E-mail: frederique.souaze@univ-nantes.fr or philippe.juin@univ-nantes.fr

The authors declare no conflict of interest.

Key words: Apoptosis, Breast Cancer, Cancer-Associated Fibroblasts, BCL-2 family, Chemotherapy

ABSTRACT

Triple negative breast cancers (TNBC) present a poor prognosis primarily due to their resistance to chemotherapy. This resistance is associated with elevated expression of certain anti-apoptotic members within the proteins of the BCL-2 family (namely BCL-xL, MCL-1 and BCL-2), which regulate cell apoptosis by inhibiting the activation of pro-apoptotic proteins through binding and sequestration. BH3 mimetics, inhibitors of these anti-apoptotic proteins, have been developed to disrupt this interaction and induce apoptosis. Furthermore, within the tumor microenvironment, cancer-associated fibroblasts (CAFs) have been identified as key contributors to therapy resistance.

In this work, we aim to delineate the influence of BCL-xL, MCL-1, and BCL-2 on the sensitivity of TNBC cells to chemotherapy, while also considering the stromal microenvironment. By utilizing engineered cell lines deficient in BCL-2 family proteins and BH3 mimetics, we show that BCL-xL and MCL-1 promote the survival of two TNBC cell lines by compensatory mechanisms. Moreover, we observe limited chemotherapy effectiveness in both cell lines, confirming the clinical resistance observed in TNBC patients. We elucidate that BCL-xL plays a pivotal role in therapy response, as its depletion or pharmacological inhibition heightened chemotherapy effectiveness. Our findings strongly suggest that BCL-xL contribute to chemotherapy resistance in patient-derived tumoroids as well. In a co-culture model of MDA-MB-468 cells and CAFs, we observe that even in a context where BCL-xL inhibition renders cancer cells more susceptible to chemotherapy, those in contact with CAFs display reduced sensitivity to chemotherapy. This underscores the protective influence of CAFs on tumor cells,

emphasizing their profoundly pro-survival effect in breast cancer cells, even in a setting highly conducive to apoptosis through combined chemotherapy and BCL-xL inhibition.

INTRODUCTION

Triple negative breast cancer (TNBC), characterized by the lack of expression of hormonal receptors and the absence of Erb2 amplification, is associated with a poor prognosis due to its aggressive nature and the absence of effective targeted treatments. Consequently, TNBC patients are often limited to non-targeted chemotherapy, which may not be sufficient to eliminate cancer cells [1,2]. The limited effectiveness of therapy and the development of drug resistance in TNBC is in great part related to pathways regulating mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP). Many anticancer drugs commonly used in clinical practice rely on this mitochondria disrupting event to induce cancer cell death [3]. The BCL-2 family proteins play a crucial role in MOMP, which leads to the release of cytochrome c into the cytoplasm and the activation of a caspase cascade and subsequent cell death. Cancer cells can survive by altering the balance between anti-apoptotic and pro-apoptotic members of the BCL-2 family [4]. Numerous studies have demonstrated that elevated levels of prosurvival proteins, including BCL-xL, MCL-1, and BCL-2, are frequently observed in cancers and contribute to the tumor escape [5]. In TNBC, BCL-xL and MCL-1 are notably overexpressed compared to normal counterpart and have been associated with resistance to conventional cancer chemotherapies [6–8]. BH3 mimetics, a class of small compounds, antagonize binding of BCL-2 family anti-apoptotic proteins to pro-apoptotic proteins, creating an avenue to offset the excessive expression of these anti-apoptotic proteins [4]. These compounds present an opportunity to gain deeper insights into the exact mechanisms that contribute to chemoresistance. The effectiveness of BH3 mimetics depends on the expression and activity of pro-apoptotic BCL-2 family members and on the balance between the expression of the targeted anti-apoptotic proteins and non-targeted ones [9]. Pro-survival proteins can indeed compensate for each other by taking on released pro-apoptotic proteins induced by BH3 mimetics [4].

The cancer stroma plays a significant role in cancer cell resistance to therapy [10]. CAFs in the tumor microenvironment have been reported to promote resistance to therapy in cancer cells through direct contacts or the local release of soluble factors [11]. We previously showed that in luminal breast cancer, IL-6 secretion by CAFs mitigates the tumor BCL-2 dependency by inducing expression of cancer cell pro-survival protein MCL-1 [12].

In TNBC, identifying the specific pro-survival proteins involved in chemoresistance and investigating whether it is possible to sensitize cancer cells to chemotherapy when CAFs are present by targeting these factors is of particular interest to guide the development of therapeutic strategies.

In our study, we used BH3 mimetics and gene silencing techniques to demonstrate the simultaneous and compensatory involvement of MCL-1 and BCL-xL in the survival of TNBC cell lines. Furthermore, our findings highlighted the role of the anti-apoptotic protein BCL-xL in mediating resistance to chemotherapy in TNBC. In a co-culture model, we revealed that even when the pro-survival effect of BCL-xL is disrupted, CAFs are still capable of significantly protecting TNBC cells from the effects of chemotherapy. Therefore, our study underscores the need to develop strategies to target CAFs and their interactions with TNBC cells in order to improve the efficacy of chemotherapy in TNBC.

RESULTS

BCL-xL and MCL-1 are pivotal anti-apoptotic proteins responsible for the survival of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cell lines.

At first, we assessed the impact of various anti-apoptotic proteins from the BCL-2 family on the survival of two TNBC cell lines, MDA-MB-468 and MDA-MB-231. To achieve this, we generated silenced cells for MCL-1, BCL-xL, or BCL-2, designated as sg MCL-1, sg BCL-xL, and sg BCL-2, respectively, using a CRISPR-Cas9 based approach. Our findings reveal that MDA-MB-468 and MDA-MB-231 control lines express all three anti-apoptotic proteins, albeit with lower levels of BCL-2 in MDA-MB-468 (Figure 1A). Western blot analysis corroborated that MDA-MB-468 and MDA-MB-231 sg BCL-xL, sg MCL-1, and sg BCL-2 cells exhibit a deficiency in BCL-xL, MCL-1, and BCL-2, respectively (Figure 1A).

Subsequently, we investigated the effects of both loss and pharmacological inhibition of BCL-xL, MCL1, or BCL-2 on the survival of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 (Figure 1B). In control cell lines, only the pharmacological inhibition of BCL-xL using A1331852 resulted in cell death in MDA-MB-468 and MDAMB-231 (20% and 60% respectively). This outcome underscores the critical role of BCL-xL in the fundamental survival of these cells, particularly in MDA-MB-231. To explore potential compensatory mechanisms between anti-apoptotic agents when inhibiting only one of them, we employed BH3 mimetics in the different anti-apoptotic-deficient cell lines. Inhibition of BCL-xL with A1331852 in MCL1-deficient cell lines led to a substantial 90% cell death, suggesting that simultaneous targeting of both BCL-xL and MCL-1 is necessary to induce massive cell death. Conversely, pharmacological inhibition of MCL-1 by S63845 in BCL-xL-deficient cell lines resulted in a less pronounced cell death of only 40%-50%. Interestingly, the use of A1331852 in MDA-MB-231 sg BCL-xL cells caused an unexpected 35% cell death, possibly due to the expression of an unidentified target for this inhibitor in these cells. Inhibition of BCL-2 by ABT-199 in BCL-xL or MCL-1-deficient MDA-MB-468 cells did not induce cell death compared to their respective controls. Similarly, pharmacological inhibition of BCLxL or MCL-1 in MDA-MB-468 sg BCL-2 cells did not trigger cell death. Hence, BCL-2 does not play a

significant role in the survival of MDA-MB-468 cells, consistent with their low expression of BCL-2. Likewise, BCL-2 does not appear to have a significant impact on the survival of MDA-MB-231 cells albeit pharmacological inhibition of BCL-2 in MDA-MB-231 sg MCL-1 induced a moderate 30% cell death.

In conclusion, our results highlight that BCL-xL and MCL-1 play significant roles in promoting the survival of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cell lines. However, the inhibition of either BCL-xL or MCL1 alone is insufficient to initiate a massive apoptotic response in these studied cancer lines. The concomitant inhibition of BCL-xL and MCL-1 clearly increases cancer cells apoptosis, highlighting the presence of compensatory mechanisms between these two proteins.

BCL-xL significantly contributes to the resistance of the MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines to chemotherapy.

One standard of care for triple-negative breast cancers involves the combination of three chemotherapies: anthracycline (such as doxorubicin), alkylating agents (like cisplatin) and antimetabolites (e.g., 5-fluorouracil). Combination of doxorubicin, cisplatin and 5-fluorouracil resulted in the death of only 25-30% of the cell lines as depicted in Figure 2A. To identify the specific anti-apoptotic proteins responsible for impeding chemotherapy effectiveness in these cells, we employed CRISPRCas9 gene silencing and BH3 mimetics, as illustrated in Figure 2B and 2C. Combining chemotherapy with the silencing of BCL-xL significantly increased cancer cell death from less than 20% to 60-70% in both cell lines, while silencing MCL-1 or BCL-2 had no substantial impact on sensitivity to chemotherapy (Figure 2B). In accordance with this, combining chemotherapy with pharmacological inhibition of BCLxL resulted in nearly 100% cell death in both cell lines, whereas MCL-1 inhibition had no effect (Figure 2C). Contrary to BCL-2 silencing, the use of BH3 mimetics ABT-199 in combination with chemotherapy enhanced cell death to 60% in both cell lines, possibly due to an ABT-199 inhibitory effect on BCL-xL at the 1 μ M dose employed.

To confirm the apoptotic nature of cell death induced by chemotherapy and BCL-xL inhibitor, we employed a pan-caspase inhibitor (Q-VD-OPh), as shown in Figure 2D. In line with expectations, massive cell death induced by the combination of BH3 mimetics S63845 and A1331852 targeting MCL1 and BCL-xL respectively was entirely blocked by Q-VD-OPh. Cell death induced by chemotherapy alone or in combination with BCL-xL inhibitor was reversed by Q-VD-OPh. This observation corroborates that cell death induced by chemotherapy, either alone or in combination with BCL-xL inhibitor, is apoptotic in nature.

In conclusion, BCL-xL plays a critical role in limiting the effectiveness of chemotherapy in both the MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines.

BCL-xL expression affects patient-derived tumoroids responsiveness to chemotherapy.

To investigate the responsiveness of primary human breast cancer cells to chemotherapy we used 4 breast cancer organoid cultures (hereinafter called tumoroids). Tumoroids derived from treatment naive breast cancer samples were grown *ex vivo* using a stem cell culture method [13] that preserves mixtures of multiple tumor populations of flexible differentiation status [14,15] (see Figure 3A for microscopic analysis). We investigated the expression of BCL-xL and MCL-1 in tumoroids using Western blot analysis of bulk lysates (Figure 3B). Remarkably, we observed heterogeneity in the expression of MCL-1 and BCL-xL within the tumoroids. Tumoroid #1 displayed low levels of BCL-xL and moderate levels of MCL-1, while tumoroids #2 and #3 exhibited low levels of BCL-xL and high levels of MCL-1. Conversely, tumoroid #4 demonstrated high levels of BCL-xL and moderate levels of MCL-1. Subsequently, we assessed their response to chemotherapy via FACS analysis and identified variations in sensitivity among the tumoroids (Figure 3C). Notably, tumoroid #1 displayed greater sensitivity to chemotherapy compared to the other tumoroids, while tumoroids #2 and #3 showed intermediate sensitivity, possibly related to their high MCL-1 expression levels. In contrast, tumoroid #4, which expressed the highest level of BCL-xL, was the less sensitive tumoroid to high dose of chemotherapy. Therefore, we employed BH3 mimetic that targets BCL-xL in this tumoroid in combination with chemotherapy. Consistent with our prior findings in resistant cancer cell lines, combining chemotherapy with BH3 mimetic that targets BCL-xL effectively reversed the resistance of tumoroids (Figure 3D). These findings suggest that the presence of BCL-xL imposes limitations on the chemosensitivity of patient-derived breast tumoroids.

CAFs protect MDA-MB-468 cells from apoptosis triggered by simultaneous chemotherapy and BCLxL silencing.

Beyond their inherent resistance to chemotherapy, cancer cells survival may also be influenced by the surrounding tumor environment. Consequently, we explored how the presence of CAFs affects the susceptibility of MDA-MB-468 cells to apoptosis using a 2D coculture model. Our findings revealed that the presence of CAFs diminishes the apoptosis in MDA-MB-468 cells triggered by the combination of chemotherapeutic agents (Figure 4A). Simultaneously, the response of CAFs to chemotherapy was variable, with CAF mortality ranging from 20% to 60% under chemotherapy conditions, and notably, the presence of MDA-MB-468 cells did not affect the sensitivity of CAFs to chemotherapy (Figure 4B). Since inhibiting BCL-xL makes cells more responsive to chemotherapy, we sought to determine whether CAFs could also counteract cell death induced by chemotherapy when BCL-xL was silenced.

As illustrated in Figure 4C, our results demonstrate that the presence of CAFs reverses the cell death triggered by the combination of chemotherapy and BCL-xL silencing. It is worth noting that the survival rate of BCL-xL deficient cells treated with chemotherapy under the influence of stromal pressure closely resembled that of control cancer cells treated with chemotherapy in monoculture (Figure 4C). Concurrently, CAFs displayed variable responses to chemotherapy, and neither the presence of MDAMB-468 control cells nor MDA-MB-468 cells with BCL-xL silencing influenced the sensitivity of CAFs to chemotherapy (Figure 4D).

Hence, our findings emphasize that CAFs play a protective role against chemotherapy-induced apoptosis, even when the BCL-xL resistance factor is overcome in cancer cells.

DISCUSSION

In this study, we have demonstrated that triple-negative breast cancer cells depend on the presence of BCL-xL and MCL-1 for their survival, which aligns with prior research findings [16–18]. To elaborate further, we investigated the impact of targeting various anti-apoptotic members within the BCL-2 family, namely, BCL-xL, MCL-1, and BCL-2, using a combination of drugs and gene silencing through CRISPR-Cas9 techniques. Our results revealed that the most effective approach for inducing cell death involved simultaneous inhibition of both MCL-1 and BCL-xL. However, it's worth noting that the outcome varied depending on the method used to target MCL-1 or BCL-xL individually. When we inhibited MCL-1 using the compound S63845 in cells lacking BCL-xL, the level of cell death observed was relatively moderate compared to when we pharmacologically targeted BCL-xL in cells where MCL1 expression had been genetically removed. It has been previously described that the pro-apoptotic protein BIM shifts from one anti-apoptotic to the other to activate BAX and BAK and engage apoptosis [19]. So, this discrepancy in cell death outcomes could potentially be attributed to differences in the initial binding of the pro-apoptotic protein BIM to either BCL-xL or MCL-1. Our results suggest that a substantial portion of BCL-xL may already be engaged with BIM (or another pro-apoptotic effector), while MCL-1 appears to have a relatively lower binding, possibly being "unoccupied". This might be explained by the rapid turnover of MCL-1 protein due to its short half-life, and by the fact that its binding by pro-apoptotic effectors fosters its turnover [20]. Binding of BIM to MCL-1 increases under BCL-2 pharmacological inhibition in acute myeloid leukemia cells, thus emphasizing the ability of MCL1 to take over pro-apoptotics released by other anti-apoptotic proteins [21]. This would underlie the significant role of MCL-1 in promoting "compensatory survival", in response to an increase of free apoptotic effectors, for instance when BCL-xL is being targeted [17,22].

Currently, aggressive breast cancers, comprising both triple-negative and luminal B subtypes, are primarily managed using conventional chemotherapy regimens that involve a combination of anthracyclines, alkylating agents, and antimetabolites [23,24]. While combination therapies have improved treatment effectiveness in numerous instances, a subset of patients still exhibits resistance. To withstand chemotherapy, cancer cells employ various mechanisms, including inherent resistance to apoptosis governed by members of the BCL-2 family, as well as innate resistance factors like interactions with the extracellular matrix and the secretion of compounds into the tumor microenvironment [25]. We demonstrate here that BCL-xL plays a crucial role in conferring inherent resistance to chemotherapy in both cell lines and primary breast cancer cells cultured in tumoroids. This underscores the importance of targeting BCL-xL in breast cancer treatment, especially when used in combination with current therapies. While specific BH3 mimetics designed to target BCL-xL have been developed, they pose a challenge due to on-target platelet toxicity, as platelets rely on BCL-xL for their survival [26,27]. To address this issue, researchers have recently created PROTAC BCL-xL degraders, which recruit E3 ligases that are expressed at lower levels in human platelets compared to various cancer cell lines [28,29]. The approach of co-inhibiting BCL-xL alongside conventional therapies may offer a solution to counter the inherent resistance of cancer cells. However, our findings in MDA-MB-468 cells reveal that even when cancer cells become more responsive to chemotherapy due to BCL-xL inhibition, the presence of stromal CAFs nullifies this effect.

In a prior study, we elucidated that in cases of luminal breast cancer, CAFs possess the ability to diminish the sensitivity of cancer cells to apoptosis. This effect is primarily achieved by promoting the stabilization of MCL-1, mainly through the secretion of IL-6 [12]. The enhanced stabilization of MCL-1 makes these cancer cells more susceptible to MCL-1 targeting, a phenomenon previously observed in other models [21]. In our coculture model, it is possible that additional factors contribute to the resistance of cancer cells to BCL-xL inhibition induced by CAFs. CAFs have been shown to favor chemotherapy resistance in malignant cells via the secretion of growth factors, cytokines and matrix components, which modulate BCL-2 family proteins balance and also effectors of apoptosis downstream mitochondrial permeabilization such as survivin [30]. CAFs could also protect malignant cells from apoptosis by modulating the nutrient context, what has already been shown previously in some studies [30]. Additional investigation is required to determine the specific perturbations that CAFs induce in malignant cells within our model that might account for their protective effects.

In our study, CAFs protect BCL-xL deficient cancer cells against chemotherapy independently of their own sensitivity to treatments, which is heterogeneous. It has already been shown that the growth inhibition effect of conventional chemotherapy on CAFs from breast tumor patients is variable [31]. The maintenance of CAF protective effect despite their disappearance suggests that CAFs could acquire

an even more protective effect under chemotherapy. It has indeed already been shown that CAFs induce efficient chemoresistance in colorectal cancer-initiating cells when they are themselves exposed to the same conventional chemotherapy [32]. Our results suggest that the strategy consisting in interrupting the dialog between CAFs and cancer cells could be more suitable than simply eliminating CAFs. It thus appears of particular interest to decipher mechanisms underlying protection from apoptosis induced by CAFs in malignant cells.

Our findings collectively suggest that, even when successfully addressing the inherent chemotherapy resistance mediated by BCL-xL, cancer-associated fibroblasts (CAFs) in the tumor microenvironment will still contribute to the development of acquired chemotherapy resistance. This underscores the need for interventions to overcome this additional obstacle to maximize the effectiveness of therapy.

MATERIAL AND METHODS

Primary and cell lines culture

Fresh human mammary samples were obtained from treatment naive patients with breast carcinoma after surgical resection at the Institut de Cancérologie de l'Ouest, Nantes/Angers, France. Informed consent from enrolled patients was obtained as required by the French Committee for The Protection of Human Subjects, and Protocol was approved by Ministère de la Recherche (agreement n°: DC-20121598) and by local ethic committee (agreement n°: CB 2012/06).

To isolate CAFs from fresh samples, breast tissues were cut into small pieces in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% FBS, 2mM glutamine and 1% penicillin/streptomycin and placed in a plastic dish [12]. CAFs were isolated by their ability to adhere to plastic. After isolation, the fibroblasts were cultured in the same medium. Fibroblasts were used in the experiments before the ninth passage.

To isolate breast cancer cells from fresh samples, breast tissues were digested by collagenase (20 mg/ml) (Thermo Fisher) for 1h. Breast cancer tumoroids (50 000 cells in 120 μ L) were seeded in basement membrane extract (BME, BioTechne) in low adherence 24-well plates (Greiner) and cultured following the procedure previously described by Dekkers et al [33]. Briefly, Advanced DMEM/F12 was supplemented with penicillin/streptomycin, 10 mM HEPES, GlutaMAX (adDMEM/F12), 1X B27 (all Thermo Fisher), 1.25 mM *N*-acetyl-L-cysteine (Sigma-Aldrich), 10 mM nicotinamide (Sigma-Aldrich), 5 μ M Y-27632 (AbMole), 5 nM Heregulin β -1 (Peprotech), 500 nM A83-01 (Tocris), 5 ng/ml epidermal growth factor (Mytenyi), 20 ng/ml human fibroblast growth factor (FGF)-10 (Peprotech), Noggin

(Miltenyi), Rspodin-1 (Miltenyi), 0.1 mg/ml primocin (Thermo Fisher), 1 μ M SB202190 (SigmaAldrich) and 5 ng/ml FGF-7 (Peprotech).

The human breast cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-468 were purchased from American Type Culture Collection (Bethesda, MD, USA) and were cultured in DMEM supplemented with 5% FBS and 2mM glutamine.

For the CRISPR Cas9-induced BCL-xL, MCL-1 or BCL-2 gene extinction, single guide (sg) RNA targeting human BCL-xL, MCL-1 or BCL-2 were designed using the CRISPR design tool (<http://crispor.tefor.net>).

The following guide sequences were cloned in the lentiCRISPRV2 vector that was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid #52961): sg BCL-xL: 5'-GCAGACAGCCCCGCGGTGAA-3', sgMCL-1: 5'CTGGAGACCTTACGACGGGT-3' and sg BCL-2: 5'-GAGAACAGGGTACGATAACC-3'. Empty vector was used as control. After transduction, cells were selected using 1 μ g/ml puromycin and protein extinctions were confirmed by immunoblot analysis.

Treatments

Doxorubicin (Selleckhem #S1208), Cisplatin (Selleckhem #S1166) and 5-Fluorouracil (Selleckhem #S1209) were mixed at 2.5 μ M, 27.5 μ M and 55 μ M respectively to obtain chemotherapy treatment.

ABT-737 (Selleckhem #S1002), A1331852 (MedChemExpress #HY-19741), ABT-199 (ChimieTek #CT-A199), S63845 (ChemieTek #CT-S63845) and Q-VD-OPh (Sigma-Aldrich #SML0063) were used at indicated concentrations.

Coculture assays

Cell lines and primary CAFs co-culture was obtained by plating MDA-MB-468 with primary CAFs in monolayer with the ratio 1:3 in DMEM 10% FBS, 2mM glutamine and 1% penicillin/streptomycin. After 24h, the co-culture was maintained in DMEM 1% FBS, 2mM glutamine and 1% penicillin /streptomycin for additional 24h. Treatments were then added as indicated for 48h. Mono-cultures (MDA-MB-468 or CAFs) were performed in the same conditions as controls.

Apoptosis assay

Cell death was assessed using an Annexin-V FITC binding assay (Miltenyi #130-092-052) performed according to manufacturer's instructions. Flow-cytometry analysis was performed on Accuri C6 Plus

flow cytometer from BD Biosciences. For co-culture apoptosis assay, cell suspension was stained with FITC-conjugated human CD90 antibody (BD Biosciences #555595) prior to Annexin-V APC binding assay (BD Biosciences #550474) according to manufacturer's instructions.

Immunoblot analysis

Cells were resuspended in lysis buffer (RIPA, Thermo-Fisher #98901). After sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), proteins (20µg per condition) were transferred to a 0.45µM nitrocellulose membrane (Trans-Blot Turbo RTA Transfer kit nitrocellulose midi #1704271) using Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad #1704150, parameters: 25V, 1A, 30 minutes). The membrane was then blocked with 5% non-fat milk TBS 0.05% Tween 20 for 1h at room temperature and incubated with primary antibody overnight at 4°C. The used primary antibodies were: anti-BCL-xL (abcam #ab32370), anti-MCL-1 (Santa Cruz #sc-819), anti-BCL-2 (Dako #M0887) and anti-β-actin (EMD Millipore #MAB1501). The membrane was then incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibody (Jackson Immuno-Research Laboratories, Goat anti-Rabbit #111-035-006 or Goat anti-Mouse #115-035-006) for 1h at room temperature and visualization was made using the Fusion FX from Vilber (Eberhardzell, Deutschland).

Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) was used for statistical analysis for overall condition effects with GraphPad Prism 10.2 Software. All data are presented as mean +/- SD of at least three independent experiments.

FIGURES

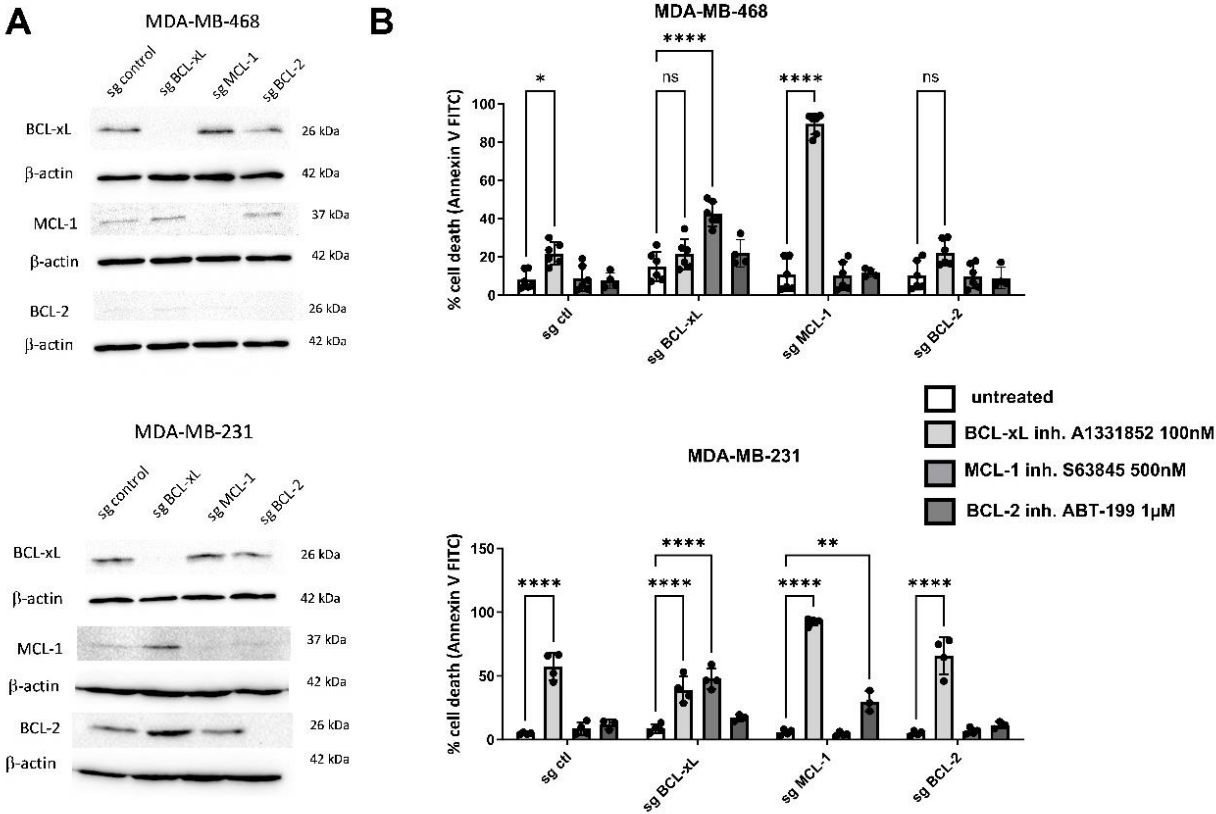


Figure 1. BCL-xL and MCL-1 are pivotal anti-apoptotic proteins responsible for the survival of MDAMB-468 and MDA-MB-231 cell lines. A. Validation of the downregulation of BCL-xL, MCL-1, and BCL-2 expression in engineered MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cell lines through western blot analysis. β actin expression in the samples serves as a loading control. B. Sensitivity of MDA-MB-468 and MDAMB-231 deficient in MCL-1, BCL-xL or BCL-2 after a 48-hour treatment with BH3 mimetics targeting these proteins (as indicated on the graph) in DMEM containing 0.5% FBS. Cell death is quantified by flow cytometry and the results are expressed as the percentage of cells labelled with annexin-V-FITC. Experiments were conducted in triplicate. P-values were determined by two-factor ANOVA, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and **** $p \leq 0.0001$.

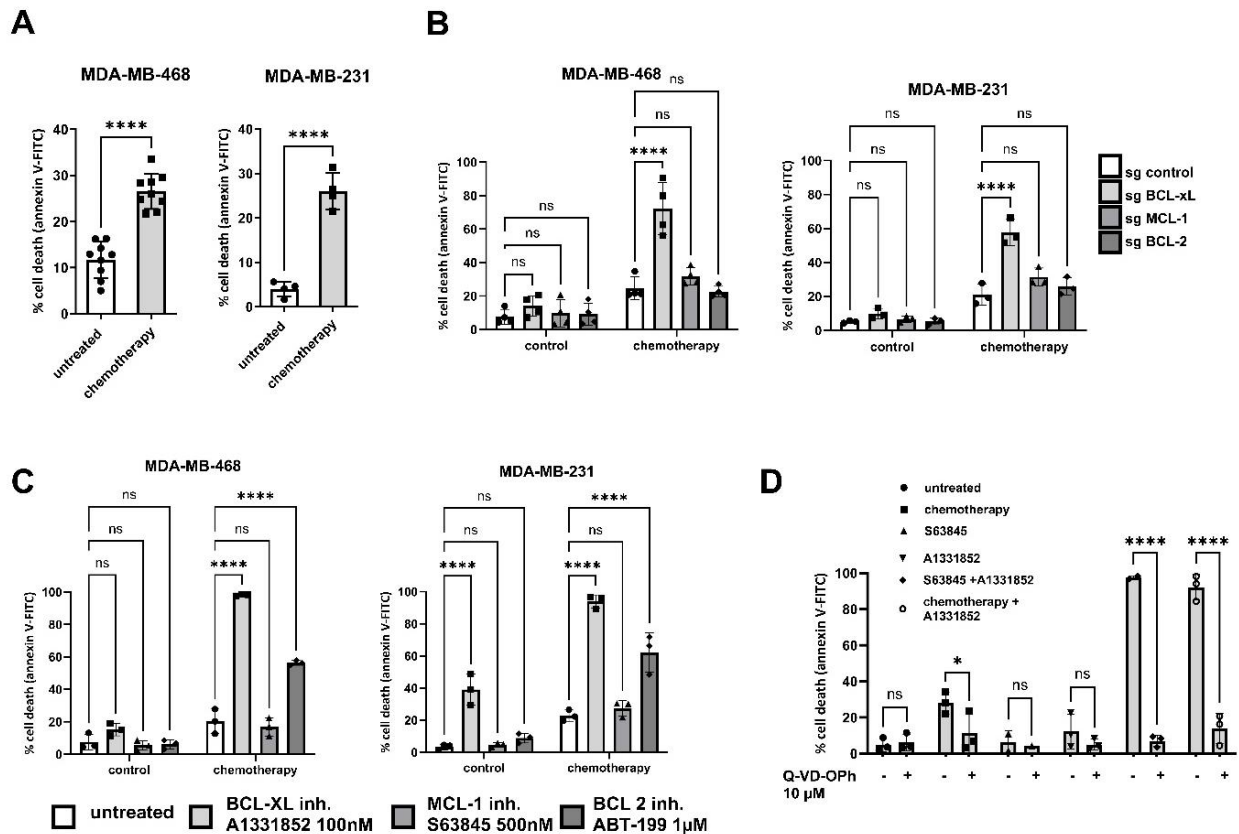


Figure 2. BCL-xL significantly contributes to the resistance of the MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines to chemotherapy. A. Sensitivity of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 treated 48h with chemotherapy combining Doxorubicin (2.5μM), 5-Fluorouracil (55μM) and Cisplatin (27.5μM). B. Sensitivity of the MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells silenced for anti-apoptotic proteins MCL-1, BCLxL or BCL-2 to chemotherapy. C. Sensitivity of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells treated with chemotherapy combined to BH3 mimetics targeting BCL-xL, MCL-1 or BCL-2 (as indicated on the graph). D. Sensitivity of MDA-MB-468 treated with different combinations of BH3 mimetics and chemotherapy in presence or not of Q-VD-OPh 10μM. Cell death is quantified by flow cytometry. The results are expressed as the percentage of cells labelled with annexin-V-FITC. Experiments were conducted in triplicate. P-values were determined by two-factor ANOVA, *p≤ 0.05 and **** p≤0.0001.

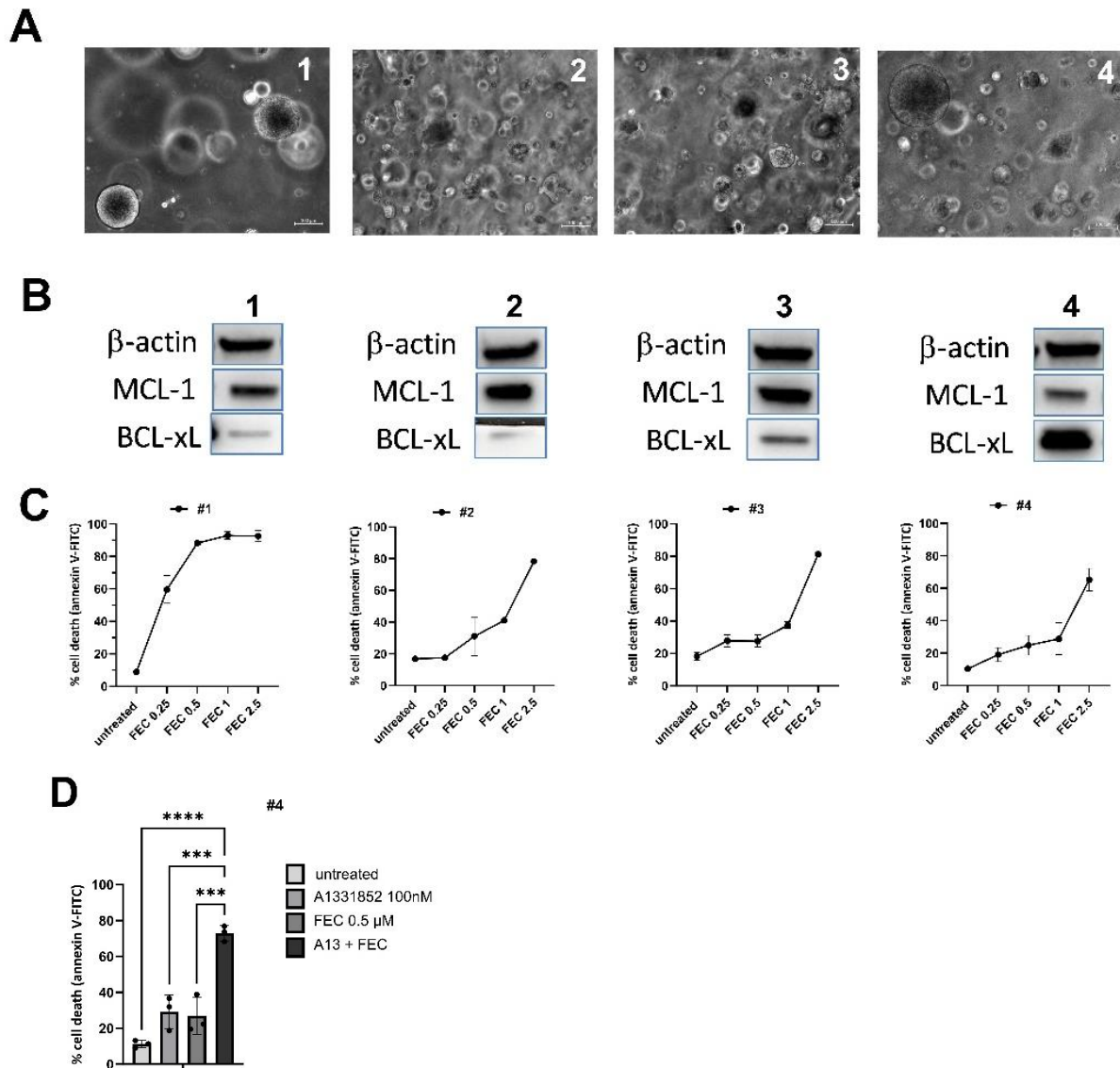


Figure 3. BCL-xL expression affects patient-derived tumoroids responsiveness to chemotherapy.

A. Illustration of treatment-naive-patient-derived tumoroids visualized by phase contrast microscopy (tumoroid 1 #778, tumoroid 2 #783, tumoroid 3 #720, tumoroid 4 #808). B. Representative experiment of protein expression level of MCL-1 and BCL-xL in patient-derived tumoroids evaluated using western blots. Actin expression is used as loading control. C. Heterogeneous sensitivity of patient-derived tumoroids treated with chemotherapy combining Doxorubicin (1X), 5-Fluorouracil (22X) and Cisplatin (11X) for 48h. The results are expressed as the percentage of cells labelled with annexin-VFITC. Experiments were performed on 4 different tumoroids (#1 to #4). D. Sensitivity of tumoroid #4 to treatment of chemotherapy combined with BCL-xL antagonist: A1331852 (100nM). The results are expressed as the percentage of cells labelled with annexin-V-FITC.

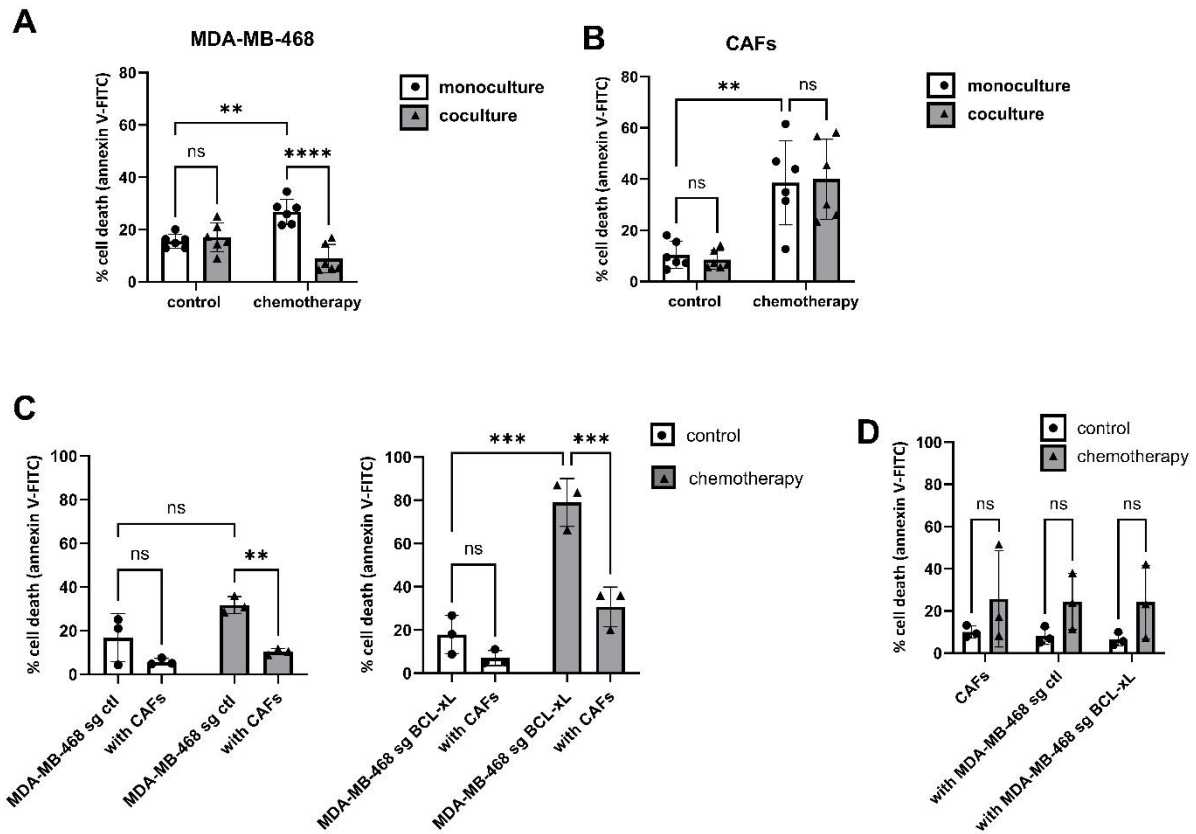


Figure 4. CAFs protect MDA-MB-468 cells from apoptosis triggered by simultaneous chemotherapy and BCL-xL silencing. A. Sensitivity of MDA-MB-468 under chemotherapy in the absence or the presence of CAFs in 2D coculture. B. Sensitivity of corresponding CAFs under chemotherapy in the absence or the presence of MDA-MB-468. C. Sensitivity of MDA-MB-468 control (left) or deficient in BCL-xL (right) to chemotherapy in 2D coculture. D. Sensitivity of corresponding CAFs under chemotherapy in the absence or the presence of MDA-MB-468 control or deficient in BCLxL. Experiments were conducted in triplicate. P-values were determined by two-factor ANOVA, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$.

Acknowledgements

We thank members of the “Stress adaptation and tumor escape” laboratory for their support. We benefited from technical support from the Cytometry Core facility (CytoCell) of Nantes University. L. Nocquet was a recipient of French ministry of Higher Education, Research and Innovation and was supported by a fellowship from Ligue contre le cancer (CD44). This work was supported by INCa (SIRIC ILIAD, INCa-DGOS INSERM-ITMO Cancer-18011), and departmental committee of LIGUE Contre le Cancer CD44, CD53 and CD22. P.P.J.'s laboratory is labeled by the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC). P.P.J. acknowledges the Association Ruban Rose for providing support.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

L.N., J. R., L. D. and F.S. conducted experiments. L.N., P.P.J and F.S. designed the experiments. L.N., P.P.J and F.S. analyzed the data. M.C. gave assistance in collecting tissue samples. L. N., P.P.J. and F.S. wrote the paper. P.P.J. and F.S. obtained funding. P.P.J and F.S. conceived the study and supervised it.

All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Ethics Approval and Consent to Participate

Informed consent was obtained from enrolled patients and protocol was approved by Ministère de la Recherche (agreement n°: DC-2012-1598) and by local ethic committee (agreement n°: CB 2012/06).

BIBLIOGRAPHY

- [1] Burstein HJ, Curigliano G, Thürlimann B, Weber WP, Poortmans P, Regan MM, et al. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2021;32:1216–35. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.06.023>.
- [2] Howlader N, Cronin KA, Kurian AW, Andridge R. Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2018;27:619–26. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI17-0627>.
- [3] Hannun YA. Apoptosis and the Dilemma of Cancer Chemotherapy. *Blood* 1997;89:1845–53. <https://doi.org/10.1182/blood.V89.6.1845>.
- [4] Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S, Campone M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2013;13:455–65. <https://doi.org/10.1038/nrc3538>.
- [5] Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 2008;27:6398–406. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.307>.

- [6] Goodwin CM, Rossanese OW, Olejniczak ET, Fesik SW. Myeloid cell leukemia-1 is an important apoptotic survival factor in triple-negative breast cancer. *Cell Death Differ* 2015;22:2098–106. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.73>.
- [7] Olopade OI, Adeyanju MO, Safa AR, Hagos F, Mick R, Thompson CB, et al. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am* 1997;3:230–7.
- [8] Petrocca F, Altschuler G, Tan SM, Mendillo ML, Yan H, Jerry DJ, et al. A genome-wide siRNA screen identifies proteasome addiction as a vulnerability of basal-like triple-negative breast cancer cells. *Cancer Cell* 2013;24:182–96. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.07.008>.
- [9] Delbridge ARD, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2015;22:1071–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.50>.
- [10] Castells M, Thibault B, Delord J-P, Couderc B. Implication of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: Tumor-Associated Stromal Cells Protect Tumor Cells from Cell Death. *Int J Mol Sci* 2012;13:9545–71. <https://doi.org/10.3390/ijms13089545>.
- [11] Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer* 2020;20:174–86. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>.
- [12] Louault K, Bonneaud TL, Séveno C, Gomez-Bougie P, Nguyen F, Gautier F, et al. Interactions between cancer-associated fibroblasts and tumor cells promote MCL-1 dependency in estrogen receptor-positive breast cancers. *Oncogene* 2019;38:3261–73. <https://doi.org/10.1038/s41388018-0635-z>.
- [13] Sachs N, De Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* 2018;172:373–386.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.010>.
- [14] Bhatia S, Kramer M, Russo S, Naik P, Arun G, Brophy K, et al. Patient-Derived Triple-Negative Breast Cancer Organoids Provide Robust Model Systems That Recapitulate Tumor Intrinsic Characteristics. *Cancer Res* 2022;82:1174–92. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-212807>.
- [15] Uematsu H, Saito C, Kondo J, Onuma K, Coppo R, Mori Y, et al. De-differentiation in cultures of organoids from luminal-type breast cancer is restored by inhibition of NOTCH signaling. *Hum Cell* 2023. <https://doi.org/10.1007/s13577-023-00975-7>.
- [16] Campbell KJ, Mason SM, Winder ML, Willemsen RBE, Cloix C, Lawson H, et al. Breast cancer dependence on MCL-1 is due to its canonical anti-apoptotic function. *Cell Death Differ* 2021. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00773-4>.
- [17] Campbell KJ, Dhayade S, Ferrari N, Sims AH, Johnson E, Mason SM, et al. MCL-1 is a prognostic indicator and drug target in breast cancer. *Cell Death Dis* 2018;9:19. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0035-2>.
- [18] Levenson JD, Zhang H, Chen J, Tahir SK, Phillips DC, Xue J, et al. Potent and selective smallmolecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell Death Dis* 2015;6:e1590. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.561>.
- [19] Alcon C, Gómez Tejeda Zañudo JGT, Albert R, Wagle N, Scaltriti M, Letai A, et al. ER+ Breast Cancer Strongly Depends on MCL-1 and BCL-xL Anti-Apoptotic Proteins. *Cells* 2021;10:1659. <https://doi.org/10.3390/cells10071659>.
- [20] Adams KW, Cooper GM. Rapid Turnover of Mcl-1 Couples Translation to Cell Survival and Apoptosis. *J Biol Chem* 2007;282:6192–200. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610643200>.
- [21] Bhatt S, Pioso MS, Olesinski EA, Yilma B, Ryan JA, Mashaka T, et al. Reduced Mitochondrial Apoptotic Priming Drives Resistance to BH3 Mimetics in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 2020;38:872–890.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.10.010>.
- [22] Montero J, Gstalder C, Kim DJ, Sadowicz D, Miles W, Manos M, et al. Destabilization of NOXA mRNA as a common resistance mechanism to targeted therapies. *Nat Commun* 2019;10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12477-y>.

- [23] Hassan MSU, Ansari J, Spooner D, Hussain SA. Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncol Rep* 2010;24:1121–31. https://doi.org/10.3892/or_00000963.
- [24] Won K-A, Spruck C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol* 2020;57:1245–61. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5135>.
- [25] Senthebane DA, Rowe A, Thomford NE, Shipanga H, Munro D, Al Mazeedi MAM, et al. The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer. *Int J Mol Sci* 2017;18:1586. <https://doi.org/10.3390/ijms18071586>.
- [26] Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 2007;128:1173–86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.037>.
- [27] Vlahovic G, Karantza V, Wang D, Cosgrove D, Rudersdorf N, Yang J, et al. A phase I safety and pharmacokinetic study of ABT-263 in combination with carboplatin/paclitaxel in the treatment of patients with solid tumors. *Invest New Drugs* 2014;32:976–84. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0116-3>.
- [28] Khan S, Wiegand J, Zhang P, Hu W, Thummuri D, Budamagunta V, et al. BCL-XL PROTAC degrader DT2216 synergizes with sotorasib in preclinical models of KRASG12C-mutated cancers. *J Hematol Oncol* 2022;15:23. <https://doi.org/10.1186/s13045-02201241-3>.
- [29] He Y, Zhang X, Chang J, Kim H-N, Zhang P, Wang Y, et al. Using proteolysis-targeting chimera technology to reduce navitoclax platelet toxicity and improve its senolytic activity. *Nat Commun* 2020;11:1996. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15838-0>.
- [30] Nocquet L, Juin PP, Souazé F. Mitochondria at Center of Exchanges between Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts during Tumor Progression. *Cancers* 2020;12:3017. <https://doi.org/10.3390/cancers12103017>.
- [31] Sonnenberg M, van der Kuip H, Haubeis S, Fritz P, Schroth W, Friedel G, et al. Highly variable response to cytotoxic chemotherapy in carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) from lung and breast. *BMC Cancer* 2008;8:364. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-364>.
- [32] Lotti F, Jarrar AM, Pai RK, Hitomi M, Lathia J, Mace A, et al. Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J Exp Med* 2013;210:2851–72. <https://doi.org/10.1084/jem.20131195>.
- [33] Dekkers JF, Van Vliet EJ, Sachs N, Rosenbluth JM, Kopper O, Rebel HG, et al. Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids. *Nat Protoc* 2021;16:1936–65. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00474-1>.

Discussion de l'article 1

Dans cet article, nous montrons que les protéines anti-apoptotiques BCL-xL et MCL-1 jouent conjointement un rôle central dans la survie des lignées de CSTN. Nos résultats sont en accord avec des études montrant que les cellules malignes de patientes atteintes de CSTN dépendent de BCL-xL (Keitel et al., 2014) et MCL-1 (C. M. Goodwin et al., 2015) pour leur survie. Des études montrent que la dépendance à MCL-1 est retrouvée principalement dans les CSTN, et peu dans les cancers du sein luminaux (Bashari et al., 2016; C. M. Goodwin et al., 2015; Petrocca et al., 2013; M. M. Williams et al., 2017). Dans notre modèle, les cellules malignes ne semblent pas dépendre particulièrement de BCL-2 pour leur survie. BCL-2 semble d'ailleurs davantage exprimé par les cellules malignes de cancers du sein luminaux (Eom et al., 2016; Gee et al., 1994).

La nécessité de cibler conjointement BCL-xL et MCL-1 pour induire la mort significative des cellules malignes dans notre étude suggère une compensation entre les deux protéines. De façon intéressante, nous observons que la mort induite par le ciblage pharmacologique de MCL-1 dans des cellules déficientes en BCL-xL est plus faible que la mort induite par le ciblage pharmacologique de BCL-xL dans des lignées déficientes en MCL-1. Ce résultat suggère que dans les cellules étudiées, BCL-xL pourrait être initialement davantage lié aux protéines pro-apoptotiques, alors que MCL-1 pourrait être plutôt « inoccupé », en lien avec une demi-vie courte et le fait que la liaison de MCL-1 avec certaines protéines pro-apoptotiques facilite sa dégradation (Adams & Cooper, 2007). Cette idée est en accord avec une étude montrant que MCL-1 prend davantage en charge la protéine pro-apoptotique BIM lorsque BCL-2 est inhibé dans des cellules malignes de leucémie myéloïde aiguë (Bhatt et al., 2020). Ce résultat montre que MCL-1 a la capacité de prendre en charge les pro-apoptotiques relarguées par d'autres protéines anti-apoptotiques. D'autres travaux montrent le rôle majeur de MCL-1 dans la prise en charge des protéines pro-apoptotiques induites ou libérées par des traitements (Campbell et al., 2018; Montero et al., 2019). Dans notre étude, il serait intéressant de préciser l'état des complexes pro-/anti-apoptotiques qui déterminent le devenir des cellules malignes.

Nos résultats indiquent que le ciblage de BCL-xL et MCL-1 chez les patientes atteintes de CSTN pourrait être particulièrement intéressant. Cependant, des problèmes de toxicité plaquettaire liée au ciblage de BCL-xL (Balachander et al., 2020; Mason et al., 2007) mais également de toxicité cardiaque liée au ciblage de MCL-1 (Rasmussen et al., 2020) compromettent cette stratégie. Afin de surmonter les effets indésirables du ciblage de BCL-xL, des molécules protac BCL-xL, ciblant BCL-xL en favorisant sa protéolyse par adressage à la ligase E3 VHL, faiblement exprimée par les plaquettes en comparaison à de nombreuses lignées humaines cancéreuses, portent l'espoir de l'utilisation en clinique d'inhibiteurs de BCL-xL (Y. He et al., 2020; Khan et al., 2019).

Le ciblage pharmacologique de BCL-xL est d'autant plus important que BCL-xL est un frein majeur à la résistance à une chimiothérapie conventionnelle dans notre étude. Mais nos résultats montrent que les CAFs du microenvironnement limitent le gain d'efficacité apporté par le ciblage de BCL-xL. Dans notre modèle de coculture, la protection induite par les CAFs pourrait être médiée par des facteurs solubles sécrétés (cytokines, facteurs de croissance, métabolites...), des constituants de la MEC ou encore des vésicules extracellulaires (Nocquet et al., 2020). Les effets pro-tumoraux des CAFs sur les cellules malignes peuvent également nécessiter des contacts directs entre les deux types cellulaires, comme observé dans le cancer de la prostate (Fiaschi et al., 2012). Des expériences supplémentaires précisant la composition en divers facteurs dans le milieu des CAFs, des cellules malignes et des cocultures, et des tests fonctionnels basés sur l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, pourraient nous permettre de mieux comprendre la nature des interactions entre les deux types cellulaires à l'origine de l'effet protecteur. Le modèle de coculture ne permet pas si facilement de discriminer les facteurs en jeu. Ainsi, les milieux conditionnés de CAFs sont un modèle plus simple qui nous permettrait plus facilement de comprendre comment les CAFs protègent les cellules malignes, sous réserve que les contacts directs ne soient pas nécessaires. De plus, il serait intéressant de comprendre si l'éducation des CAFs par les cellules malignes participe à leur effet protecteur.

Il a déjà été montré que les CAFs protègent les cellules malignes de chimiothérapies en modulant le niveau de certaines protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques, ainsi que des protéines en aval de la MOMP (Nocquet et al., 2020). Des expériences réalisées dans notre étude indiquent, comme d'autres études dans différents cancers (Basu & Sridharan, 2017; Khan et al., 2023; Sharifi et al., 2015), que les cellules malignes présentent des niveaux de BCL-xL et MCL-1 diminués sous l'influence de la chimiothérapie (résultats non montrés). Des expériences de cocultures avec compartimentation des CAFs et des cellules malignes nous permettront de préciser l'impact des CAFs sur l'expression des protéines anti-apoptotiques dans les cellules malignes dans ce contexte. Il est également possible que les CAFs modulent la dynamique d'interactions entre protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. En particulier, les CAFs pourraient augmenter le niveau d'expression de MCL-1 dans les cellules malignes, et/ou favoriser les interactions entre MCL-1 et les protéines pro-apoptotiques.

Malgré des sensibilités différentes des CAFs à la chimiothérapie, nous montrons que les CAFs protègent les cellules malignes de façon homogène, suggérant que la chimiothérapie pourrait rendre les CAFs encore plus protecteurs des cellules malignes. Des travaux ont déjà montré que les CAFs induisent la chimiorésistance de cellules initiatrices de la tumeur dans le côlon en particulier lorsque ces CAFs sont exposés eux-mêmes à la chimiothérapie (Lotti et al., 2013). Ces résultats mettent en avant l'importance de développer des stratégies ciblant le dialogue entre CAFs et cellules malignes, au-delà

du ciblage séparé de chacun des types cellulaires. Pour cibler ce dialogue, une meilleure compréhension des interactions entre les deux types cellulaires est requise.

Enfin, nos résultats mettent en avant que les tumoroïdes qui expriment davantage de BCL-xL sont plus résistants à la combinaison de chimiothérapies. Nous avons mis en évidence une certaine hétérogénéité de l'expression de BCL-xL dans les cellules malignes de patientes atteintes de cancers du sein, qui reflète l'hétérogénéité de réponse à la chimiothérapie. D'après nos résultats, les cellules malignes qui expriment peu de BCL-xL et sont plus sensibles à la chimiothérapie sont susceptibles d'être protégées par les CAFs. Nos résultats soulignent l'intérêt de classer les patientes en fonction de l'expression de BCL-xL afin de mieux identifier les patientes susceptibles de répondre aux chimiothérapies, et parmi elles les patientes pour lesquelles un ciblage du dialogue entre CAFs et cellules malignes pourrait s'avérer efficace dans le cas de chimiorésistance.

Ainsi, l'ensemble de cette étude montre l'importance de mieux comprendre la résistance à la chimiothérapie induite par les CAFs dans un contexte où BCL-xL n'exerce pas son rôle anti-apoptotique protecteur.

ARTICLE 2

Cancer-associated fibroblasts enhance resistance to apoptosis in triple-negative breast cancer cells by restricting glucose availability and upregulating MCL-1 expression

Résumé de l'article 2

Le microenvironnement est un frein majeur à l'efficacité des chimiothérapies dans les cancers du sein (Trédan et al., 2007). Parmi les éléments impliqués, le contexte nutritif peut moduler la réponse aux traitements. Plus particulièrement, les cellules malignes peuvent adapter leur fonctionnement et métabolisme aux conditions nutritives restreintes dans la tumeur, et ces mécanismes leur confèrent une plus grande résistance aux traitements (Zaal & Berkers, 2018). Des études mettent d'ailleurs en évidence des interactions directes entre protéines de la famille BCL-2 et enzymes/transporteurs métaboliques (Nocquet et al., 2020).

Notre première étude a révélé que les CAFs limitent nettement l'efficacité d'une chimiothérapie conventionnelle même lorsque l'équilibre de la famille BCL-2 est rompu en faveur de l'apoptose dans le CSTN. Ces résultats soulignent l'importance de comprendre comment les CAFs protègent les cellules de CSTN de l'apoptose, en particulier lorsqu'elle est induite par le ciblage de la protéine BCL-xL. L'équipe a déjà montré dans un contexte de cancer du sein luminal que les CAFs protègent les cellules malignes de l'apoptose induite par l'ABT-737, un inhibiteur de BCL-xL, BCL-2 et BCL-w, via la sécrétion d'IL-6, qui favorise la stabilisation de la protéine MCL-1 dans les cellules malignes (Louault et al., 2019).

Notre seconde étude vise à comprendre l'influence des CAFs sur la survie de cellules malignes lorsque BCL-xL est inhibé dans le contexte du CSTN.

Nous montrons tout d'abord que le glucose sensibilise les cellules malignes de CSTN à l'ABT-737 alors que l'utilisation mitochondriale de pyruvate les protège. Nos résultats indiquent que les milieux conditionnés de CAFs (MC CAFs) ne contiennent plus de glucose par rapport au milieu contrôle, et que cette perte de glucose est au moins en partie responsable des effets protecteurs des CAFs. De plus, la protéine anti-apoptotique MCL-1 est augmentée en absence de glucose et sous l'influence des MC CAFs, et nous montrons son implication dans les effets protecteurs des CAFs. Enfin, en considérant des vulnérabilités thérapeutiques induites par la privation de glucose, nous montrons que la metformine, un anti-diabétique, élimine l'effet protecteur des MC CAFs.

Notre étude place donc la privation en glucose au cœur des effets protecteurs des CAFs contre l'apoptose des cellules de CSTN. Nous avons identifié la metformine, un traitement déjà utilisé en clinique, comme un traitement potentiel en combinaison à l'induction de l'apoptose afin de contrer le dialogue entre CAFs et cellules malignes dans la tumeur. Nos travaux confirment également le rôle important de MCL-1 dans la survie des cellules malignes lors du ciblage des autres protéines anti-apoptotiques, ici BCL-xL, BCL-2 et BCL-w, en particulier dans un contexte écosystémique prenant en

compte le microenvironnement tumoral. Enfin, nos résultats permettent d'envisager l'utilisation de BH3-mimétiques ciblant BCL-xL à des doses plus faibles pour une meilleure efficacité tout en préservant les plaquettes, grâce à la rupture du dialogue entre CAFs et cellules malignes.

Résumé graphique

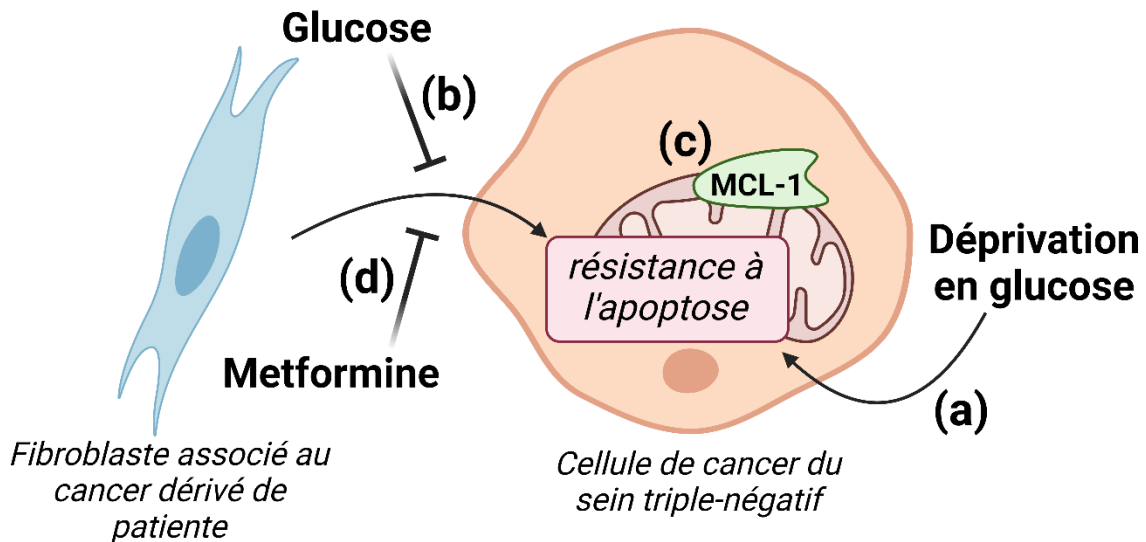


Figure 33 : Les fibroblastes associés au cancer favorisent la résistance à l'apoptose de cellules de cancer du sein triple négatif en limitant la disponibilité en glucose et en augmentant les niveaux de MCL-1

(a) La déprivation en glucose limite la sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose induite par l'ABT-737. (b) Les effets protecteurs des milieux conditionnés de CAFs sont médiés par une déprivation en glucose. (c) La protéine anti-apoptotique MCL-1 est impliquée dans les effets protecteurs des CAFs. (d) La metformine perturbe les effets protecteurs des CAFs en lien avec la déprivation en glucose induite par les CAFs.

Cancer-associated fibroblasts enhance resistance to apoptosis in triple-negative breast cancer cells by restricting glucose availability and upregulating MCL-1 expression

Lisa Nocquet^{1,2,3}, Laurine Duarte^{1,2,3}, Mickaël Croyal^{5,6,7}, Mario Campone^{1,3,4}, Philippe P. Juin^{1,2,3,4} and Frédérique Souazé^{1,2,3}

1. Nantes Université, INSERM, CNRS, CRCI²NA, F-44000 Nantes, France.
2. Equipe labélisée LIGUE Contre le Cancer, Paris, France
3. SIRIC ILIAD, Nantes, Angers, France.
4. ICO René Gauducheau, Saint Herblain, France.
5. Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, INSERM, l'institut du Thorax, 44000 Nantes, France.
6. Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, INSERM, BioCore, US16, SFR Bonamy, F-44000 Nantes, France.
7. CRNH-Ouest Mass Spectrometry Core Facility, 44000 Nantes, France.

E-mail: frederique.souaze@univ-nantes.fr or philippe.juin@univ-nantes.fr

The authors declare no conflict of interest.

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) remain of poor prognosis in part due to its heightened resistance to chemotherapy. This diminished treatment efficacy is attributed to an imbalance in BCL-2 family proteins, leading to reduced induction of mitochondrial outer membrane permeability (MOMP) and resulting cell death. In particular, BCL-xL has been defined as a main actor of breast cancer cells resistance to chemotherapy. We herein show that the response of the TNBC cell line MDA-MB-468 to MOMP challenging by BCL-2/BCL-xL antagonists varies based on the availability of nutrients with the presence of glucose in particular enhancing sensitivity to cell death. Cancer-associated fibroblasts (CAFs), extrinsic regulators of malignant cell sensitivity to treatment promote their resistance to pharmacological antagonism of BCL-xL by limiting glucose availability. This glucose-deprivation-driven protective effect involves cancer cell expressed MCL-1 compensating for inhibited BCL-xL and it can be reversed by metformin, an anti-diabetic agent. These results underscore the potential for improving the efficacy of treatments for triple-negative breast cancer by investigating metabolic vulnerabilities due to the dynamic interaction between CAFs and cancer cells.

INTRODUCTION

Triple-negative breast cancer, characterized by a lack of targeted therapeutic options, resistance to chemotherapy and a high degree of aggressiveness, has the worst prognosis of all breast cancers [1]. To resist treatment, TNBC cells employ numerous adaptation mechanisms, including resistance to apoptosis [2]. In fact, most anticancer drugs currently used in clinical oncology exploit the apoptotic pathway to trigger cancer cell death. The BCL2 family proteins are involved in a critical step of apoptosis, by regulating the mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) which leads to cytochrome c release in cytoplasm and activation of a caspase cascade. Cancer cells can escape apoptosis through modifications in the equilibrium between the anti- and pro-apoptotic members of the BCL2 family [3]. Numerous studies have indeed shown that elevated levels of pro-survival proteins are frequently observed in cancer, and contribute to cancer phenotype. In particular, BCL-xL and MCL-1 overexpression has been linked to resistance to conventional anti-cancer chemotherapies [4,5]. Small molecules called BH3 mimetics, which functionally replicate pro-apoptotic effect of BH3-only proteins and can therefore counterbalance the over-expression of pro-survival proteins, provide an opportunity to better understand the precise mechanisms underlying chemoresistance [6].

A particular feature of cancer cells is also related to their ability to adapt and exploit different sources of nutrients to survive and proliferate, namely glucose, glutamine and fatty acids. One metabolic reprogramming classically accepted in cancer cells is the increased use of glucose via aerobic glycolysis ("Warburg effect") to produce ATP [7,8], that participates to tumor progression and resistance to treatments [9,10]. Nevertheless, other metabolic adaptations have been described, implying oxidative phosphorylation, that can also favor tumor progression and escape from death [11–15]. A relationship between the metabolic phenotype of the tumor and the biology of the cancer has been suggested, in which the microenvironment plays a key role [16].

The microenvironment is made up of different cell types, of which the major players, due to by their multiple roles and proportion, are the cancer-associated fibroblasts (CAFs). A correlation has been established between the proportion of fibroblasts within the tumor and a negative prognosis [17–19]. Induction of stromal gene expression has been shown to predict resistance to preoperative FEC (5-Fluorouracil/Epirubicin/Cyclophosphamide) chemotherapy in TNBC, suggesting the involvement of stromal cells in resistance to this therapy [20]. It has been shown that triple-negative breast cancers are enriched in specified subpopulations of CAFs which foster tumor progression and/or are deleterious for response to immunotherapy in particular (e.g. S1: proinvasive and S4: prometastatic) [21,22]. CAFs have been reported in various cancers to favor chemoresistance of tumor cells by local release of soluble factors [23–28]. We previously showed that in luminal breast cancer, interleukin-6 (IL-6) secretion by CAFs mitigates the tumor BCL-2 dependency by inducing expression of

cancer cell pro-survival protein MCL-1 [29]. CAF-induced resistance can also come from the ability of epithelial cancer cells to utilize metabolites provided by surrounding CAFs. It has been documented that CAFs secrete metabolites that fuel cancer cells metabolism in some cancers, allowing tumor growth and chemoresistance [11,28,30–35]. This can occur via oxidative stress, autophagy, glycolysis and senescence in stromal fibroblasts [30,36–38].

Triple negative and estrogen receptors (ER) positive breast cancers cells do not have the same metabolic profile, since the first ones are glycolytic while the seconds rely more on tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) to provide energy [16,39–41]. Breast cancer subtypes also present differences in expression and survival dependency to the pro-survival key members BCL-2, BCL-xL and MCL-1. In this study, we saw that TNBC cells respond to stromal CAFs through different mechanisms than those we described in luminal breast cancer under apoptotic stress induced by the BH3 mimetic ABT-737, which inhibits BCL-xL, BCL-2 and BCL-w [29]. We first showed that sensitivity of TNBC cells to ABT-737 was modulated by the availability in glucose and pyruvate. Interestingly, glucose sensitized cancers cells to ABT-737. We showed that CAFs limited malignant cells sensitivity to apoptosis by limiting glucose availability, and this process implied the increase of the level of MCL-1. Finally, metformin, an anti-diabetic treatment, counteracts CAFs protective effect in connection with glucose deprivation. Our results highlight the importance of better understanding the dialog between cancer cells and their surrounding cells to identify potential additive therapies.

RESULTS

MDA-MB-468 sensitivity to ABT-737 depends on their nutrient context. Cancer cells are known to undergo metabolic changes, which may be linked to their resistance to chemotherapy. Here, we investigated how the sensitivity of the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-468 to ABT-737 is affected by the type of nutrients available. We found that when MDA-MB-468 cells are exclusively given pyruvate, their sensitivity to ABT-737 decreases compared to when they are grown in a nutrient-restricted medium (lacking glucose, pyruvate and glutamine). Conversely, when these cells only have glucose as a nutrient, they become more sensitive to ABT-737. In contrast, the sole presence of glutamine in the culture medium does not significantly alter their sensitivity to ABT-737 compared to a nutrient-restricted medium (Figure 1A). Further experiments involving combinations of the different nutrients confirmed that the induction of cell death by ABT-737 in MDA-MB-468 cells is notably diminished when glucose is absent, except when pyruvate is the sole nutrient available. We evaluated MDA-MB-468 growth in the different nutritive conditions using Incucyte imaging system (Supplementary Figure 1A) and showed that there is no correlation between cancer cells proliferation

and sensitivity to apoptosis in the different conditions (Supplementary figure 1B). Cells were sensitized to ABT-737 in the presence of 2-Deoxy-D-Glucose (2DG), a synthetic glucose analogue capable of inhibiting the glycolytic pathway from the first step (Figure 1C), incriminating, as expected, the sensitizing effect of glucose availability to induction of glycolysis. The opposing effects of pyruvate and glucose on the sensitivity to ABT-737 may appear counterintuitive, especially considering that glucose, via glycolysis, provides pyruvate. We found that an inhibitor targeting the mitochondrial pyruvate transporter effectively counteracted the protective effects of pyruvate against ABT-737-induced cell death (Figure 1D). Likewise, we observed that the influence of glucose on ABT-737 sensitivity was amplified by inhibition of the mitochondrial pyruvate transport (Figure 1E). Of note, as shown in supplementary Figure 1 A and B, the difference in cell sensitivity to ABT-737 is not related to their proliferation state. These results collectively indicate that glucose uptake by cells heightens their susceptibility to ABT-737-induced apoptosis, while the subsequent step of pyruvate uptake by mitochondria diminishes this sensitizing effect ABT-737 (Figure 1F).

CAFs protect MDA-MB-468 from ABT-737-induced cell death by limiting glucose availability. In a prior study, we reported that in luminal breast cancer cells, CAFs reduce the cells reliance on BCL-2/BCL-xL through paracrine mechanisms that promote the expression of MCL-1. In this current investigation, we used a similar approach to confirm the paracrine pro-survival activity of CAFs in co-culture (Figure 2A) or when exposed to conditioned media from CAFs (Figure 2B). Previously, in luminal breast cancer, we established that the anti-apoptotic effect of CAFs depended on paracrine functions of IL-6. However, in the case of TNBC, we observed different mechanisms at play. Indeed, we showed that the protective effect of CAFs conditioned media persists even after heating to 90°C (Supplementary Figure 2A) and after filtration with a 3-kilodalton (3kDa) filter (Figure 2C), suggesting that the mechanistic basis for this effect could be changes in metabolite concentrations.

We analyzed the composition of media conditioned by CAFs by measuring the levels of various components, including glucose, glutamine, pyruvate, lactate, and several other amino acids and organic acids (Figure 2D and Supplementary Figure 2B and C). Our analysis revealed that CAFs consume approximately 1mM of glucose and glutamine, 0.8 mM of pyruvate, and produce approximately 2mM of lactate and alanine, glutamate and α -ketoglutarate to a lesser extent. We showed that alanine and α -ketoglutarate supplementation have no significant effect on ABT-737 induced cell death in MDA-MB-468 cells (Supplementary Figure 2 D and E). Based on the nutritive measures of CAFs CM, we designed a synthetic medium mimicking the main nutrients composition of CAF CM (e.g. nutrient levels of glucose, pyruvate, glutamine and lactate), and found that it recapitulated the protective effects of

CAFs (Figure 2E). Thus, changes in nutrient availability made by CAFs are sufficient to enhance the resistance of these cells to cell death induction.

To discern the specific nutrients responsible for the protective effects observed, we conducted experiments where, before addition to malignant cells, we supplemented the CAFs CM with individual nutrients, such as glucose, glutamine, or pyruvate. Additionally, we inhibited lactate recapture by cancer cells using an MCT-1 (monocarboxylate transporter 1) inhibitor and pyruvate entry in the mitochondria using UK-5099. Our results revealed that neither the addition of glutamine nor pyruvate, nor the inhibition of lactate recapture, had a significant impact on reducing the protective effects of CAFs CM (Figure 3 A-C). In the same way, MPC inhibition with UK-5099 did not affect CAFs CM protective effects (supplementary figure 3A). In contrast, when we supplemented CAFs CM with glucose at concentrations of 1 or 10 mM, it led to a statistically significant reduction in the protective effects conferred by CAFs CM (Figure 3 D-E)

The impact of glucose-depleted CAFs CM on the resistance of MDA-MB-468 cells to apoptosis is linked to enhanced expression of MCL-1. Frequently, resistance to apoptosis induced by BH3 mimetics targeting BCL-2/BCL-xL is attributed to the compensatory activity of MCL-1. We found that CAFs CM and glucose depletion both increase the expression level of MCL-1 in cancer cells, as shown in Figure 4A and B.

To establish a link between the up-regulation of MCL-1 and the protective effects of CAFs, we conducted experiments using MDA-MB-468 cells in which MCL-1 was knocked down using CRISPR-Cas9 technology (Figure 4C, top). MDA-MB-468 cells that do not express MCL-1 were not protected by CAFs CM (Figure 4C, bottom). Furthermore, we provide additional evidence supporting the role of MCL-1 in mediating CAFs protective effects by showing that the increasing doses of an MCL-1 inhibitor progressively counteract the protective effects of CAFs CM (Figure 4D).

Metformin reverses CAF CM protective effects on MDA-MB-468 against ABT-737. We inferred from the above experiments that metformin, known to selectively induce cell death in conditions of low glucose availability, might efficiently modulate cell death sensitivity of CAFs-influenced cancer cells. Under glucose-deprived conditions, metformin strongly reduced the expression of MCL-1, as shown in Figure 5A, while showing moderate impact on its expression when glucose was present. Furthermore, metformin treatment reversed the protective effects of glucose deprivation, enhancing cell death induced by ABT-737, as illustrated in Figure 5B. Similarly, metformin reduced MCL-1 level in MDA-MB-468 when cells were incubated in CAFs CM exclusively (Figure 5C), and counteracted the protective

effects of CAFs CM against ABT-737-induced cell death, as depicted in Figure 5D. These findings suggest a promising repositioning of metformin to enhance apoptosis sensitivity in breast cancer cells, particularly within the context of the tumor microenvironment.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate that cancer-associated fibroblasts (CAFs) decrease the susceptibility of cancer cells to undergo apoptosis by fostering competition for nutrients among them. Within the context of the environment, changes in the metabolism of cancer cells influence the responsiveness of MDA-MB-468 breast cancer cells to an apoptotic inducer that specifically targets BCL-2/BCL-xL, known as the BH-3 mimetic ABT-737. The challenging circumstances within the microenvironment can be attributed, at least in part, to the elevated glucose consumption by cancer-associated fibroblasts (CAFs). This heightened glucose consumption results in the production of pyruvate and lactate in close proximity to cancer cells. Consequently, it has been established that CAFs play a role in the metabolic reconfiguration and resistance of cancer cells by furnishing them with lactate, pyruvate, or alanine [42,43]. In our study, while pyruvate alone demonstrated the capacity to diminish the sensitivity of cancer cells to ABT-737, we could not establish its direct role in the protective effects conferred by CAFs. Interestingly, the protective influence of CAF CM remains largely unaltered even when pyruvate is added or when pyruvate entry into mitochondria is inhibited. Consistent with these findings, we showed that CAFs CM did not contain pyruvate. Employing similar methodologies, we also excluded the participation of lactate secretion produced by CAFs in their protective effects. Conversely, supplementing CAFs CM with glucose diminishes their protective effects. It seems that the modification in cancer cell susceptibility to apoptosis induced by CAFs is primarily attributed to the deficit in glucose rather than the provision of metabolites. This concept is in accordance with our findings, which indicate a diminished capacity of ABT-737 to trigger cell death when glucose is absent or when a glycolysis inhibitor, 2 Deoxy-D-glucose (2DG), is present. This observation might seem counterintuitive, considering the existing body of research that underscores the anti-tumor properties of glucose-restrictive conditions, including the combined use of 2DG and ABT-737 treatment ^{45,46}. Nevertheless, the influence of glycolysis on apoptosis sensitivity may be subject to the specific cellular environment, as prior studies have suggested that the effects of 2DG on the survival of cancer cells during treatment can be cell line-specific [44]. MDA-MB-468 show loss of PTEN, which activates the PI3K/AKT/mTOR pathway and promotes mTORC1 formation [11,45–47]. It has been shown that glucose deprivation induces AMPK activation, which inhibits the formation of the mTORC1 complex promoting cell survival, but also apoptosis [48–50]. Thus, the effects of glucose and CAFs CM in the MDA-MB-468 line could be linked to elevated basal mTOR activity associated with loss of PTEN. It will

be interesting to clarify which pathways underlying mTOR are modulated by the absence of glucose and CAFs CM in MDA-MB-468.

Increased dependence on OXPHOS, which may be promoted by a glucose-depleted context, has also been shown in various studies to participate in treatment resistance^{11,48–50}. However, some studies have also shown that glucose deprivation promotes the resistance of malignant cells to chemotherapies, notably via the PERK/ATF4 pathway in colorectal cancer [45] and increased expression of treatment efflux transporters in liver cancer [46]. Recently, a better response to chemotherapy was shown in pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts in hyperglycemic mice. The authors propose that under conditions of hyperglycemia, oxidative stress is reduced, resulting in an attenuated adaptive survival response to acute oxidative insults, such as those induced by chemotherapy [47].

Our findings indicate that increased glucose uptake by cells makes them more susceptible to ABT-737-induced apoptosis, but the subsequent uptake of pyruvate by mitochondria reduces the cells sensitivity to ABT-737. Interestingly, the increased susceptibility to apoptosis when glucose is present evokes the sensitizing influence of NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase) inhibition on apoptosis induced by BH3 mimetics in TNBC cells. Indeed, it was observed that NAMPT inhibition leads to the accumulation of metabolites from the upper glycolytic pathway and a reduction in the intermediate/lower glycolytic pathway (specifically at the triosephosphate isomerase junction). The effects of NAMPT inhibitors on BH3 mimetics targeting BCL-2/BCL-xL is reversed by adding adenine or pyruvate to the culture medium [51].

Resistance to ABT-737 is notably based on the concomitant expression of MCL-1 as its overexpression leads to the uptake of pro-apoptotic proteins released by BCL-xL. Here, we provide evidence supporting the role of MCL-1 in mediating CAFs protective effects. In HeLa cells, 2DG disrupts BAK-MCL-1 association, priming cancer cells to ABT-737-induced apoptosis without lowering protein levels of Mcl-1[42]. In some models, glucose deprivation has been shown to reduce MCL-1 expression, also leading to improved sensitivity to ABT-737 [52].

We showed that by creating a glucose-deprived environment, CAFs reduce cancer cells susceptibility to apoptosis induction that targets BCL-2 and BCL-xL, a main actor of chemoresistance. We harnessed the potential of metformin, which has been reported to exhibit increased cytotoxicity in such a nutrient-deprived setting [53–55]. When triple-negative breast cancer (TNBC) cells are exposed to glucose deprivation stress, they activate the ATF4/ATF3/CHOP pathways. In the presence of metformin

under these conditions, it induces cell death by suppressing the expression of BCL-2 and BCL-xL [53]. Another study pointed to the involvement of the mTOR pathway in metformin's effects during glucose deprivation in TNBC cells, with mTOR inhibition proving more effective when glucose is absent [54]. In light of these findings, it becomes intriguing to explore whether CAFs protective effects on cancer cells are mediated through these unfolded protein response (UPR) and mTOR (as discussed above) pathways. Notably, consistent with our study's findings regarding the involvement of MCL-1 in the protective effects of CAFs CM, previous research has demonstrated that in vitro conditions of low glucose/metformin and, similarly, in vivo situations of hypoglycemia/metformin, led to a significant decrease in MCL-1 resulting in anti-tumoral effects [56]. This advocates for the repositioning of metformin to indirectly antagonize MCL-1 in breast tumors characterized by a stromal induced hypoglycemic microenvironment, and to enhance the effects of BCL-xL targeting.

METHODS

Primary CAFs and cell lines culture

Fresh human mammary samples were obtained from treatment naive patients with breast carcinoma after surgical resection at the Institut de Cancérologie de l'Ouest, Nantes/Angers, France. Informed consent from enrolled patients was obtained as required by the French Committee for The Protection of Human Subjects, and Protocol was approved by Ministère de la Recherche (agreement n°: DC-2012-1598) and by local ethic committee (agreement n°: CB 2012/06). To isolate CAFs from fresh samples, breast tissues were cut into small pieces in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM Thermo Fisher Scientific #10313021) supplemented with 10% FBS, 2mM glutamine and 1% penicillin/streptomycin and placed in a 100mm plastic dish. CAFs were isolated by their ability to adhere to plastic. After isolation, the fibroblasts were cultured in the same medium and used in the experiments before the ninth passage.

The human breast cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-468 were purchased from American Type Culture Collection (Bethesda, MD, USA) and were cultured in DMEM #10313021 supplemented with 5% FBS and 2mM glutamine.

For the CRISPR Cas9-induced MCL-1 gene extinction, single guide (sg) RNA targeting human MCL-1 was designed using the CRISPR design tool (<http://crispor.tefor.net>). The following guide sequences were cloned in the lentiCRISPRV2 vector that was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid #52961): 5'-CTGGAGACCTTACGACGGGT-3'. Empty vector was used as control. After transduction, cells were selected using 1µg/ml puromycin and MCL-1 extinction was confirmed by immunoblot analysis.

Treatments

ABT-737 (Selleckchem #S1002), S63845 (ChemieTek #CT-S63845), UK5099 (Sigma-Aldrich #PZ0160), ARC-135858 (MedChem Express #HY-13248), 2DG (Sigma-Aldrich #D8375) and metformin (Calbiochem #317240) were used at indicated concentrations. L-alanine (Sigma Aldrich #A7469) and dimethyl- α -ketoglutarate (Sigma Aldrich #349631).

For the experiments, a DMEM containing no glucose, no pyruvate and no glutamine (Thermo Fisher Scientific #A1443001) was used and supplemented with glucose (Sigma-Aldrich #G8769) and/or pyruvate (Sigma-Aldrich #S8636) and/or glutamine (Gibco #25030024) as indicated, with 0.5% FBS.

CAFs conditioned-media assays

For the preparation of CAFs CM, 9 ml of DMEM #A1443001 containing 1mM pyruvate/glucose/glutamine with 0% FBS were added on 100mm dishes of CAFs at 7 to 12.10⁵ cells. After 48h, CAFs CM were collected, centrifuged (2000g, 5min) and supplemented with 0.5% FBS prior to incubation with cancer cells with treatments for additional 48h for analyzing apoptosis or 24h for the other experiments.

Apoptosis assay

Cell death was assessed using an Annexin-V FITC binding assay (Miltenyi #130-092-052) performed according to manufacturer's instructions. Flow-cytometry analysis was performed on Accuri C6 Plus flow cytometer from BD Biosciences. For co-culture apoptosis assay, cell suspension was stained with FITC-conjugated human CD90 antibody (BD Biosciences #555595) prior to Annexin-V APC binding assay (BD Biosciences #550474) according to manufacturer's instructions.

Immunoblot analysis

Cells were resuspended in lysis buffer (RIPA, Thermo-Fisher #98901). After sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), proteins (20 μ g per condition) were transferred to a 0.45 μ M nitrocellulose membrane (Trans-Blot Turbo RTA Transfer kit nitrocellulose midi #1704271) using Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad #1704150, parameters: 25V, 1A, 30 minutes). The membrane was blocked with 5% non fat milk TBS 0.05% Tween 20 for 1h at room temperature and incubated with primary antibody for 1h at room temperature. The membrane was then incubated with appropriate secondary antibody for 1h at room temperature and visualized using the Fusion FX from Vilber. The used primary antibodies were: anti-MCL-1 (Santa Cruz #sc-819), anti-ATF4 (Santa Cruz #sc-390063), anti-phospho-EIF2 α (Cell Signaling #3597), anti-EIF2 α (Cell Signaling #9722), anti- β -actin (Millipore #MAB1501).

Pyruvate and glucose titration assays

DMEM #A1443001 containing 1mM pyruvate/glucose/glutamine with 0% FBS was incubated on CAFs and MDA-MB-468 for 48h. Conditioned-media were then centrifuged (2000g, 10min) to eliminate cellular debris and filtered at 10kDa (Millipore #MRCPRT010). Then, pyruvate colorimetric detection kit (Sigma-Aldrich #MAK071) and glucose colorimetric detection kit (Thermo Scientific #EIAGLUC) were performed according to manufacturers' instructions.

Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) was used for statistical analysis for overall condition effects with GraphPad Prism 10.2 Software. All data are presented as mean +/- SD of at least three independent experiments.

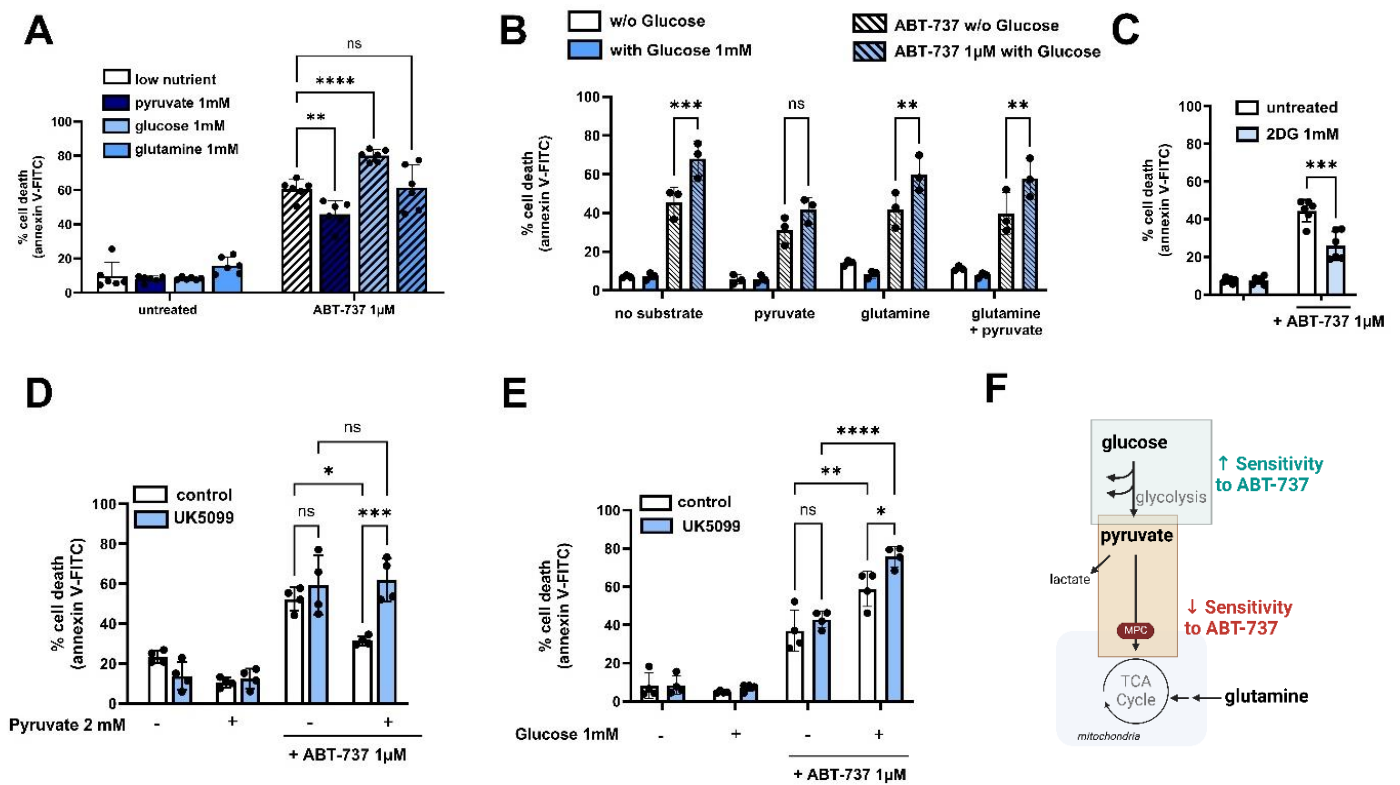


Figure 1. The efficacy of ABT-737 to induce MDA-MB-468 cell death depends on the nutrient context. (A) MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 1 μ M in low nutrient media (lacking pyruvate, glucose and glutamine) supplemented or not with pyruvate 1mM, glucose 1mM or glutamine 1mM. (B) MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 1 μ M in low nutrient media supplemented or not with pyruvate 1mM, glutamine 1mM or glutamine + pyruvate in presence or not of glucose 1mM. (C) MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 1 μ M in media supplemented with pyruvate 1mM, glucose 1mM and glutamine 1mM in presence or not of 2-Deoxy-D- Glucose (2DG) 1mM. (D-E) MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 1 μ M in low nutrient media supplemented or not with (D) pyruvate 1mM or (E) Glucose 1mM in presence or not of UK5099 (MPC1 inhibitor) 2 μ M. Percentage of positive Annexin-V-FITC apoptotic cells was measured by flow cytometry in 3 to 6 different experiments. (F) Summary of the effects of glucose and pyruvate on the sensitivity of MDA-MB-468 cells to ABT-737. P-values were determined by two-factor ANOVA, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$.

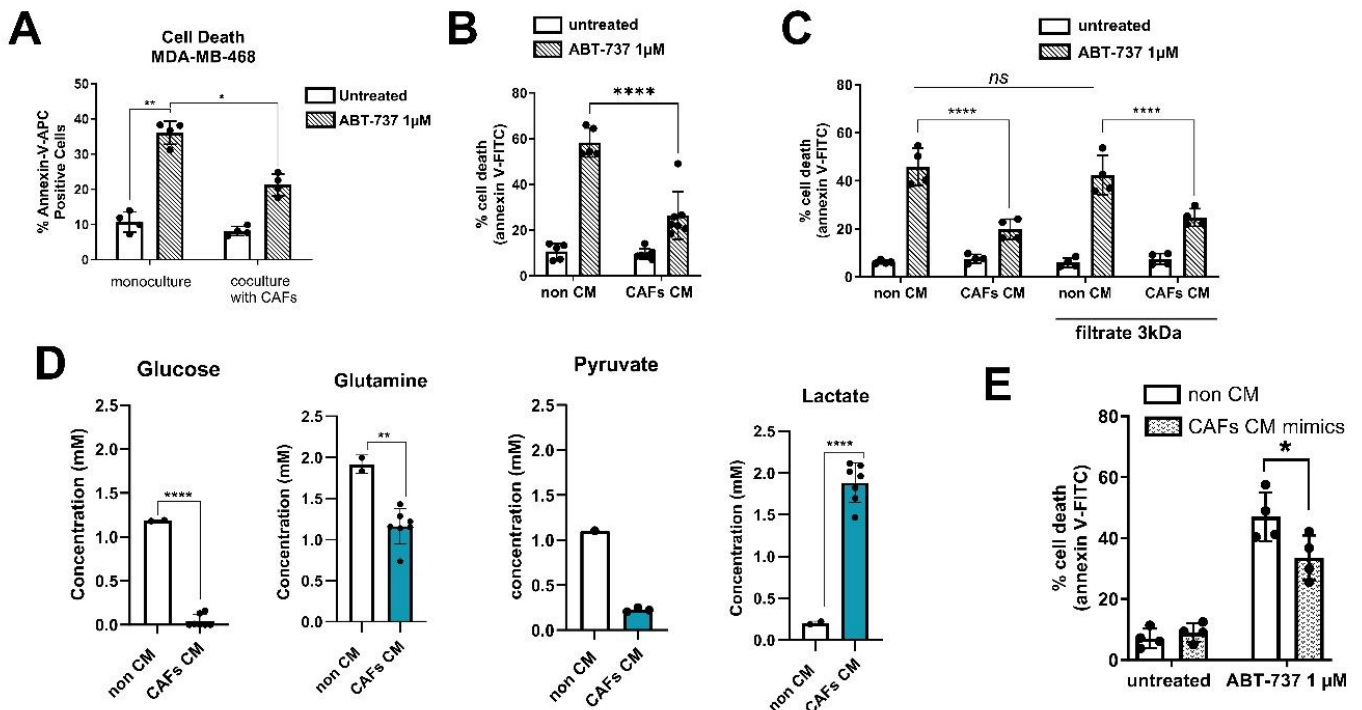


Figure 2. CAFs protect MDA-MB-468 cells from ABT-737 induced cell death by modifying nutrients availability. (A) MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 1 μ M in coculture with CAFs (left) or (B) in presence of CAFs conditioned media (right) or (C) in presence of the fractions \leq 3kDa of CAFs conditioned media. Percentage of positive Annexin-V-FITC apoptotic cells was measured by flow cytometry. (D) CAFs conditioned media contents in pyruvate, glucose, glutamine and lactate expressed in mM (n = 3 to 7). Lactate and glutamine concentrations were measured by mass spectrometry, glucose and pyruvate concentrations were estimated by colorimetric detection. P-values were determined by paired t-test, ** p \leq 0.01 and **** p \leq 0.0001. (E) MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 1 μ M in “CAF mimicking media” i.e. no glucose, 0.2 mM pyruvate and glutamine and 2mM lactate. P-values were determined by two-factor ANOVA, * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, *** p \leq 0.001 and **** p \leq 0.0001.

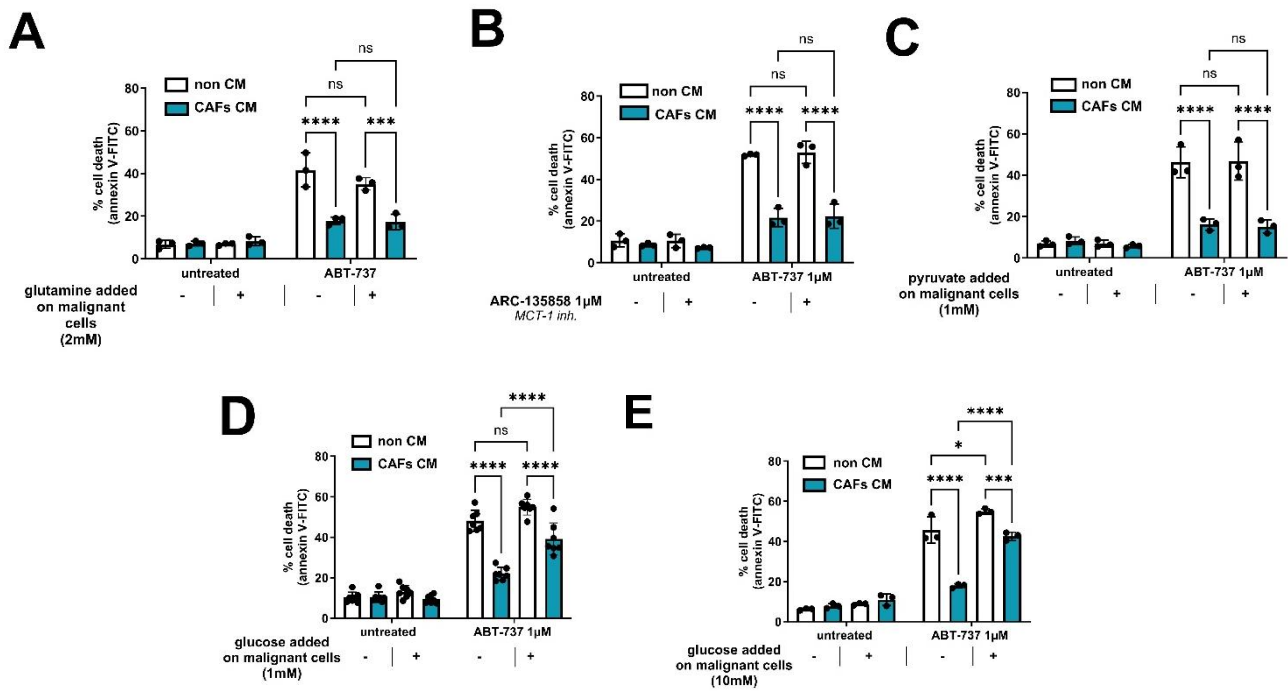


Figure 3. Addition of glucose prevents the protective effects of CAFs on ABT-737-induced cancer cell death. (A-E) MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 1µM in presence or not of CAFs conditioned media supplemented or not with (A) glutamine 1mM, (B) ARC-135858 1µM (MCT-1 inhibitor), (C) pyruvate 1 mM and Glucose 1 or 10 mM (D-E). Percentage of positive Annexin-V-FITC apoptotic cells was measured by flow cytometry in 3 to 6 different experiments. P-values were determined by two-factor ANOVA, * p≤0.05, *** p≤0.001 and **** p≤0.0001.

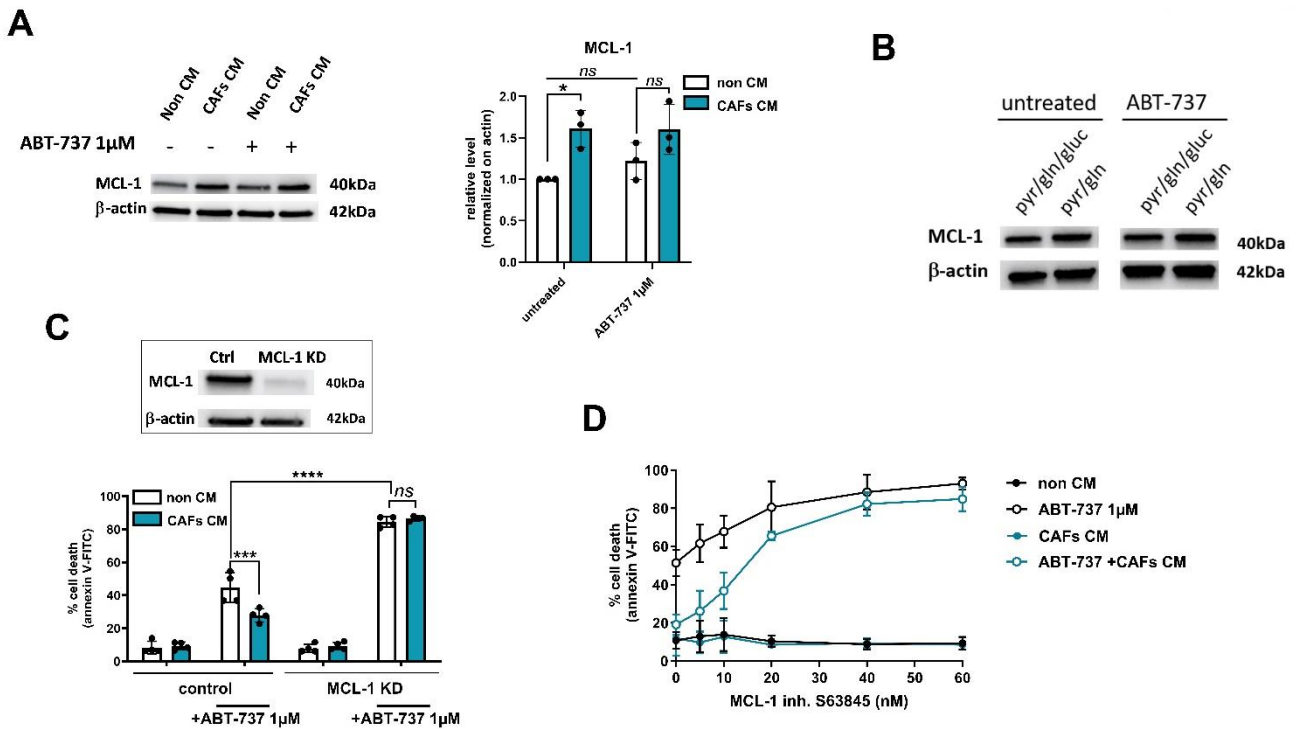


Figure 4. MCL1 implication in CAF CM-/glucose deprivation-mediated protective effects. (A) (Left) Representative experiment of protein expression level (MCL-1) in MDA-MB-468 cells treated or not with ABT-737 1 μ M in presence or not of CAF CM evaluated using western blots. Actin expression was used as loading control. (Right) Quantification of the amounts of MCL-1 protein band relative to actin. Results are expressed as a ratio relative to Control (untreated no CAFs CM). **(B)** Representative experiment of protein expression level (MCL-1) in MDA-MB-468 treated or not with ABT-737 1 μ M in media containing 1mM glucose / glutamine / pyruvate (pyr/gln/gluc) or without glucose (pyr/gln) evaluated using western blots. Actin expression was used as loading control. **(C)** MDA-MB-468 control or knock-down for MCL-1 (MCL-1 KD) were treated for 48 hours with ABT-737 1 μ M in presence or not of CAFs conditioned media. **(D)** MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 1 μ M in presence or not of CAFs conditioned media and increasing dose of MCL-1 inhibitor (S63845). Percentage of positive Annexin-V-FITC apoptotic cells was measured by flow cytometry in 3 to 6 different experiments. P-values were determined by two-factor ANOVA, * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$.

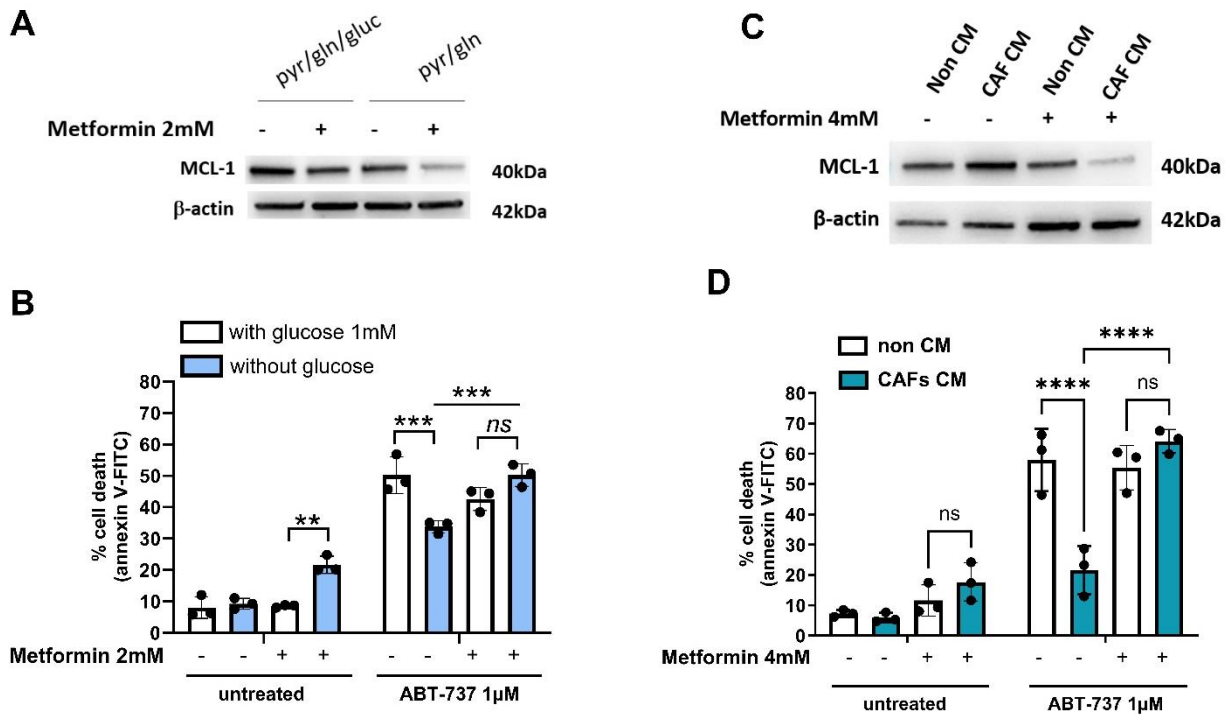


Figure 5. Metformin reverses CAF CM protective effects. (A) Representative experiment of protein expression level (MCL-1) in MDA-MB-468 treated or not with metformin 2mM in media containing 1mM glucose / glutamine / pyruvate (pyr/gln/gluc) or without glucose (pyr/gln) evaluated using western blots. Actin expression was used as loading control. **(B)** MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 1µM in media with or without glucose 1mM in presence or not of metformin 2mM. **(C)** Protein expression level (MCL-1) in MDA-MB-468 cells treated or not with metformin 4mM in non CM or CAFs CM. **(D)** MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 1µM in CAFs CM or not in presence or not of metformin 2mM. Percentage of positive Annexin-V-FITC apoptotic cells was measured by flow cytometry in 3 different experiments. P-values were determined by two-factor ANOVA, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$.

Acknowledgements

We thank members of the “Stress adaptation and tumor escape” laboratory for their support. We benefited from technical support from the Cytometry Core facility (CytoCell) of Nantes University. L. Nocquet was a recipient of French ministry of Higher Education, Research and Innovation and was supported by a fellowship from Ligue contre le cancer (CD44). This work was supported by INCa (SIRIC ILIAD INCa-DGOS INSERM-ITMO Cancer-18011, INCa-PLBIO021-129NN), and departmental committee of LIGUE Contre le Cancer CD44, CD53 and CD22. P.P.J's laboratory is labeled by the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC). P.P.J. acknowledges the Association Ruban Rose for providing support.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

L.N., L. D., M. Cr. and F.S. conducted experiments. L.N., P.P.J and F.S. designed the experiments. L.N., P.P.J and F.S. analyzed the data. M.Ca. gave assistance in collecting tissue samples. L. N., P.P.J. and F.S. wrote the paper. P.P.J. and F.S. obtained funding. P.P.J and F.S. conceived the study and supervised it. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Ethics Approval and Consent to Participate

Informed consent was obtained from enrolled patients and protocol was approved by Ministère de la Recherche (agreement n°: DC-2012-1598) and by local ethic committee (agreement n°: CB 2012/06).

Bibliography

- [1] Female Breast Cancer Subtypes - Cancer Stat Facts. SEER n.d. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast-subtypes.html> (accessed October 2, 2023).
- [2] Sun X, Wang M, Wang M, Yu X, Guo J, Sun T, et al. Metabolic Reprogramming in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol* 2020;10:428. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00428>.
- [3] Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S, Campone M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2013;13:455–65. <https://doi.org/10.1038/nrc3538>.
- [4] Wertz IE, Kusam S, Lam C, Okamoto T, Sandoval W, Anderson DJ, et al. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* 2011;471:110–4. <https://doi.org/10.1038/nature09779>.
- [5] Castellonet O, Ahmad F, Vinik Y, Mills GB, Habermann B, Borg J-P, et al. BCL-XL blockage in TNBC models confers vulnerability to inhibition of specific cell cycle regulators. *Theranostics* 2021;11:9180–97. <https://doi.org/10.7150/thno.60503>.

- [6] Montero J, Haq R. Adapted to Survive: Targeting Cancer Cells with BH3 Mimetics. *Cancer Discov* 2022;12:1217–32. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1334>.
- [7] Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956;123:309–14. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>.
- [8] Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11:325–37. <https://doi.org/10.1038/nrc3038>.
- [9] Marcucci F, Rumio C. Glycolysis-induced drug resistance in tumors-A response to danger signals? *Neoplasia N Y N* 2021;23:234–45. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.12.009>.
- [10] Gao R, Buechel D, Kalathur RKR, Morini MF, Coto-Llerena M, Ercan C, et al. USP29-mediated HIF1 α stabilization is associated with Sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by upregulating glycolysis. *Oncogenesis* 2021;10:52. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00338-7>.
- [11] Ippolito L, Morandi A, Taddei ML, Parri M, Comito G, Iscaro A, et al. Cancer-associated fibroblasts promote prostate cancer malignancy via metabolic rewiring and mitochondrial transfer. *Oncogene* 2019. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0805-7>.
- [12] Birsoy K, Wang T, Chen WW, Freinkman E, Abu-Remaileh M, Sabatini DM. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell* 2015;162:540–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.016>.
- [13] Ahn CS, Metallo CM. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer Metab* 2015;3:1. <https://doi.org/10.1186/s40170-015-0128-2>.
- [14] LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, et al. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol* 2014;16:992–1003, 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncb3039>.
- [15] El-Botty R, Morriset L, Montaudon E, Tariq Z, Schnitzler A, Bacci M, et al. Oxidative phosphorylation is a metabolic vulnerability of endocrine therapy and palbociclib resistant metastatic breast cancers. *Nat Commun* 2023;14:4221. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40022-5>.
- [16] Choi J, Kim DH, Jung WH, Koo JS. Metabolic interaction between cancer cells and stromal cells according to breast cancer molecular subtype. *Breast Cancer Res* 2013;15. <https://doi.org/10.1186/bcr3472>.
- [17] Mak TK, Li X, Huang H, Wu K, Huang Z, He Y, et al. The cancer-associated fibroblast-related signature predicts prognosis and indicates immune microenvironment infiltration in gastric cancer. *Front Immunol* 2022;13:951214. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.951214>.
- [18] Gu J, Wang C, Xu X, Zhao L, Zhou J, Bai C, et al. Immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer as a potential prognostic biomarker of survival: meta-analysis. *Transl Cancer Res* 2020;9. <https://doi.org/10.21037/tcr-20-2365>.
- [19] Knops AM, South A, Rodeck U, Martinez-Outschoorn U, Harshyne LA, Johnson J, et al. Cancer-Associated Fibroblast Density, Prognostic Characteristics, and Recurrence in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Front Oncol* 2020;10:565306. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.565306>.
- [20] Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 2009;15:68–74. <https://doi.org/10.1038/nm.1908>.
- [21] Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Pelon F, Bourachot B, Cardon M, et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* 2018;33:463–479.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.011>.
- [22] Kieffer Y, Hocine HR, Gentric G, Pelon F, Bernard C, Bourachot B, et al. Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Clusters Linked to Immunotherapy Resistance in Cancer. *Cancer Discov* 2020;10:1330–51. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1384>.
- [23] Shintani Y, Fujiwara A, Kimura T, Kawamura T, Funaki S, Minami M, et al. IL-6 Secreted from Cancer-Associated Fibroblasts Mediates Chemoresistance in NSCLC by Increasing Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2016;11:1482–92. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.025>.
- [24] Tao L, Huang G, Wang R, Pan Y, He Z, Chu X, et al. Cancer-associated fibroblasts treated with cisplatin facilitates chemoresistance of lung adenocarcinoma through IL-11/IL-11R/STAT3 signaling pathway. *Sci Rep* 2016;6:38408. <https://doi.org/10.1038/srep38408>.
- [25] Long X, Xiong W, Zeng X, Qi L, Cai Y, Mo M, et al. Cancer-associated fibroblasts promote cisplatin resistance in bladder cancer cells by increasing IGF-1/ER β /Bcl-2 signalling. *Cell Death Dis* 2019;10:375. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1581-6>.

- [26] Wang L, Li X, Ren Y, Geng H, Zhang Q, Cao L, et al. Cancer-associated fibroblasts contribute to cisplatin resistance by modulating ANXA 3 in lung cancer cells. *Cancer Sci* 2019;110:1609–20. <https://doi.org/10.1111/cas.13998>.
- [27] Weigel KJ, Jakimenko A, Conti BA, Chapman SE, Kaliney WJ, Leevy WM, et al. CAF-secreted IGF1Ps regulate breast cancer cell anoikis. *Mol Cancer Res MCR* 2014;12:855–66. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0090>.
- [28] Fiaschi T, Marini A, Giannoni E, Taddei ML, Gandellini P, De Donatis A, et al. Reciprocal Metabolic Reprogramming through Lactate Shuttle Coordinately Influences Tumor-Stroma Interplay. *Cancer Res* 2012;72:5130–40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1949>.
- [29] Louault K, Bonneaud TL, Séveno C, Gomez-Bougie P, Nguyen F, Gautier F, et al. Interactions between cancer-associated fibroblasts and tumor cells promote MCL-1 dependency in estrogen receptor-positive breast cancers. *Oncogene* 2019;38:3261–73. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0635-z>.
- [30] Sousa CM, Biancur DE, Wang X, Halbrook CJ, Sherman MH, Zhang L, et al. Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature* 2016;536:479–83. <https://doi.org/10.1038/nature19084>.
- [31] Sun K, Tang S, Hou Y, Xi L, Chen Y, Yin J, et al. Oxidized ATM-mediated glycolysis enhancement in breast cancer-associated fibroblasts contributes to tumor invasion through lactate as metabolic coupling. *EBioMedicine* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.025>.
- [32] Sakamoto A, Kunou S, Shimada K, Tsunoda M, Aoki T, Iriyama C, et al. Pyruvate secreted from patient-derived cancer-associated fibroblasts supports survival of primary lymphoma cells. *Cancer Sci* 2019;110:269–78. <https://doi.org/10.1111/cas.13873>.
- [33] Yang L, Achreja A, Yeung T-L, Mangala LS, Jiang D, Han C, et al. Targeting Stromal Glutamine Synthetase in Tumors Disrupts Tumor Microenvironment-Regulated Cancer Cell Growth. *Cell Metab* 2016;24:685–700. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.011>.
- [34] Martinez-Outschoorn UE, Trimmer C, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Zhou J, et al. Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NFκB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell Cycle Georget Tex* 2010;9:3515–33. <https://doi.org/10.4161/cc.9.17.12928>.
- [35] Bertero T, Oldham WM, Grasset EM, Bourget I, Boulter E, Pisano S, et al. Tumor-Stroma Mechanics Coordinate Amino Acid Availability to Sustain Tumor Growth and Malignancy. *Cell Metab* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.012>.
- [36] Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP, Sotgia F. Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Semin Cancer Biol* 2014;25:47–60. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.01.005>.
- [37] Sung JS, Kang CW, Kang S, Jang Y, Chae YC, Kim BG, et al. ITGB4-mediated metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* 2020;39:664–76. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1014-0>.
- [38] Zhang D, Wang Y, Shi Z, Liu J, Sun P, Hou X, et al. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by IDH3α downregulation. *Cell Rep* 2015;10:1335–48. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.006>.
- [39] Pelicano H, Zhang W, Liu J, Hammoudi N, Dai J, Xu R-H, et al. Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: role of mTOR pathway and therapeutic potential. *Breast Cancer Res BCR* 2014;16:434. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0434-6>.
- [40] Ripoll C, Roldan M, Ruedas-Rama MJ, Orte A, Martin M. Breast Cancer Cell Subtypes Display Different Metabolic Phenotypes That Correlate with Their Clinical Classification. *Biology* 2021;10:1267. <https://doi.org/10.3390/biology10121267>.
- [41] Gámez-Pozo A, Berges-Soria J, Arevalillo JM, Nanni P, López-Vacas R, Navarro H, et al. Combined Label-Free Quantitative Proteomics and microRNA Expression Analysis of Breast Cancer Unravel Molecular Differences with Clinical Implications. *Cancer Res* 2015;75:2243–53. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1937>.
- [42] Yamaguchi R, Janssen E, Perkins G, Ellisman M, Kitada S, Reed JC. Efficient Elimination of Cancer Cells by Deoxyglucose-ABT-263/737 Combination Therapy. *PLoS ONE* 2011;6:e24102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024102>.
- [43] Zagorodna O, Martin SM, Rutkowski DT, Kuwana T, Spitz DR, Knudson CM. 2-Deoxyglucose-induced toxicity is regulated by Bcl-2 family members and is enhanced by antagonizing Bcl-2 in lymphoma cell lines. *Oncogene* 2012;31:2738–49. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.454>.

- [44] Maximchik P, Abdrakhmanov A, Inozemtseva E, Tyurin-Kuzmin PA, Zhivotovsky B, Gogvadze V. 2-Deoxy-D-glucose has distinct and cell line-specific effects on the survival of different cancer cells upon antitumor drug treatment. *FEBS J* 2018;285:4590–601. <https://doi.org/10.1111/febs.14687>.
- [45] Hu Y-L, Yin Y, Liu H-Y, Feng Y-Y, Bian Z-H, Zhou L-Y, et al. Glucose deprivation induces chemoresistance in colorectal cancer cells by increasing ATF4 expression. *World J Gastroenterol* 2016;22:6235–45. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i27.6235>.
- [46] Ledoux S, Yang R, Friedlander G, Laouari D. Glucose Depletion Enhances P-Glycoprotein Expression in Hepatoma Cells: Role of Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Cancer Res* 2003;63:7284–90.
- [47] Vaziri-Gohar A, Hue JJ, Abbas A, Graor HJ, Hajihassani O, Zarei M, et al. Increased glucose availability sensitizes pancreatic cancer to chemotherapy. *Nat Commun* 2023;14:3823. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38921-8>.
- [48] Leprivier G, Rotblat B. How does mTOR sense glucose starvation? AMPK is the usual suspect. *Cell Death Discov* 2020;6:27. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0260-9>.
- [49] Xie Y, Lei X, Zhao G, Guo R, Cui N. mTOR in programmed cell death and its therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev* 2023;71–72:66–81. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2023.06.002>.
- [50] Hung C-M, Garcia-Haro L, Sparks CA, Guertin DA. mTOR-Dependent Cell Survival Mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a008771. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008771>.
- [51] Daniels VW, Zoeller JJ, van Gastel N, McQueeney KE, Parvin S, Potter DS, et al. Metabolic perturbations sensitize triple-negative breast cancers to apoptosis induced by BH3 mimetics. *Sci Signal* 2021;14:eabc7405. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abc7405>.
- [52] Coloff JL, Macintyre AN, Nichols AG, Liu T, Gallo CA, Plas DR, et al. Akt-dependent glucose metabolism promotes Mcl-1 synthesis to maintain cell survival and resistance to Bcl-2 inhibition. *Cancer Res* 2011;71:5204–13. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4531>.
- [53] Li Y, Zhang Q, Yang J, He W, Jiang Y, Chen Y, et al. Metformin combined with glucose starvation synergistically suppress triple-negative breast cancer by enhanced unfolded protein response. *Biochem Biophys Res Commun* 2023;675:146–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.07.029>.
- [54] Varghese S, Samuel SM, Varghese E, Kubatka P, Büsselberg D. High Glucose Represses the Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effect of Metformin in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Biomolecules* 2019;9:16. <https://doi.org/10.3390/biom9010016>.
- [55] Samuel SM, Varghese E, Satheesh NJ, Triggle CR, Büsselberg D. Metabolic heterogeneity in TNBCs: A potential determinant of therapeutic efficacy of 2-deoxyglucose and metformin combinatory therapy. *Biomed Pharmacother Biomedicine Pharmacother* 2023;164:114911. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114911>.
- [56] Elgendy M, Cirò M, Hosseini A, Weizmann J, Mazzarella L, Ferrari E, et al. Combination of Hypoglycemia and Metformin Impairs Tumor Metabolic Plasticity and Growth by Modulating the PP2A-GSK3 β -MCL-1 Axis. *Cancer Cell* 2019;35:798-815.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.03.007>.

Supplementary methods

Cell proliferation

We performed live-cell imaging using an IncuCyte FLR imaging system (Essen BioScience). Briefly, MDA-MB-468 cancer cells (20 000 cells) were plated into 24-well plates in DMEM #10313021 supplemented with 5% FBS and 2mM glutamine. The day after, media containing different nutrient concentrations or CAFs CM were incubated on cells as indicated, supplemented with 0,5% FBS. Plates were scanned every 2h for 30 h, scanning 9 fields per well. Cells were counted by phase contrast analysis and results were expressed as relative number of cells compared to the initial number in control condition.

Biochemical characterization of protective factors presented in CAFs derived CM

In an attempt to document the nature of the secreted factors implicated in CAFs protective effects, conditioned media were heated at 90°C for 10 min prior to incubation on MDA-MB-468.

Quantification of amino acids by mass spectrometry

Amino acids from conditioned media were derivatized and quantified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as described previously [1,2]. The list of selected amino acids and their respective MS/MS parameters are available in [Supplemental Table 1](#).

Supplemental Table 1. Mass spectrometry parameters of selected amino acid species. Italic indicates internal standards.

Amino acid	Parent ion	Daughter ion	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Aspartic acid	246.1	144.0	30	20
<i>¹⁵N-Aspartic acid</i>	<i>247.1</i>	<i>145.0</i>	<i>30</i>	<i>20</i>
Glutamic acid	260.1	83.9	30	20
<i>¹⁵N-Glutamic acid</i>	<i>261.1</i>	<i>84.9</i>	<i>30</i>	<i>20</i>
Alanine	146.1	56.9	30	15
<i>¹³C-Alanine</i>	<i>147.1</i>	<i>56.9</i>	<i>30</i>	<i>15</i>
Arginine	231.1	69.9	30	20
<i>¹³C-Arginine</i>	<i>232.1</i>	<i>69.9</i>	<i>30</i>	<i>20</i>
Asparagine	189.1	73.9	30	20
<i>¹⁵N₂-Asparagine</i>	<i>191.1</i>	<i>74.9</i>	<i>30</i>	<i>20</i>
Cysteine	178.1	75.9	30	15
<i>d₃-Cysteine</i>	<i>181.1</i>	<i>78.9</i>	<i>30</i>	<i>15</i>
Glutamine	203.1	83.9	30	20
<i>¹⁵N-Glutamine</i>	<i>204.1</i>	<i>84.9</i>	<i>30</i>	<i>20</i>

Glycine	132.1	56.9	30	15
¹³ C-Glycine	133.1	56.9	30	15
Histidine	212.2	109.9	30	20
¹⁵ N ₃ -Histidine	215.2	112.9	30	20
Isoleucine / Leucine	188.2	85.9	30	15
¹⁵ N-Leucine	189.2	86.9	30	15
Lysine	203.1	83.9	30	20
¹³ C ₆ -Lysine	209.1	88.9	30	15
Methionine	206.2	103.9	30	15
¹³ C-d ₃ -Methionine	210.2	107.9	30	15
Phenylalanine	222.2	120.2	30	20
d ₅ -Phénylalanine	227.2	125.2	30	20
Proline	172.1	69.9	30	20
¹³ C-Proline	173.1	70.9	30	20
Serine	162.1	59.9	30	15
¹⁵ N-Serine	163.1	60.9	30	15
Threonine	176.1	73.9	30	15
¹⁵ N-Thréonine	177.1	74.9	30	15
Tryptophane	261.2	132.0	30	20
d ₅ -Tryptophane	266.2	137.0	30	20
Tyrosine	238.2	136.0	30	20
¹⁵ N-Tyrosine	239.2	137.0	30	20
Valine	174.1	71.9	30	20
¹³ C-Valine	175.1	71.9	30	20

Quantification of organic acids by mass spectrometry

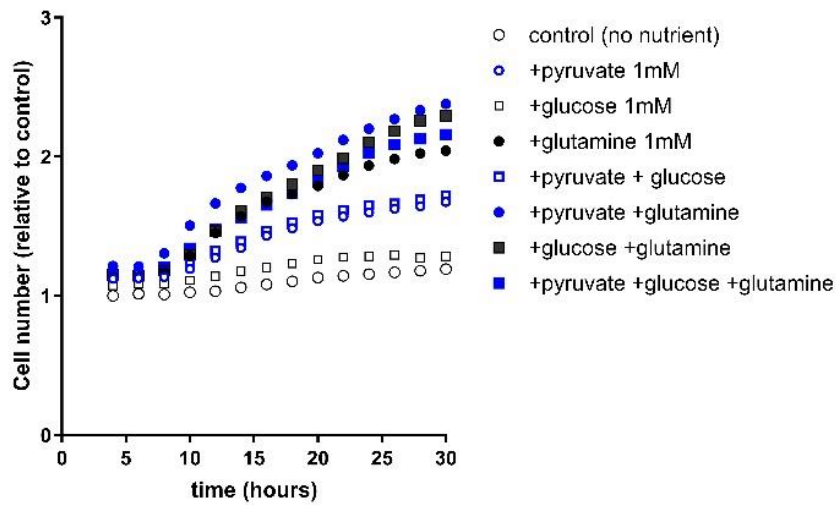
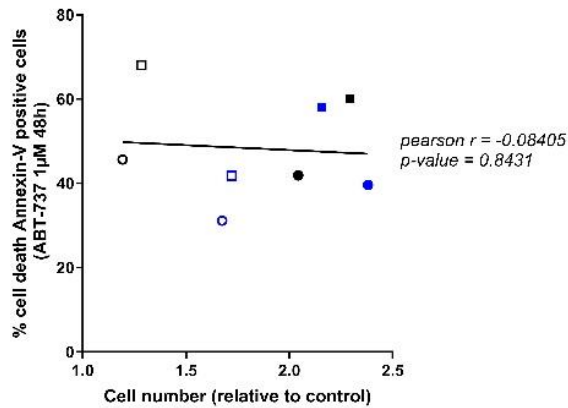
Organic acids were analysed by LC-MS/MS in conditioned media. All solvents were LC-MS grade and purchased from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands). Standard compounds were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). A pool of reference standard solutions (unlabelled compounds) was prepared and serially diluted in water to obtain 7 standard solutions ranging 0.5-500 µmol/L. Exogenous labelled compounds (internal standards, 20 µL, 500 µmol/L in water) were added to 20 µL of conditioned media or standard solutions. Protein content was then precipitated by the addition of acetonitrile (80 µL). After centrifugation (10 min at 10,000 g), supernatants were recovered and derivatized by the addition of 2% triethylamine (80 µL, diluted in acetonitrile) and 4-(dimethylamino)phenacyl bromide (80 µL, 30 mg/mL in acetonitrile). Samples were incubated for 1h at 65 °C and the reaction was stopped by the addition of 2% formic acid (300 µL). Samples were incubated 30 min at 65 °C and directly injected into the LC-MS/MS system. LC-MS/MS analyses were performed on a Xevo TQD mass spectrometer with an electrospray interface and an Acquity H-Class

UPLC device (Waters Corporation, Milford, USA). Samples (10 μ L) were injected onto a UPLC BEH C18 column (2.1 x 100 mm; 1.7 μ m id; Waters Corporation) held at 60 °C, and compounds were separated with a linear gradient of mobile phase B (100% acetonitrile, 0.1% formic acid) in mobile phase A (5% acetonitrile, 0.1% formic acid, 10 mmol/L ammonium formate) at a flow rate of 400 mL/min. Mobile phase B was kept constant for 1 min at 5%, linearly increased from 5% to 95% for 5 min, kept constant for 1 min, returned to the initial condition over 1 min, and kept constant for 1 min before the next injection. Targeted compounds were then detected by the mass spectrometer with the electrospray interface operating in the positive ion mode (capillary voltage, 3.5 kV; desolvation gas (N₂) flow and temperature, 600 L/h and 350 °C; source temperature, 150 °C). The multiple reaction monitoring mode was applied for MS/MS detection as detailed in [Supplemental Table 2](#). Chromatographic peak area ratios between unlabelled compounds and their respective internal standards constituted the detector responses. Standard solutions were used to plot calibration curves for quantification. Data acquisition and analyses were performed with MassLynx and TargetLynx (version 4.0, Waters Corporation) software, respectively.

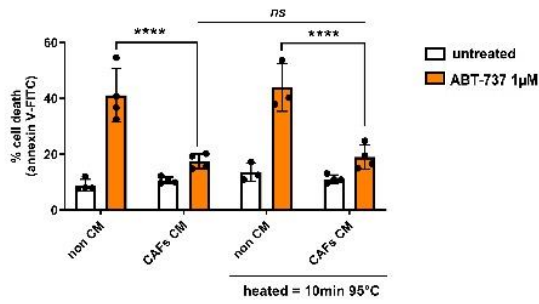
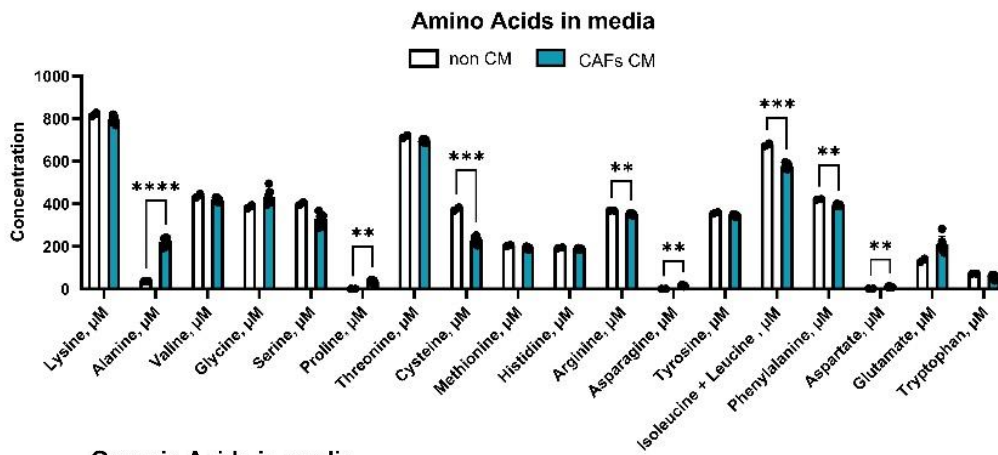
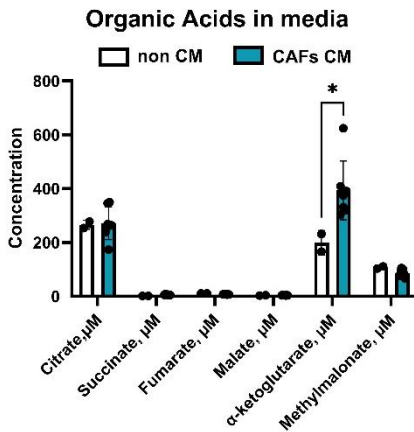
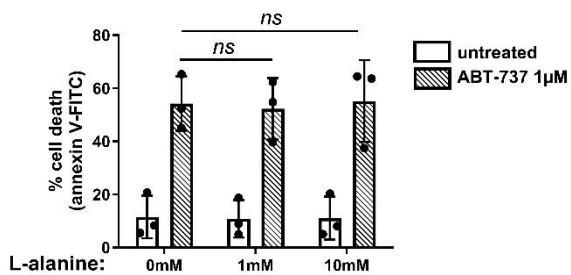
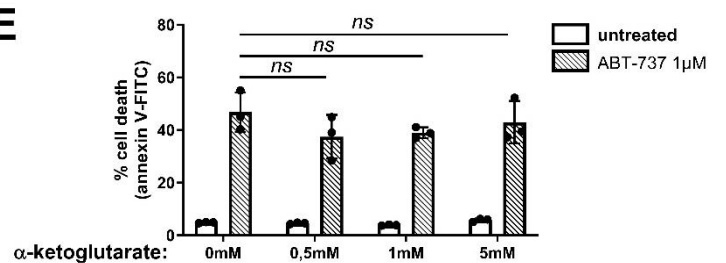
Supplemental Table 2. Mass spectrometry parameters of selected organic acid species. Italic indicates internal standards.

Organic acid	Parent ion	Daughter ion	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Citric acid	676.4	134.0	40	35
<i>¹³C₂- Citric acid</i>	<i>678.4</i>	<i>134.0</i>	<i>40</i>	<i>35</i>
Lactic acid	252.0	134.0	30	30
<i>¹³C₃- Lactic acid</i>	<i>255.0</i>	<i>134.0</i>	<i>30</i>	<i>30</i>
α -ketoglutaric acid	469.2	134.0	40	27
Malic acid	457.2	134.0	30	35
<i>¹³C-malic acid</i>	<i>458.2</i>	<i>134.0</i>	<i>30</i>	<i>35</i>
Malonic acid	427.1	134.0	40	35
Methylmalonic acid	441.2	134.1	40	30
<i>¹³C₂-Malonic acid</i>	<i>429.1</i>	<i>134.0</i>	<i>40</i>	<i>35</i>
Fumaric acid	439.1	134.0	40	35
Succinic acid	441.2	134.0	30	30
<i>d₄-Succinic acid</i>	<i>445.2</i>	<i>134.0</i>	<i>30</i>	<i>30</i>

- [1] Conan P, Léon A, Gourdel M, Rollet C, Chair L, Caroff N, et al. Identification of 8-Hydroxyquinoline Derivatives That Decrease Cystathionine Beta Synthase (CBS) Activity. *Int J Mol Sci* 2022;23:6769. <https://doi.org/10.3390/ijms23126769>.
- [2] Wargny M, Croyal M, Ragot S, Gand E, Jacobi D, Trochu J-N, et al. Nutritional biomarkers and heart failure requiring hospitalization in patients with type 2 diabetes: the SURDIAGENE cohort. *Cardiovasc Diabetol* 2022;21:101. <https://doi.org/10.1186/s12933-022-01505-9>.

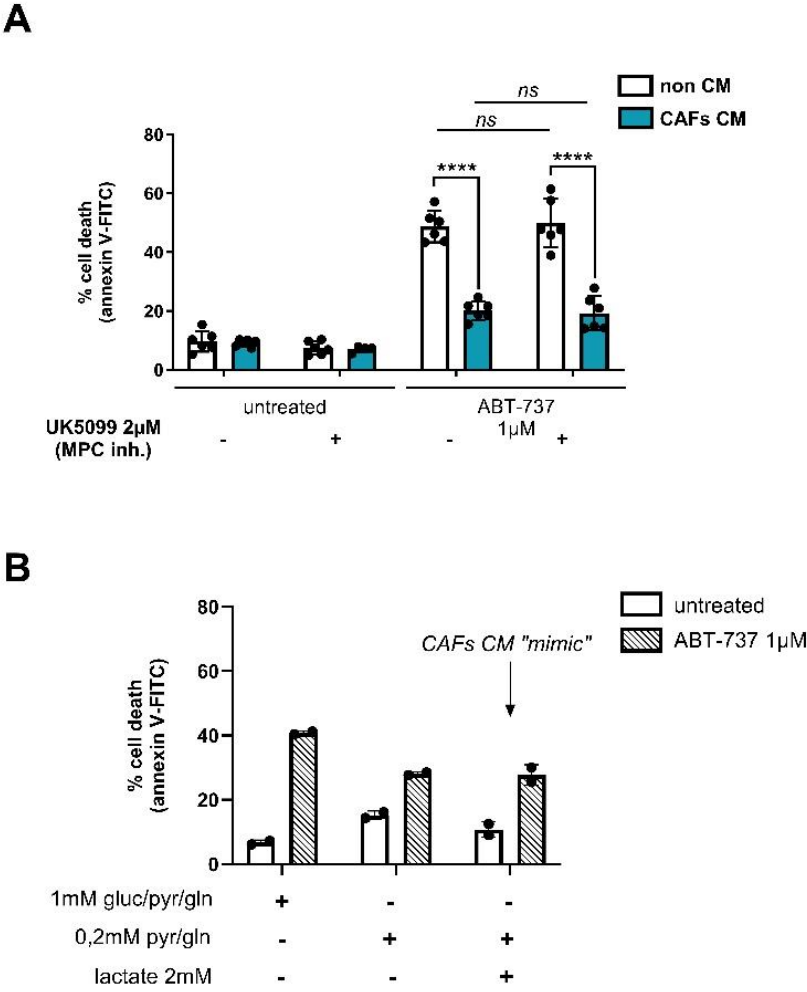
A**B**

Supplementary figure 1: A. MDA-MB-468 cells were incubated in low nutrient media (lacking glucose, pyruvate et glutamine) supplemented or not with pyruvate, glucose or glutamine as indicated on the graph. MDA-MB-468 cells proliferation were measured with live-cell imaging for 30h. Results were expressed as relative number of cells compared to the initial number in control condition. **B.** Correlation between cell proliferation rate at 30h and percentage of cell death induced by ABT-737 1μM.

A**B****C****D****E**

Supplementary figure 2: A. CAFs protective effects in TNBC cells rely on soluble thermoresistant factors. MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 (1 μ M) in presence of non CM or

heat-denatured (or not) CAFs CM. **B.** Amino acids content of media after conditioning for 48h by CAFs (compared to initial media). **C.** Organic acids content of media after conditioning or 48h by CAFs (compared to initial media) **D-E.** Effect of alanine (D) or α -ketoglutarate (C) added in low nutrient media on ABT-737 (1 μ M, 48 hours) induced cell death in MDA-MB-468 cells.



Supplementary figure 3: A. MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 1 μ M in presence or not of CAFs conditioned media in presence or not of UK-5099 (MPC inhibitor). Percentage of positive Annexin-V-FITC apoptotic cells was measured by flow cytometry in 6 different experiments. **B.** MDA-MB-468 cells were treated for 48 hours with ABT-737 1 μ M in media containing 1mM pyruvate/glucose/glutamine or no glucose, 0.2 mM pyruvate/glutamine and with or without 2mM lactate. Percentage of positive Annexin-V-FITC apoptotic cells was measured by flow cytometry in 2 different experiments.

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Ainsi, nous avons montré le rôle protecteur des CAFs contre l'apoptose de cellules malignes de CSTN induite par l'ABT-737. Ce rôle protecteur implique en particulier une déprivation en glucose dans le milieu et la présence de la protéine anti-apoptotique MCL-1. Nous avons généré des résultats supplémentaires afin de préciser l'impact des CAFs sur les cellules malignes.

Nous avons tout d'abord cherché à préciser le caractère généralisable ou non du phénomène de protection par les CAFs sur d'autres cellules malignes de cancer du sein. Nous avons également étudié l'impact des CAFs sur le métabolisme des MDA-MB-468 par des techniques d'analyse métabolique. Enfin, nous avons investigué plus généralement par RNAsequencing les processus cellulaires modulés par les CAFs qui pourraient être impliqués dans leur rôle protecteur.

Les mécanismes cellulaires à l'origine des effets protecteurs des CAFs différent selon les lignées cancéreuses

Une étude précédente de l'équipe avait montré que les lignées de cancers du sein de type luminal (ZR-75 et T47D), plutôt BCL-2 dépendantes, subissaient sous la pression des CAFs une transition vers une dépendance à MCL-1. Cette transition vers la dépendance à MCL-1 était médiée par l'activation de ERK en réponse à la sécrétion de cytokines et notamment d'IL-6 par les CAFs (Louault et al., 2019)

Au cours de ma thèse, nous avons montré que les effets des CAFs dans la modulation de la sensibilité à l'ABT-737 de la lignée de CSTN MDA-MB-468 étaient médiés par des mécanismes différents impliquant une compétition pour le glucose. Nous avons mis en évidence des différences de sensibilité de ces cellules à l'ABT-737 selon le contexte nutritif avec une baisse de sensibilité par le pyruvate et à l'inverse une augmentation de la sensibilité par le glucose. Nous nous sommes demandé si ces effets étaient retrouvés dans d'autres lignées de cancer du sein. Nous avons ainsi regardé l'impact du contexte nutritif sur la sensibilité à l'ABT-737 dans une autre lignée de CSTN MDA-MB-231 et dans une lignée de cancer luminal ZR-75-1. Nous montrons que comme pour les MDA-MB-468, l'ajout de pyruvate dans un milieu appauvri limite la sensibilité des MDA-MB-231 à l'apoptose (**Figure 34A**) et que l'ajout de glucose tend à augmenter la sensibilité à l'ABT-737 (**Figure 34B**). Etonnamment, l'ajout de l'inhibiteur de la glycolyse 2DG sensibilise les MDA-MB-231 à l'apoptose (**Figure 34C**), contrairement au résultat retrouvé avec les MDA-MB-468. Aucune modulation du contexte nutritif testée ne modifie la sensibilité à l'apoptose de la lignée luminale ZR-75-1 (**Figure 34D-F**). Ainsi, ces expériences montrent que la dépendance au contexte nutritif de la sensibilité à l'apoptose semble être une caractéristique des lignées CSTN.

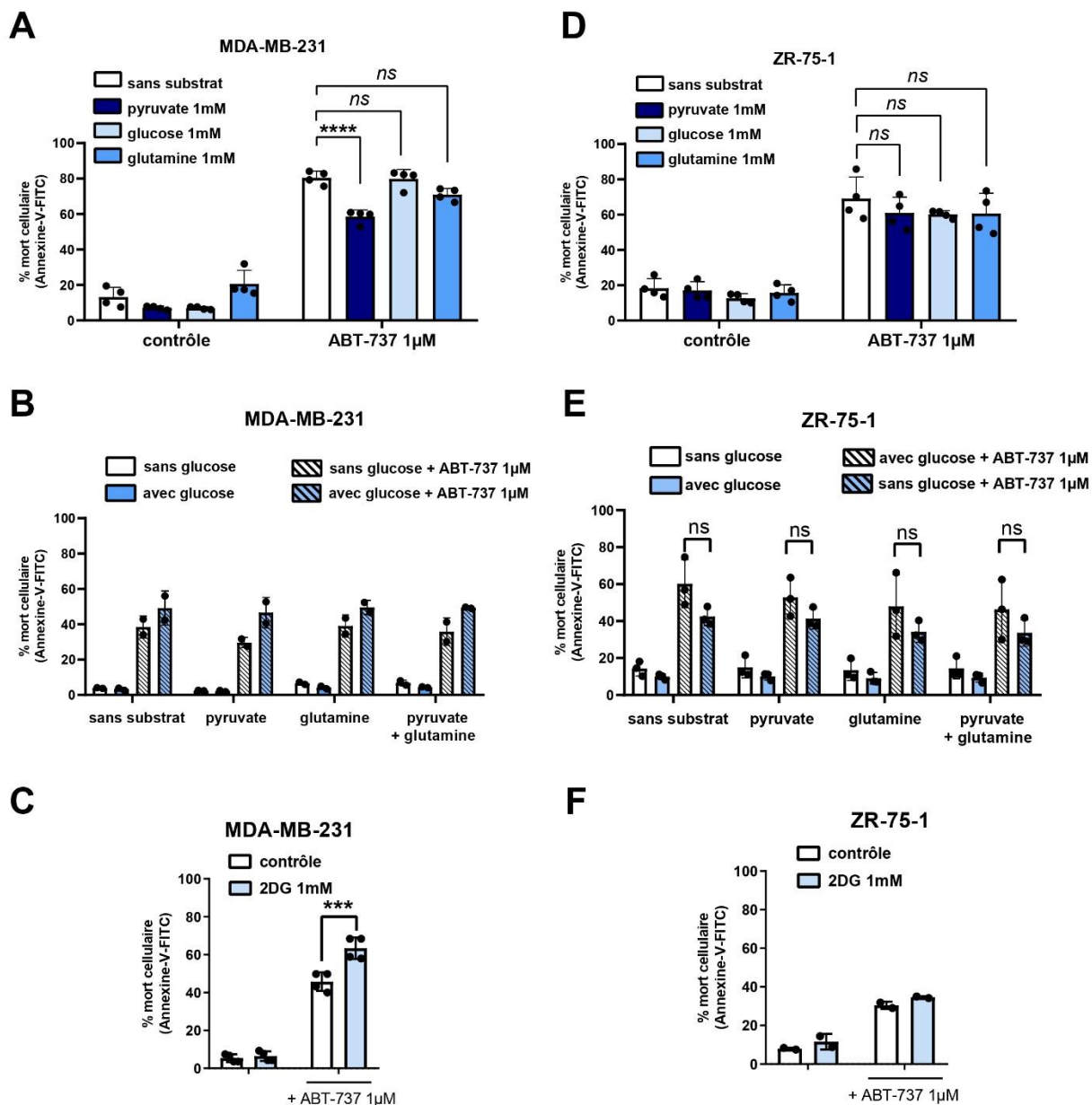


Figure 34 : Différentes dépendances métaboliques en présence d'ABT-737 en fonction des lignées cancéreuses

A.D. Sensibilité des lignées de *CSTN* MDA-MB-231 (A) et luminaire ZR-75-1 (D) à l'ABT-737 (1µM, 48h de traitement) en présence ou non de pyruvate, glucose ou glutamine aux concentrations indiquées. **B.E.** Effet du glucose sur la sensibilité des MDA-MB-231 (B) et ZR-75-1 (E) à l'ABT-737 en présence ou non de pyruvate et/ou de glutamine aux concentrations indiquées. **C.F.** Effet du 2-désoxy-D-glucose (2DG, 1mM) sur la sensibilité des MDA-MB-231 (C) et ZR-75-1 (F) à l'ABT-737 dans un milieu contenant 1mM glucose/pyruvate/glutamine. Les P-values ont été déterminées en réalisant un test ANOVA à 2 facteurs, *** $p \leq 0.001$.

Nous nous sommes alors demandé si les effets protecteurs des milieux conditionnés de CAFs (MC CAFs) obéissaient aux mêmes règles. Nous montrons tout d'abord que lorsqu'ils sont générés à partir d'un milieu DMEM riche en glucose (25mM), en glutamine (2mM) et avec du pyruvate (1mM), les MC CAFs

protègent les cellules luminales ZR-75-1 (**Figure 35A**)(conditions utilisées dans Louault et al., 2019). En revanche, lorsque les MC CAFs sont générés à partir du milieu DMEM contenant 1mM glucose/pyruvate/glutamine (utilisé dans l'ensemble des expériences du 2nd article de la thèse), ils ne protègent plus les ZR-75-1 de l'apoptose induite par l'ABT-737 (**Figure 35B**). Les MC CAFs générés dans ces mêmes conditions ne protègent pas non plus les MDA-MB-231 et les HS578T, une autre lignée de CSTN, de l'apoptose induite par l'ABT-737 (**Figures 35C-D**). Ainsi, l'effet des MC CAFs sur la sensibilité à l'apoptose dans les conditions limitantes en nutriments, qui se rapprochent des conditions physiologiques, semble dépendre de la lignée de cancer du sein étudiée, en lien potentiellement avec les capacités métaboliques de ces lignées et leur statut mutationnel.

Etant donné ces variations d'effets observés avec les cellules cancéreuses, nous avons cherché si le sous-type de cancer dont les CAFs sont issus peut influencer sur leurs effets protecteurs. Dans l'ensemble des expériences de l'étude, nous avons utilisé des CAFs issus de patientes atteintes de CSTN pour étudier les effets sur une lignée de même sous type. Nous montrons dans la **Figure 35E** que des milieux conditionnés générés à partir de CAFs issus de cancers luminaux protègent également nettement les MDA-MB-468 de l'ABT-737. Ce résultat indique donc que les effets protecteurs des MC CAFs ne dépendent pas du sous-type luminal ou triple-négatif de la tumeur d'origine du CAFs.

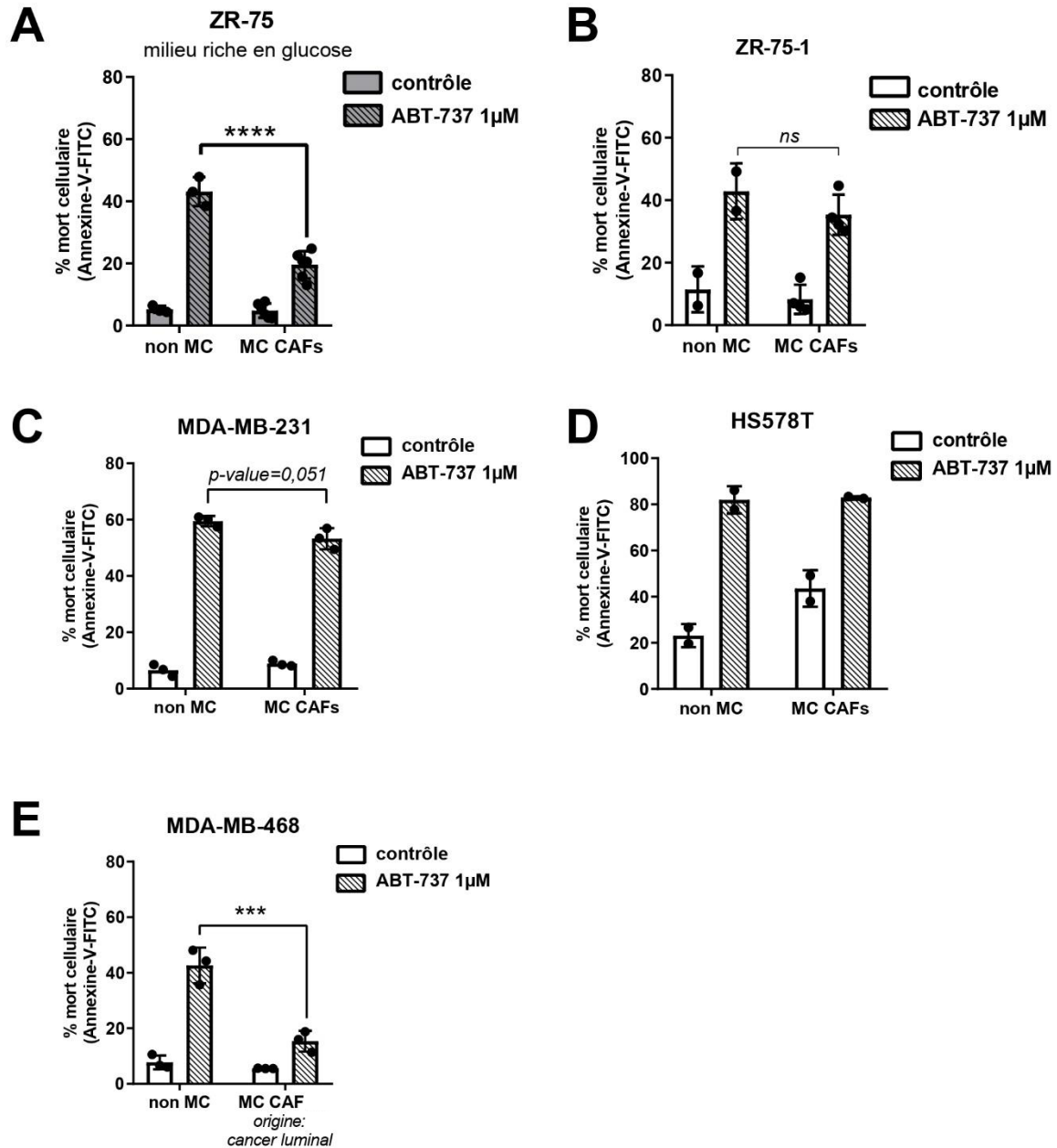


Figure 35 : Effet protecteur des milieux conditionnés de CAFs (MC CAFs) sur différentes lignées de cancer du sein puis avec des CAFs issus de cancer luminal

A. Effet des MC CAFs générés à partir d'un milieu contenant glucose (25mM)/glutamine (2mM)/pyruvate (1mM) sur la sensibilité de la lignée de cancer du sein luminal ZR-75-1 à l'ABT-737 (1µM, 48h de traitement) **B.C.D** Effet des MC CAFs générés à partir du milieu contenant 1mM glucose/pyruvate/glutamine sur la sensibilité de la lignée ZR-75-1 (B) et des lignées de CSTN MDA-MB-231 (C) et HS578T (D) à l'ABT-737 (1µM, 48h de traitement). **E.** Effet de MC CAFs issus de tumeurs lumineales sur la sensibilité des MDA-MB-468 à l'ABT-737 à partir du milieu contenant 1mM glucose/pyruvate/glutamine. Les P-values ont été déterminées en réalisant un test ANOVA à 2 facteurs, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Les CAFs modulent le métabolisme des MDA-MB-468

Nous avons montré l'importance du contexte nutritif en général et de la disponibilité du glucose dans les effets protecteurs des MC CAFs. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact des MC CAFs sur le métabolisme des cellules malignes. Nous avons tout d'abord réalisé une analyse Omnilog en collaboration avec Olivier Hérault (CNRS, équipe LNOx, Tours) et Jérôme Bourgeois (CNRS, équipe LNOx, Tours). Cette technique consiste à mesurer par colorimétrie la production de NAD(P)H par les cellules en présence d'un substrat unique pour chaque puits, reflétant ainsi l'utilisation de ce substrat pour la production d'énergie par les cellules. La **Figure 36A** montre l'intensité du signal (en unités Omnilog) en fonction du temps suivant le milieu non MC ou MC CAFs dans lequel les cellules ont été incubées 48h. En particulier, parmi les 380 substrats testés, il ressort que les MC CAFs favorisent l'utilisation par les MDA-MB-468 d'alanine et de ses dérivés, du glucose-6-phosphate et de l'acide butyrique (**Figure 36B**). Ainsi, cette expérience confirme que les MC CAFs modulent le métabolisme des cellules malignes.

Nous nous sommes alors demandé si les MC CAFs modulaient les niveaux de respiration et de glycolyse des cellules malignes. Les MDA-MB-468 ont été incubées 6h avec les MC CAFs et l'ABT-737 puis les mesures de respiration mitochondriale (OCR) et du taux d'acidification du milieu (ECAR) ont été réalisées par Seahorse (**Figure 36C**). Nous montrons que les MC CAFs ne modulent pas la respiration des MDA-MB-468, que les cellules soient traitées ou non avec l'ABT-737 (**Figure 36D**). Ce résultat suggère, puisque les MC CAFs ne contiennent plus de glucose, que les cellules malignes adaptent leur activité mitochondriale pour maintenir la respiration mitochondriale sous influence des MC CAFs. Notons que la respiration maximale des cellules malignes n'est pas non plus modifiée par les MC CAFs (données non montrées). De façon surprenante, nous montrons également que les MC CAFs favorisent le taux d'acidification du milieu des cellules malignes (**Figure 36E**). Le taux d'acidification est souvent associé à l'activité glycolytique des cellules. Il mesure plus précisément le relargage de protons associé au relargage de lactate. Ainsi, malgré une déprivation en glucose des MC CAFs, ceux-ci semblent favoriser le relargage de lactate par les cellules malignes. Ce résultat suggère une transformation accrue de pyruvate en lactate sous influence des MC CAFs, concomitante au maintien de la respiration. Il en résulte une diminution du ratio OCR/ECAR (**Figure 36F**). Nous précisons que dans les conditions du Seahorse, le pH extracellulaire des cellules malignes n'est pas drastiquement modifié par les MC CAFs après 6h d'incubation (**Figure 36G**). Notons que des mesures de pH des MC CAFs juste après leur génération indiquent également que le pH des MC CAFs est identique à celui des milieux non MC (données non montrées).

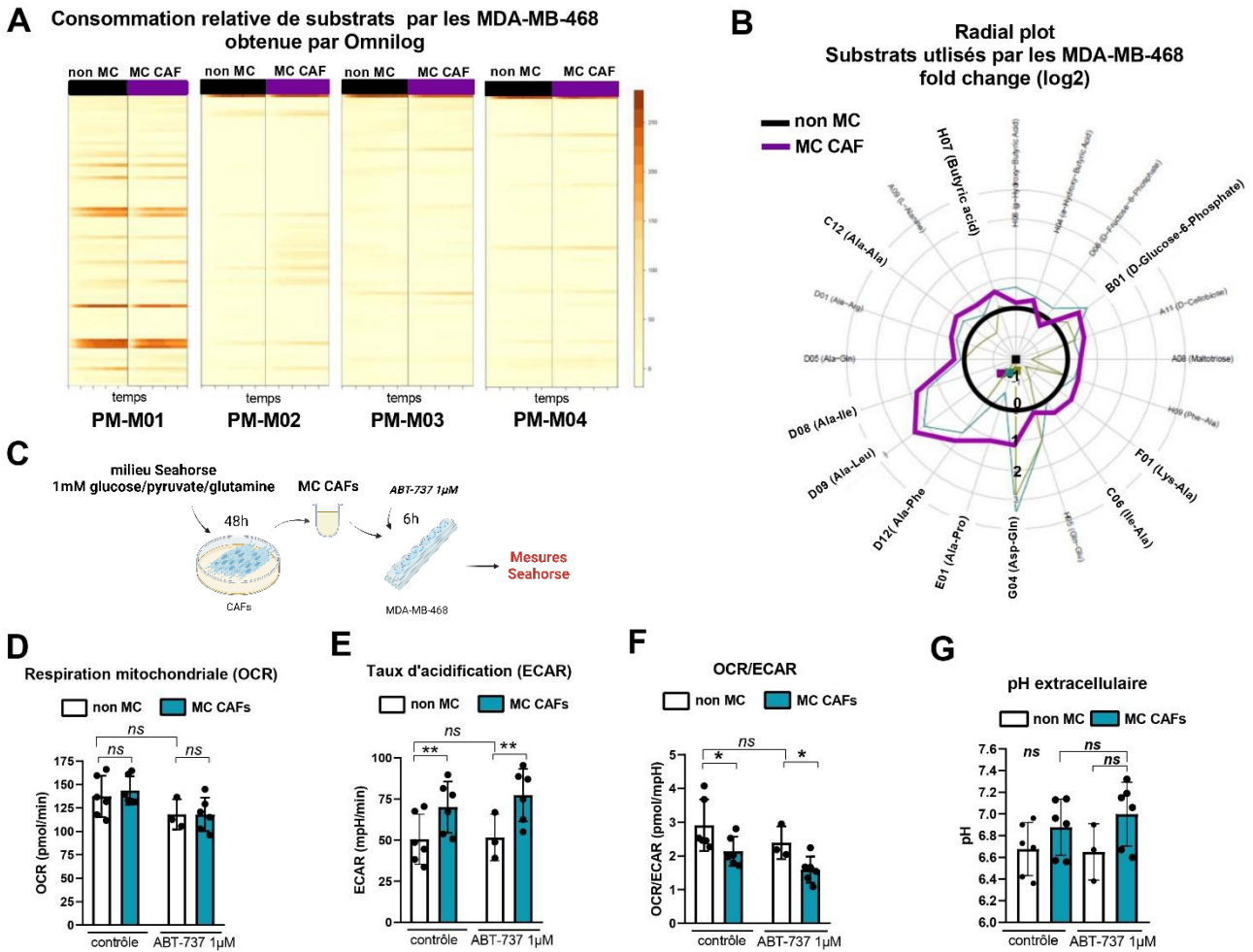


Figure 36 : Métabolisme des MDA-MB-468 sous influence des MC CAFs

A. Intensité du signal en unité OmniLog reflétant la consommation d'un substrat donné par les MDA-MB-468 en fonction du temps pour produire de l'énergie sous forme de NAD(P)H. Chaque ligne correspond à un puits contenant un substrat unique. **B.** Consommation relative des substrats différemment utilisés par les MDA-MB-468 sous influence des MC CAFs. **C.** Protocole expérimental en Seahorse pour analyser des modulations générales du métabolisme des MDA-MB-468 sous influence des MC CAFs. **D.E.F** Respiration mitochondriale (D), taux d'acidification (E) et ratio des deux mesures (F) des MDA-MB-468 sous influence des MC CAFs et de l'ABT-737 après 6h de traitement. **G.** Mesure par Seahorse du pH à proximité des cellules malignes après 6h de traitement. Les P-values ont été déterminées en réalisant un test ANOVA à 2 facteurs, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

La protéine ATF4 est augmentée par les MC CAFs et la déprivation en glucose, mais n'est pas nécessaire à l'effet protecteur des MC CAFs contre l'apoptose des MDA-MB-468

Afin de préciser les processus biologiques modifiés dans les MDA-MB-468 sous l'influence des MC CAFs, une analyse DGE (Differential Gene Expression) a été réalisée en collaboration avec Agnès Basseville (Institut de Cancérologie de l'Ouest, Angers) sur des données bulk RNAseq. Ces données ont été obtenues à partir d'échantillons de cellules malignes incubées pendant 24h avec les milieux non MC ou les MC CAFs et traités ou non à l'ABT-737. La **Figure 37A** représente la heatmap obtenue à partir des gènes différentiellement exprimés entre conditions. Notons que l'ABT-737 semble exercer un effet prédominant sur l'expression différentielle des gènes qui ressortent de cette analyse. L'analyse d'enrichissement des termes de la base Gene Ontology (GO) met en avant que l'ABT-737 modifie l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans le processus de réponse au stress du RE en condition non MC (**Figure 37B**). De façon intéressante, nous montrons que cette variation d'expression de gènes induite par l'ABT-737 n'est pas retrouvée lorsque les cellules malignes sont incubées avec les MC CAFs. La **Figure 37C** présente la liste des gènes qui sont différentiellement exprimés sous l'effet de l'ABT-737 par rapport au contrôle dans le milieu non MC, mais qui ne sont pas retrouvés différentiellement exprimés sous l'effet de l'ABT-737 dans le milieu MC CAFs. En accord avec ces résultats, nous montrons également que l'augmentation d'expression différentielle par l'ABT-737 de gènes impliqués dans la réponse au stress du RE n'est pas retrouvée dans un milieu dépourvu de glucose (**Figure 37D**). La **Figure 37E** précise les gènes différentiellement exprimés sous ABT-737 exclusivement dans le milieu contrôle contenant du glucose. Ainsi, ces résultats suggèrent un effet des MC CAFs et de la déprivation en glucose sur la réponse au stress du RE.

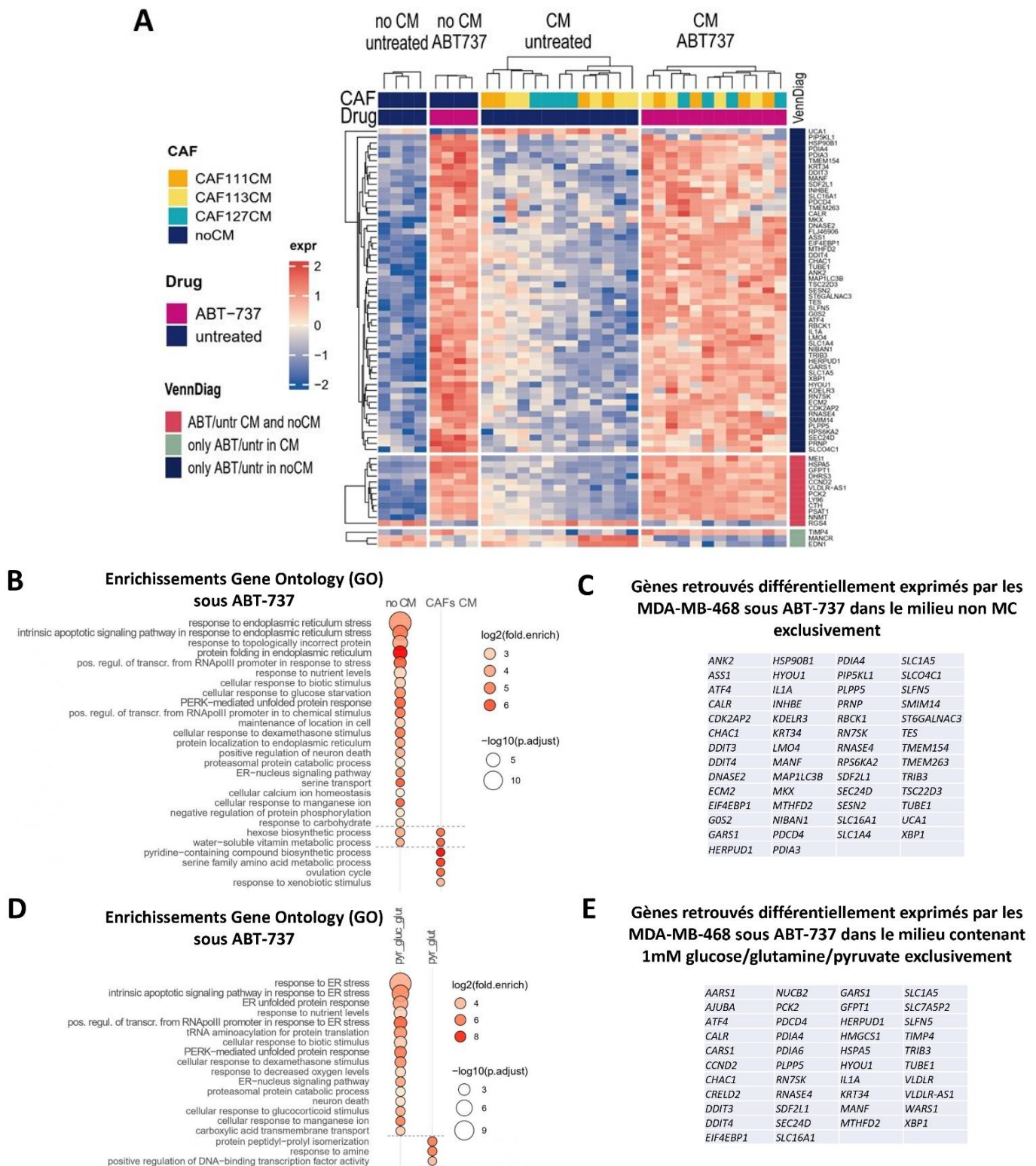


Figure 37 : Analyse DGE sur données de RNAseq montrant que les variations de gènes impliqués dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique induites par l'ABT-737 ne sont pas retrouvées en présence des MC CAFs

A. Heatmap des gènes différemment exprimés dans l'analyse de l'expression génique des MDA-MB-468 sous influence des MC CAFs et de l'ABT-737 (1µM) après 24h de traitement. **B.** Enrichissement des termes Gene Ontology (GO) sous influence de l'ABT-737 dans le milieu non MC et/ou dans le milieu

MC CAFs, à partir des gènes différentiellement exprimés. C. Liste des gènes différentiellement exprimés par les MDA-MB-468 sous l'influence de l'ABT-737 dans le milieu non MC exclusivement. D. Enrichissement des termes GO sous influence de l'ABT-737 dans le milieu contenant 1mM glucose/pyruvate/glutamine et/ou le milieu contenant 1mM pyruvate/glutamine (sans glucose). E. Liste des gènes différentiellement exprimés par les MDA-MB-468 sous l'influence de l'ABT-737 dans le milieu 1mM glucose/pyruvate/glutamine exclusivement.

Ainsi, nous avons exploré en western blot les niveaux de certaines protéines impliquées dans la réponse au stress du RE sous l'influence des MC CAFs. Tout d'abord, nous montrons bien que l'ABT-737 augmente la phosphorylation d'EIF2 α et le niveau d'ATF4 (**Figure 38A**). De plus, nous mettons en avant que les MC CAFs augmentent les niveaux de ces deux protéines dans la condition contrôle (**Figure 38A**), indiquant au moins l'activation de la voie phospho-EIF2 α /ATF4 par les MC CAFs dans les MDA-MB-468. Nous montrons de même que l'absence de glucose induit la voie phospho-EIF2 α /ATF4 dans les MDA-MB-468 (**Figure 38B**), suggérant que l'effet des MC CAFs sur cette voie pourrait être due à l'absence de glucose. En effet, nous montrons que l'induction d'ATF4 par les MC CAFs est perdue avec l'ajout de glucose (**Figure 38C**). Enfin, nous montrons que l'induction d'ATF4 par les MC CAFs (**Figure 38D**) et par l'absence de glucose (**Figure 38E**) est perdue en présence de metformine, dont nous avons montré l'effet négatif sur la protection des MC CAFs et de l'absence de glucose. Ainsi, ces résultats indiquent que les MC CAFs augmentent la voie phospho-EIF2 α /ATF4, et cette augmentation est contrée par l'ajout de glucose ou de metformine.

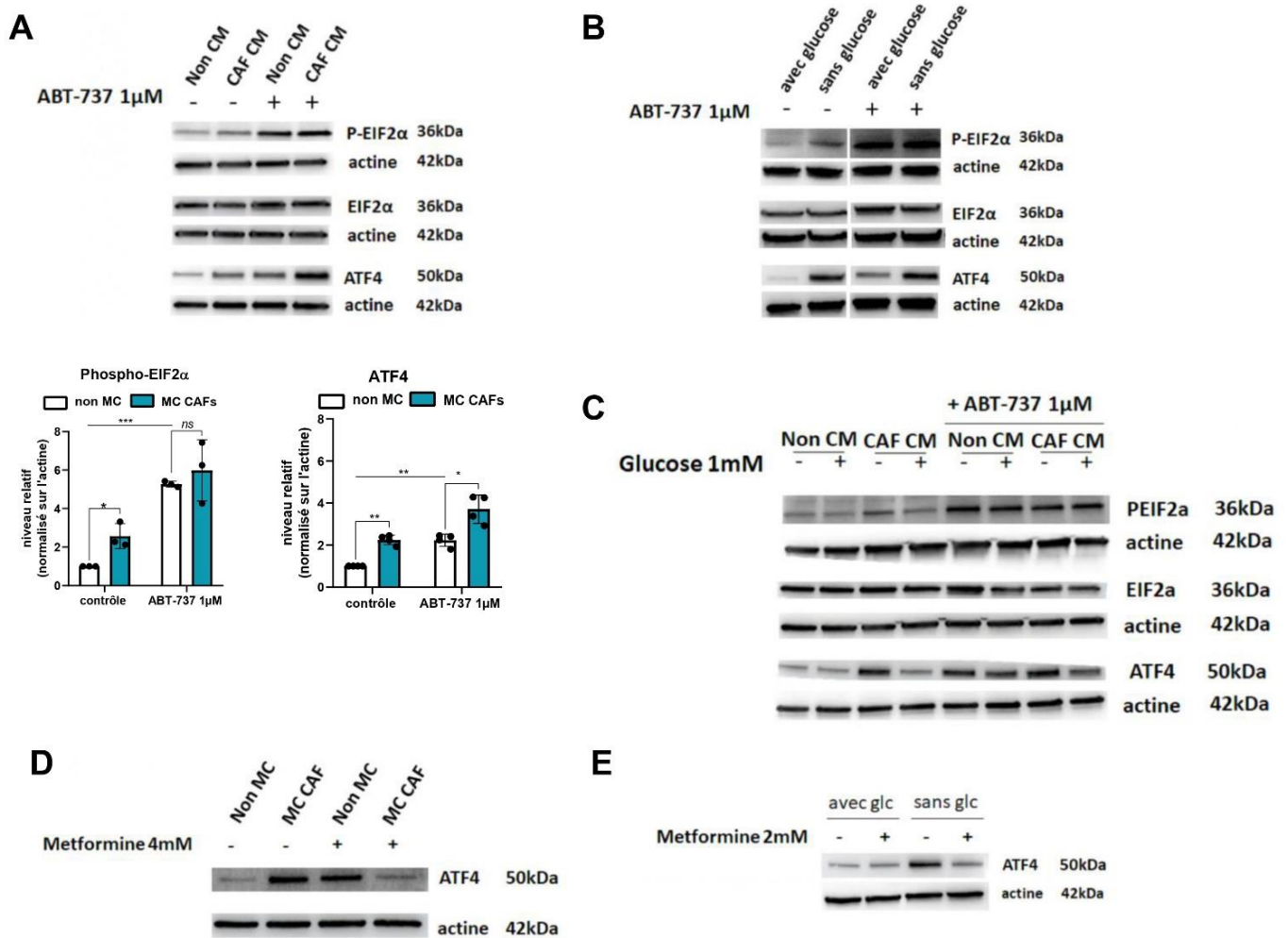


Figure 38 : Influence des MC CAFs et de l'absence de glucose sur la voie phospho-EIF2α/ATF4 dans les MDA-MB-468

A. Effet des MC CAFs et de l'ABT-737 (1μM) sur les niveaux protéiques de phospho-EIF2α, EIF2α et ATF4 après 24h de traitement par Western Blot (haut) et quantifications (bas). **B.** Effet de l'absence de glucose sur les niveaux protéiques de phospho-EIF2α, EIF2α et ATF4. Milieu avec glucose : 1mM glucose/pyruvate/glutamine et sans glucose : 1mM pyruvate/glutamine. **C.** Effet de l'ajout de glucose (1mM) lors du traitement avec les MC CAFs et l'ABT-737. **D.** Effet des MC CAFs sur le niveau d'ATF4 avec ajout de glucose (1mM) lors du traitement. **E.** Effet de la metformine (2mM) sur le niveau d'ATF4 en présence de MC CAFs. **F.** Effet de la metformine (2mM) sur le niveau d'ATF4 en absence de glucose. Les P-values ont été déterminées en réalisant un test ANOVA à 2 facteurs, * p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001.

Nous avons alors étudié l'implication d'ATF4 dans les effets protecteurs des MC CAFs contre l'ABT-737. Nous montrons que des MC CAFs protègent tout aussi bien des cellules rendues déficientes en ATF4 que des cellules contrôles exprimant la protéine (**Figure 39A**). Nous précisons que l'augmentation d'ATF4 sous MC CAFs n'est pas retrouvée dans les cellules déficientes en ATF4, bien que la protéine soit toujours légèrement exprimée (**Figure 39B**). Nous avons également utilisé un inhibiteur de PERK, GSK2606414, afin de bloquer la voie phospho-EIF2 α /ATF4 (**Figure 39C**). Nous montrons que cet inhibiteur n'a pas non plus d'effet sur la protection à l'ABT-737 induite par les CAFs. Ces résultats indiquent que l'induction d'ATF4 par les MC CAFs n'est pas nécessaire à leurs effets protecteurs contre l'apoptose. Cette induction pourrait plutôt être une conséquence de voies modulées par les MC CAFs.

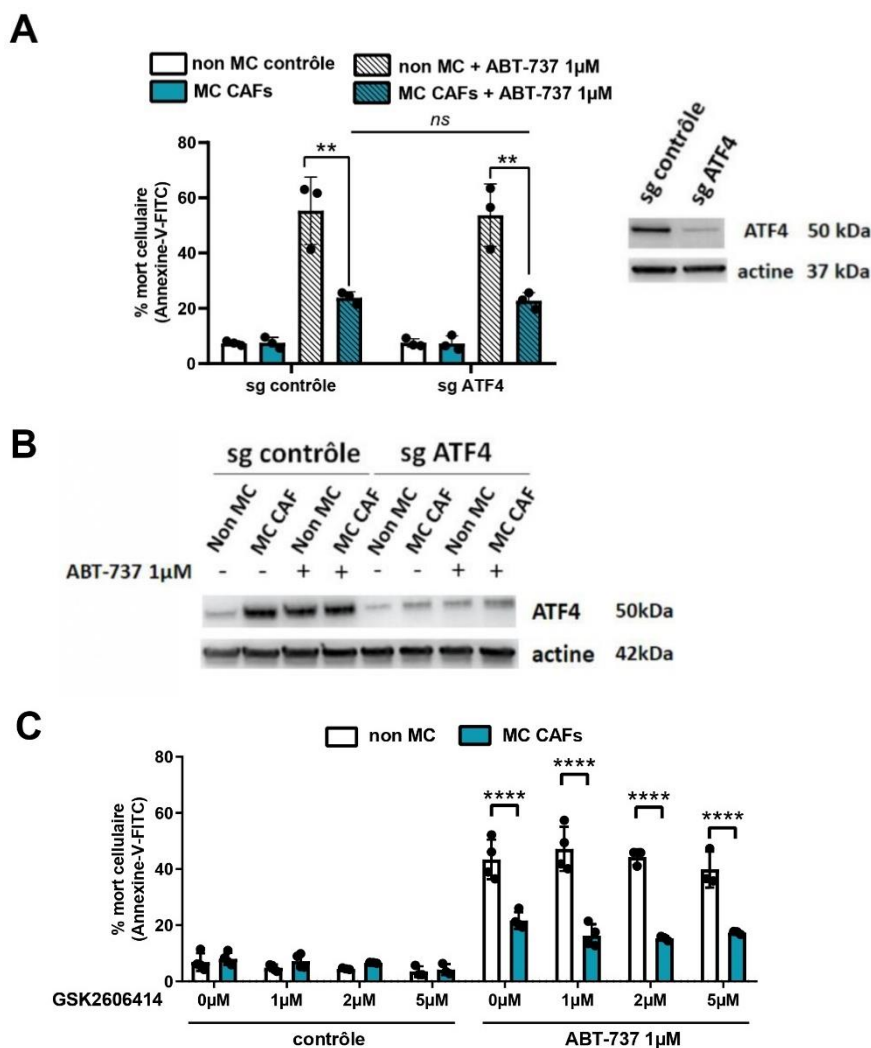


Figure 39: Etude de l'implication d'ATF4 dans les effets protecteurs des MC CAFs contre l'apoptose des MDA-MB-468

A. Maintien de l'effet protecteur des MC CAFs dans des MDA-MB-468 rendues déficientes en ATF4 par Crispr-Cas9. **B.** Niveau protéique d'ATF4 dans les MDA-MB-468 déficientes en ATF4, sous influence des MC CAFs et de l'ABT-737. **C.** Effet du GSK2606414 (inhibiteur de PERK) sur la protection des MDA-MB-468 par les MC CAFs. Les P-values ont été déterminées en réalisant un test ANOVA à 2 facteurs, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$

En conclusion, ces résultats supplémentaires nous ont permis de relever des mécanismes cellulaires différents selon les lignées cellulaires étudiées dans le phénomène de protection par les MC CAFs contre l'apoptose induite par l'ABT-737 en conditions nutritives limitantes. De plus, nous avons précisé l'impact général des MC CAFs sur le métabolisme des MDA-MB-468. En particulier, les MDA-MB-468 maintiennent à court terme leur niveau de respiration mitochondriale et augmentent leur taux d'acidification sous influence des MC CAFs. Enfin, une analyse DGE à partir de données RNAseq nous a permis d'explorer la voie phospho-EIF2 α /ATF4, augmentée sous l'influence des MC CAFs. Cependant, des analyses supplémentaires d'inhibition génique ou pharmacologique nous indiquent que la protéine ATF4 ne semble pas nécessaire aux effets protecteurs des MC CAFs.

Matériels et méthodes supplémentaires

Cell lines culture

The human breast cell lines MDA-MB-231, MDA-MB-468, HS578T and ZR-75-1 were purchased from American Type Culture Collection (Bethesda, MD, USA). MDA-MB-231, MDA-MB-468 were cultured in DMEM (Thermo Fisher Scientific #10313021) supplemented with 5% FBS and 2mM glutamine. HS578T were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 0.01 mg/ml human insulin and 2mM glutamine. ZR-75-1 were cultured in RPMI-1640 (Eurobio Scientific #CM1RPM000-01) supplemented with 10% FBS and 2mM glutamine.

For the CRISPR Cas9-induced ATF4 gene extinction, each of the following single guide sequences targeting human ATF4 used by (Krall et al., 2021) was cloned in lentiCRISPRV2 vectors that was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid #52961): 5'-GGATTTGAAGGAGTTCGACT-3' and 5'-GGCGGGCTCCTCCGAATGGC-3'. MDA-MB-468 were transduced with both vectors containing the single guide sequences at the same time. Empty vector was used as control. Cells were then selected using 1 μ g/ml puromycin and ATF4 knock down was assessed by immunoblot analysis.

Treatments

ABT-737 (Selleckhem #S1002), 2 deoxy-D-glucose (Sigma-Aldrich #D8375), metformin (Calbiochem #317240) and GSK2606414 (MedChem Express #HY-18072) were used at indicated concentrations. For the experiments, a DMEM containing no glucose, no pyruvate and no glutamine (Thermo Fisher Scientific #A1443001) was used and supplemented with glucose (Sigma-Aldrich #G8769) and/or pyruvate (Sigma-Aldrich #S8636) and/or glutamine (Gibco #25030024) as indicated. DMEM containing 25mM glucose, 1mM pyruvate and 2mM glutamine (Thermo Fisher Scientific #10313021) was used when indicated.

Apoptosis assay

Cell death was assessed using an Annexin-V FITC binding assay (Miltenyi #130-092-052) performed according to manufacturer's instructions. Flow-cytometry analysis was performed on Accuri C6 Plus flow cytometer from BD Biosciences.

Metabolomic phenotyping Microarrays

The metabolic phenotyping was performed using Phenotype Microarrays (Biolog). Briefly, MDA-MB-468 cells were starved in a phenol red-free RPMI-1640-base medium (IF-M1) depleted of carbon energy sources and containing only 0.3mM glutamine, 0.5% FBS and 1% penicillin/streptomycin. The same medium without FBS was also preincubated 48h on CAFs confluent layer to generate CAFs CM. MDA-MB-468 cells were then seeded in non CM or CAFs CM medium at 10 000 cells per well (40µl) in four precoated 96-well plates containing various metabolites at sole nutrient substrates and incubated for 48h at 37°C with CO₂. The microplates were then incubated in an Omnilog plate reader (Biolog) for 24h and NADH flux was measured every 15min by monitoring tetrazolium dye reduction and purple color formation. The analysis of the metabolic phenotyping data was performed on the R software via the Omnilog phenotype microarray package (opm). Beforehand, raw data from metabolic phenotyping assays were corrected by subtracting average values of three negative control wells from all other samples at each time point to suppress background noise related to residual metabolism.

Seahorse assay

OCR and ECAR measurements were performed using the Seahorse XF HS Mini Analyzer (Seahorse Bioscience). CAFs CM were generated from DMEM #D5030 (Sigma-Aldrich) with NaOH to adjust pH at 7.4. MDA-MB-468 cells were plated in duplicate in 8-well seahorse plate (18 000 cells/well) and incubated the day after with non CM or CAFs CM for 5h. Then, the plate was incubated for 45min at 37°C in a CO₂-free incubator, and OCR and ECAR were measured.

RNAsequencing analysis

Samples were analyzed according to the protocol from Charpentier et al. (2021). Gene expression profiles were generated by parsing the alignment files (.bam) and counting for each sample the number of UMIs associated with each gene. Reads that either contained more than three mismatches with the reference sequence, were aligned on multiple genes, or had a polyA pattern were discarded. The remaining analysis was written in the R programming language (R Core Team, 2021). Count matrix was normalized and vst-transformed using DESeq2 package (Love et al., 2014). Differentially expressed genes were determined using ebayes function (limma, Ritchie et al., 2015) and filtered in with an

adjusted p-value inferior to 0.05 and a log₂ fold-change superior to 1. Heatmap was built using ComplexHeatmap package (Gu et al., 2016) using Euclidean distance and ward D2 clustering method. Pathway enrichment analysis was performed on filtered genes using gene ontology biological process (GO BP) database (clusterProfiler package, T. Wu et al., 2021). GO BP enriched pathways were first filtered with an adjusted p-value <0.05, then redundancy in filtered pathways was identified by semantic similarity (Wang distance method with a 0.7 similarity threshold) using rrvgo package (Sayols, 2023), and reduced to parent term accordingly.

Immunoblot analysis

Cells were resuspended in lysis buffer (RIPA, Thermo-Fisher #98901). After sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), proteins (20µg per condition) were transferred to a 0.45µM nitrocellulose membrane (Trans-Blot Turbo RTA Transfer kit nitrocellulose midi #1704271) using Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad #1704150, parameters : 25V, 1A, 30 minutes). The membrane was then blocked with 5% non-fat milk TBS 0.05% Tween 20 for 1h at room temperature and incubated with primary antibody for 1h at room temperature. The used primary antibodies were : anti-ATF4 (Santa-Cruz #sc-390063), anti-phospho-EIF2α (Cell Signaling #3597), anti-EIF2α (Cell Signaling #9722) and anti-β-actin (Millipore #MAB1501). The membrane was then incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibody (Jackson Immuno-Research Laboratories, Goat anti-Rabbit #111-035-006 or Goat anti-Mouse #115-035-006) for 1h at room temperature and visualization was made using the Fusion FX from Vilber (Eberhardzell, Deutschland).

Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) was used for statistical analysis for overall condition effects with GraphPad Prism 8.0.1 Software. All data are presented as mean +/- SD of at least three independent experiments.

DISCUSSION

Amélioration du modèle d'étude

Au cours de ma thèse, nous avons étudié l'impact des CAFs sur la résistance à l'apoptose des cellules malignes de CSTN en utilisant des cultures primaires de CAFs issues d'exérèse tumorale de patientes naïves de traitement et des lignées de CSTN dans des modèles de coculture en 2D sur plastique ou en utilisant des milieux conditionnés par les CAFs. Dans ce dernier cas de figure, les milieux conditionnés ont été générés à partir d'un milieu relativement limité en nutriments contenant 1mM de glucose, glutamine et pyruvate. Ce choix concernant notamment la concentration de 1mM de glucose a été fait afin de se rapprocher davantage de la concentration retrouvée dans des cancers solides tels que des cancers gastriques (entre 0.1mM et 0.4mM), elle-même plus faible que la glycémie mesurée chez des individus à jeun (Hirayama et al., 2009), en comparaison aux milieux riches en glucose classiquement utilisés (25mM). Dans notre étude, la faible teneur initiale en glucose du milieu nous a permis de mettre en évidence que les CAFs consomment le glucose disponible dans leur environnement, et que la privation en glucose qu'ils induisent protège des cellules de CSTN de l'apoptose induite par l'ABT-737. Des milieux de culture plus proches des conditions physiologiques ont également permis d'identifier des phénomènes métaboliques cancéreux comme la fonction inhibitrice endogène de l'acide urique sur la synthèse de pyrimidine de novo (Cantor et al., 2017) et un affranchissement de certains phénomènes artéfactuels comme une activité élevée du cycle de l'urée induite par une concentration élevée d'arginine (Vande Voorde et al., 2019).

Dans notre étude, nous comparons l'effet des MC CAFs à celui du milieu initial maintenu dans les mêmes conditions (37°C, 5% CO₂) mais sans cellule. Il serait très intéressant de comparer l'effet des CAFs à celui de fibroblastes normaux adjacents à la tumeur (NAFs). Nous disposons en effet de certains couples CAFs/NAFs issus de mêmes patientes. Le comparatif avec des MC NAFs nous permettrait d'attester ou non la spécificité de l'effet protecteurs des CAFs. Il a été montré *in vitro* qu'un switch glycolytique pouvait accompagner la différenciation des fibroblastes en CAFs (D. Zhang et al., 2015), et que des CAFs issus de patientes atteintes de cancer du sein étaient plus glycolytiques que leurs fibroblastes normaux associés (K. Sun et al., 2019b). Ces études nous font supposer que dans notre modèle, les NAFs auraient un effet protecteur moins important que les CAFs en lien avec une consommation diminuée de glucose.

Dans l'optique de rompre les effets des CAFs sur la sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose, nous proposons d'utiliser la metformine en combinaison de traitement. Afin de se rapprocher davantage de la situation dans les tumeurs mammaires, il apparaît primordial de tester l'efficacité de la metformine dans un contexte de coculture, qui permet des interactions directes entre les deux types cellulaires. Ceci nous permettra également de prendre en compte les effets de la metformine

précédemment décrits sur les CAFs eux-mêmes, comme la dégradation d'HIF1 α (S. Shao et al., 2020) et l'inactivation de la voie NF κ B (Xu et al., 2018) accompagnées de la diminution de sécrétion de cytokines pro-tumorales.

De plus, nous avons la chance de disposer au laboratoire de tumoroïdes, constitués de cellules malignes issues de tumeurs de patientes naïves de traitements cultivées en 3D en matrice de membrane basale. Ce modèle, en plus d'intégrer une dimension spatiale, rend compte de l'hétérogénéité inter-tumorale. Il sera nécessaire de tester les effets protecteurs des CAFs sur les tumoroïdes en coculture (transwell ou coculture directe). Cependant, il a été montré que la capacité de l'inhibiteur de glutaminase CB839 à diminuer la prolifération de lignées de CSTN est compromise lorsque les cellules malignes sont cultivées en 3 dimensions, suggérant que la conformation spatiale tumorale influence le métabolisme des cellules malignes (Singleton et al., 2020). De plus, des travaux montrent qu'il existe des différences métaboliques non négligeables entre cellules malignes cultivées *in vitro* et *in vivo*, soulignant l'importance du stroma et en particulier de l'architecture tumorale dans l'étude métabolique des cellules malignes (Davidson et al., 2016; Dragic et al., 2022; Finley, 2023b). Ces éléments mettent en lumière l'importance de confirmer nos résultats dans un modèle plus intégré de tumoroïdes.

Nous pourrions également confirmer le potentiel thérapeutique de la metformine en combinaison avec un inducteur d'apoptose dans un modèle *in vivo*. Nous pourrions ainsi étudier un modèle murin de xéno greffes de cellules MDA-MB-468 et CAFs avec injection de l'inhibiteur protac spécifique de BCL-xL (DT2216) en combinaison ou non avec le traitement metformine. En particulier, il serait intéressant de regarder si l'effet de la metformine est plus important lorsque les souris sont nourries avec une alimentation pauvre en carbohydrates.

Hétérogénéité des dépendances métaboliques et des effets des CAFs

Nos résultats révèlent un rôle ambivalent de la glycolyse dans la sensibilité des cellules MDA-MB-468 à l'ABT-737. En effet, l'ajout de glucose sensibilise les cellules malignes à l'apoptose alors que l'ajout du produit de la glycolyse, le pyruvate, dans un milieu appauvri en glucose et glutamine protège les cellules malignes. De plus, l'inhibition pharmacologique de la première étape de la glycolyse par le 2DG réduit la sensibilité des cellules malignes à l'apoptose, en accord avec l'effet sensibilisateur du glucose. Il serait intéressant de préciser les étapes de la glycolyse qui pourraient participer à l'effet sensibilisateur du glucose, en inhibant certaines enzymes glycolytiques clés plus en aval, permettant notamment les

réactions de transformation du fructose-6-phosphate en fructose-2,6-bisphosphate et de transformation du phosphoénol-pyruvate en pyruvate, et pour lesquelles des inhibiteurs spécifiques existent. L'étude de Daniels et al montre de manière très intéressante que la sensibilisation des MDA-MB-468 à l'ABT-737 induite par l'inhibition pharmacologique de NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransférase), enzyme clé de la voie de synthèse de NAD⁺, est accompagnée de l'augmentation des intermédiaires de la glycolyse jusqu'au glycérol-3-phosphate, puis de la diminution des intermédiaires plus en aval de la voie (Daniels et al., 2021). Ce résultat suggère que la sensibilisation à l'ABT-737 par le glucose pourrait être liée à l'accumulation/plus forte disponibilité de certains intermédiaires de la voie supérieure de la glycolyse.

Dans notre étude, l'action sensibilisatrice du glucose peut paraître surprenante puisque le glucose est communément admis comme favorisant la résistance des cellules malignes aux traitements (Marcucci & Rumio, 2021). Il protège par exemple les cellules malignes de foie ou de sein luminales contre différentes chimiothérapies (R. Gao et al., 2021; M. He et al., 2019). Les voies des pentoses phosphates (PPP) et de la biosynthèse des sérines, qui dérivent de la glycolyse, ont également été montrées comme favorisant la résistance des cellules malignes aux traitements (Giacomini et al., 2020; C. Ma et al., 2021; X. Zhou et al., 2023). De plus, la déprivation en glucose sensibilise des lymphocytes à l'ABT-737 en diminuant le niveau de MCL-1 (Meynet et al., 2012). Une dépendance accrue à l'OXPPOS, qui peut être favorisée par un contexte appauvri en glucose, a aussi été montrée dans différentes études comme participant à la résistance aux traitements (Bosc et al., 2020; El-Botty et al., 2023; Hirpara et al., 2019; Ippolito et al., 2019). Cependant, certaines études ont également montré que la déprivation en glucose favorise la résistance de cellules malignes à des chimiothérapies, notamment via la voie PERK/ATF4 dans le cancer colorectal (Y.-L. Hu et al., 2016) et l'expression accrue de transporteurs d'efflux de traitements dans le cancer du foie (Ledoux et al., 2003). De plus, la voie des hexosamines, activée par la privation en glucose et le 2DG (Chaveroux et al., 2016; Moloughney et al., 2018), permet aux cellules de s'adapter à une déprivation en nutriments. Il a été montré que le 2DG peut favoriser l'accumulation de métabolites de la voie PPP et de l'UPR (Laussel & Léon, 2020), ce qui pourrait contribuer à son effet protecteur dans certains cas. Enfin, une étude montre que des cellules de cancer colorectal différentes peuvent être sensibilisées à ou au contraire protégées du cisplatine par le 2DG, en lien avec une activation différentielle de certains processus cellulaires, comme l'autophagie induite par le stress du RE (Maximchik et al., 2018).

Dans notre étude, nous retrouvons la dualité de l'effet du glucose à l'échelle de différentes lignées de cancer du sein. En effet, la sensibilité à l'ABT-737 de la lignée luminale ZR-75-1 n'est pas modifiée par le contexte nutritif, alors que les lignées de CSTN MDA-MB-468 et MDA-MB-231 sont plus sensibles à l'apoptose en présence de glucose. Des différences de comportement métabolique entre cellules de

sous-types de cancer du sein différents ont déjà été décrites (J. Choi et al., 2013; Pelicano et al., 2014; Ripoll et al., 2021), tout comme des différences au sein même de lignées de cancers du sous-type triple-négatif (Lanning et al., 2017). Dans cette dernière étude, les cellules MDA-MB-468 montrent une forte flexibilité métabolique, c'est-à-dire une forte capacité d'augmenter la respiration ou la glycolyse quand une des voies est inhibée, en particulier en comparaison avec les cellules de la lignée MDA-MB-231. Les différences de flexibilité métabolique pourraient expliquer l'effet opposé du 2DG sur la sensibilité des MDA-MB-468 et des MDA-MB-231 à l'ABT-737, ainsi que l'absence d'effet des MC CAFs sur la sensibilité à l'apoptose des MDA-MB-231. De même, l'absence de protection des ZR-75 par les MC CAFs dans notre modèle pourrait au moins en partie être expliquée par l'absence de dépendance métabolique observée dans cette lignée cellulaire.

Une autre différence majeure entre les différentes lignées cellulaires étudiées repose sur leur statut mutationnel, qui peut moduler le comportement métabolique des cellules malignes. En particulier, il a été montré que P53 et PTEN régulent le métabolisme cellulaire, notamment en limitant la glycolyse des cellules (Garcia-Cao et al., 2012; Harami-Papp et al., 2016; Kruiswijk et al., 2015; Qian et al., 2019). Les cellules MDA-MB-468, MDA-MB-231 et HS-578T sont décrites comme présentant un *P53* muté faux-sens. Une particularité de la lignée MDA-MB-468 est la perte de *PTEN*. Les ZR-75-1 ne présentent quant à elles ni de mutation de *P53* ni de perte de *PTEN*.

En lien avec le statut mutationnel, l'activité de mTOR pourrait jouer un rôle central dans les effets observés de la déprivation en glucose et les effets des MC CAFs. En effet, l'activation des voies sous-jacentes à mTOR dépend de la disponibilité en glucose. Il a été montré que la déprivation en glucose induit l'activation d'AMPK, qui inhibe la formation du complexe mTORC1 (Leprivier & Rotblat, 2020), qui favorise la survie cellulaire (Hung et al., 2012), mais peut également favoriser l'apoptose (Xie et al., 2023). Il a été montré qu'AMPK peut également inhiber le complexe mTORC2 (Y. Wang et al., 2018) ou au contraire l'activer pour favoriser la survie cellulaire (Kazyken et al., 2019). Or il est connu que la perte de *PTEN* induit l'activation de la voie PI3K/AKT, qui régule positivement l'activité de mTOR (Song et al., 2012). Ainsi, la perte de *PTEN* dans les cellules MDA-MB-468 leur confère une activité basale AKT plus importante que les autres lignées étudiées, et donc une activité des complexes mTORC1 et mTORC2 potentiellement plus élevée. Cette différence pourrait en particulier expliquer l'effet sensibilisateur du glucose plus marqué dans les MDA-MB-468, ainsi que la spécificité de l'effet protecteur des MC CAFs sur la lignée MDA-MB-468. Il sera intéressant de préciser quelles voies sous-jacentes à mTOR sont modulées par l'absence de glucose et les MC CAFs dans les MDA-MB-468, nous permettant potentiellement d'expliquer les effets protecteurs observés.

D'une manière plus générale, dans l'optique de proposer des traitements complémentaires efficaces dans un contexte de déprivation en glucose induit par les CAFs, il paraît désormais primordial de

comprendre la spécificité des MDA-MB-468 à l'origine de l'effet protecteur de la déprivation en glucose contre l'apoptose. Afin de discriminer une potentielle implication de la perte de *PTEN* dans les effets observés, nous pourrions dans un premier temps réaliser des tests sur des lignées de CSTN qui se rapprochent davantage du statut mutationnel des MDA-MB-468, en choisissant par exemple les cellules BT549, caractérisées par la perte de *PTEN*. Il serait également intéressant d'induire la perte de *PTEN* dans des lignées l'exprimant telle que les MDA-MB-231 et regarder si les effets du glucose et surtout des MC CAFs sont retrouvés après modification génique.

Nous avons montré que contrairement aux lignées de cancer du sein étudiées, les effets protecteurs des CAFs semblent homogènes. En effet, les CAFs provenant de tumeurs de différents sous-types présentent des effets protecteurs comparables contre l'apoptose des MDA-MB-468 à l'ABT-737. Cette homogénéité peut être expliquée par la nature même de l'effet protecteur qui repose sur la consommation du glucose par les CAFs, décrits principalement dans la littérature comme glycolytiques (Kay & Zanivan, 2021; D. Zhang et al., 2015). Ainsi, les CAFs seraient métaboliquement proches, et consommant ainsi l'intégralité du glucose présent dans le milieu lors de la préparation des milieux conditionnés. Il serait intéressant de préciser le métabolisme général des différents CAFs en seahorse afin de préciser si les CAFs issus des tumeurs de patientes ont un phénotype métabolique homogène. Les conditions d'extraction et de culture des CAFs sur plastique en normoxie ont été montrées comme favorisant la sélection de certaines populations de CAFs, en particulier les CAFs myofibroblastiques du sous-type S1 (Kieffer et al., 2020), favorisant ainsi potentiellement la perte d'hétérogénéité des CAFs d'une même patiente, et sélectionnant ainsi des CAFs potentiellement proches les uns des autres entre patientes.

Modulations du métabolisme des cellules malignes par les CAFs

Dans notre étude, nous montrons que les MC CAFs sont déprivés en glucose et que le dialogue entre CAFs et cellules malignes pourrait reposer sur l'effet Warburg inverse (Pavlides et al., 2009b), puisque l'utilisation du glucose par les CAFs mène à une éducation des cellules malignes en faveur de leur survie. Nous montrons dans notre modèle que cette éducation n'est cependant pas médiée par un apport de pyruvate ou de lactate.

En Seahorse, nous précisons que les MC CAFs ne modifient pas la respiration des cellules malignes après 6h d'incubation. Ce résultat indique que malgré l'absence de glucose et la faible teneur en pyruvate et en glutamine dans les MC CAFs, les MDA-MB-468 maintiennent leur niveau de respiration. Ceci suggère que les cellules malignes adaptent leur métabolisme pour maintenir leur activité

mitochondriale. Nous pourrions préciser les sources d'alimentation du cycle de Krebs sous influence des CAFs en utilisant différents inhibiteurs métaboliques ciblant spécifiquement l'entrée mitochondriale de pyruvate, la glutaminolyse ou la β -oxydation des acides gras. Nous savons déjà que l'inhibition de l'entrée mitochondriale de pyruvate ne modifie pas l'effet protecteur induit par les CAFs, suggérant qu'une utilisation accrue de pyruvate par la mitochondrie n'est pas impliquée dans les effets observés.

Nous observons également en Seahorse l'augmentation de l'ECAR des cellules malignes en présence des MC CAFs. L'ECAR mesure le relargage de protons concomitant au relargage de lactate, et renvoie ainsi classiquement à l'activité glycolytique des cellules. L'effet des MC CAFs sur l'ECAR des cellules malignes est ainsi surprenant étant donné que les MC CAFs ne contiennent plus de glucose. Ainsi, nous pouvons envisager que l'augmentation de l'ECAR observée est due à un relargage accru de lactate provenant de pyruvate issu d'alanine ou de malate (Zangari et al., 2020). Nous pouvons également supposer que les cellules malignes utilisent les stocks de glycogène qu'elles possèdent, et génèrent ainsi tout de même du lactate via des étapes de la glycolyse. La lignée MDA-MB-468 présente d'ailleurs une capacité de stockage de glycogène non négligeable par rapport à d'autres lignées de cancer du sein (Altemus et al., 2019).

Afin de consolider nos résultats en Seahorse, il serait important de réaliser l'expérience à des temps d'incubation plus longs. Nous pourrions également tenter de distinguer la provenance mitochondriale ou cytosolique de l'ATP produit par les cellules malignes sous influence des CAFs par un test adapté, nous permettant de préciser l'influence des CAFs sur la dépendance énergétique des cellules malignes (Sakamuri et al., 2022).

L'analyse DGE des données bulk RNAseq générées à partir des MDA-MB-468 sous influence de l'ABT-737 et des MC CAFs n'a pas révélé de voie métabolique majeure induite ou freinée directement par les CAFs. Des études montrent en effet que la transcriptomique n'est pas le meilleur prédicteur des flux métaboliques (Chubukov et al., 2013; Donati et al., 2018; Gerosa et al., 2015), en particulier puisque ces flux sont principalement régulés post-transcriptionnellement. La métabolomique et en particulier les nouvelles technologies de traçage de nutriments radiomarqués permettent de mieux comprendre les flux métaboliques des cellules malignes (Emwas et al., 2022). Dans notre étude, il serait intéressant de préciser l'utilisation du glucose par les MDA-MB-468 sous ABT-737, afin de mettre en évidence les spécificités métaboliques de cette lignée cancéreuse.

Implication potentielle de certains processus cellulaires dans les effets protecteurs des CAFs

L'analyse DGE des données bulk RNAseq générées à partir des MDA-MB-468 sous influence de l'ABT-737 et des MC CAFs suggèrent qu'à la fois les MC CAFs et l'ABT-737 induisent un stress cellulaire. Il est largement connu dans la littérature que la déprivation en glucose conduit elle aussi à de tels effets, ce que nous retrouvons également dans notre analyse. Nous avons ainsi montré que l'absence de glucose ainsi que les MC CAFs induisent la voie phospho-EIF2 α /ATF4 dans les MDA-MB-468. L'ABT-737 induit aussi cette voie. Il a déjà été décrit que l'induction de phospho-EIF2 α /ATF4 pouvait participer à la mort cellulaire (H. Zhu et al., 2012) ou bien à la survie des cellules (Kalkavan et al., 2022) soumises à l'ABT-737. Des études ont montré que le niveau et la durée d'activation d'ATF4 déterminent son action sur le devenir cellulaire (Wortel et al., 2017). Nous nous sommes demandé si l'induction de cette voie par l'absence de glucose et les MC CAFs participait aux effets protecteurs observés. La **Figure 40** montre que les MC CAFs et l'ABT-737 induisent tous deux ATF4 mais avec une cinétique d'induction plus rapide pour l'ABT-737 (dès 12h) que pour les MC CAFs (24h), reflétant des effets et des origines potentiellement différents.

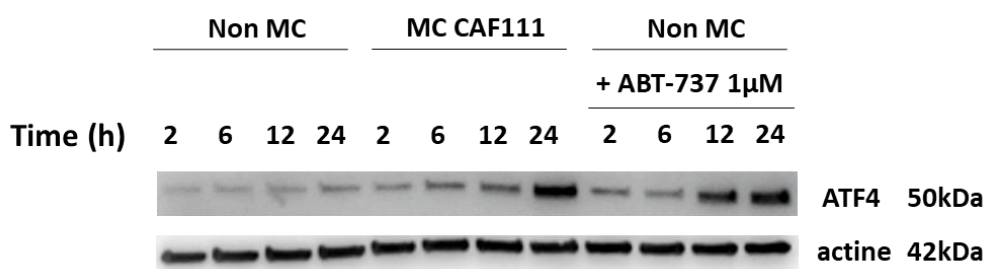


Figure 40 : Niveau d'ATF4 dans les MDA-MB-468 sous influence des MC CAFs et de l'ABT-737 en fonction du temps en western blot.

L'actine a été utilisée comme contrôle de charge.

Nos résultats de délétion génique d'ATF4 semblent indiquer que cette protéine n'est cependant pas nécessaire aux effets protecteurs des CAFs. De plus, l'inhibition pharmacologique de l'activité de PERK et donc de la phosphorylation d'EIF2 α dépendante de PERK n'a pas montré d'effet sur la protection induite par les CAFs. Il serait également intéressant de tester dans ce contexte l'implication des voies IRE1 α et ATF6 dans les effets protecteurs des CAFs. Nos données indiquent déjà que l'inhibition pharmacologique de l'activité RNase d'IRE1 α par le MKC8866 n'a pas d'effet seul sur la protection induite par les CAFs contre l'ABT-737 (non montré). Afin d'éliminer des compensations potentielles, il serait intéressant de regarder l'effet simultané du ciblage d'ATF4 et d'IRE1 α sur la protection induite

par les CAFs à l'apoptose.

L'augmentation d'ATF4 par les MC CAFs pourrait finalement être davantage un marqueur de l'action protectrice des CAFs sur les cellules malignes qu'un acteur clé. En effet, ATF4 est un effecteur majeur de la réponse intégrée au stress (ISR). L'ISR est caractérisée par la phosphorylation d'EIF2 α par PERK ou par d'autres voies comme la voie GCN2, la voie HRI (heme-regulated inhibitor) ou la voie PKR (double-stranded RNA-dependent protein kinase), ce qui module la traduction de nombreuses protéines permettant d'optimiser la réponse cellulaire au stress. ATF4 est donc un effecteur parmi d'autres de l'ISR. Les modulations traductionnelles induites par l'ISR dépendent de la nature et de l'intensité du stimulus de stress. L'ISR peut favoriser la survie cellulaire, mais l'exposition à un stress trop important détourne les signaux vers la mort cellulaire (Pakos-Zebrucka et al., 2016). En particulier, l'activation de GCN2 est induite par la déprivation en acides aminés, mais également par la déprivation en glucose, pouvant induire la survie ou la mort des cellules malignes (Qing et al., 2012; J. Ye et al., 2010). Ainsi, il serait intéressant de tester l'effet de la molécule ISRIB, qui inhibe l'activité d'EIF2 α phosphorylé, et donc inhibe la réponse effectrice de l'ISR, sur les effets protecteurs des CAFs.

Plus généralement dans notre modèle, une de nos hypothèses est que l'absence de glucose pourrait induire un stress bénéfique pour les cellules. En effet, ce stress pourrait induire des voies de protection nécessaires aux cellules pour affronter des stress supplémentaires tel que celui induit par l'ABT-737. Cette idée rejoint le modèle défendu récemment par Vaziri-Gohar et al, qui montre que l'abondance en glucose limite la synthèse de glutathion, rendant les cellules moins préparées pour contrer le stress oxydatif induit par la gemcitabine, et favorisant ainsi la mort des cellules cancéreuses pancréatiques *in vivo* (Vaziri-Gohar et al., 2023). Nous n'avons pas regardé l'implication du stress oxydatif dans les effets de la disponibilité en glucose et des CAFs. Il paraît primordial d'aborder cette implication potentielle au vu de nos résultats, et ce d'autant plus que la réponse au stress oxydatif est largement impliquée dans le devenir de cellules malignes stressées (Gentric et al., 2017, 2019; Y. Tang et al., 2022).

D'autres pistes pour expliquer les effets protecteurs des CAFs émanent de notre analyse DGE sur les données RNAseq. L'ARN long non codant (ARNlnc) UCA1 (urothelial carcinoma-associated 1) nous intéresse particulièrement puisqu'il est le seul gène retrouvé sous-exprimé en présence d'ABT-737, mais pas en présence des MC CAFs. Cet ARNlnc est d'autant plus intéressant qu'il peut limiter l'apoptose des cellules malignes *in vitro* (Ghafouri-Fard & Taheri, 2019), notamment en modulant diverses voies cellulaires, et en régulant positivement les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 par inhibition de différents miARNs (Fang et al., 2016; Y. Zhou et al., 2017). Il serait intéressant de préciser la fonction d'UCA1 dans notre modèle, en générant des cellules malignes déficientes en UCA1

et en précisant les miARNs interagissant avec UCA1 en fonction des différentes conditions par immunoprécipitation.

Importance de MCL-1 dans les effets observés

Nous avons montré l'implication de MCL-1 dans les effets protecteurs des MC CAFs contre l'apoptose des MDA-MB-468 dans notre deuxième étude. Nous montrons notamment que les MC CAFs augmentent les niveaux de MCL-1 dans les cellules malignes. De façon intéressante, cette augmentation semble être médiée par la déprivation en glucose puisque l'absence de glucose seule induit également l'augmentation de MCL-1. Cette augmentation peut être liée à l'augmentation de la transcription de MCL-1 ou bien à sa stabilisation. Dans la littérature, la déprivation en glucose a plutôt été montrée comme favorisant la mort cellulaire en régulant négativement la synthèse de MCL-1 (Coloff, Macintyre, et al., 2011b), par exemple en inhibant mTOR par l'activation d'AMPK (Pradelli et al., 2010). De plus, le métabolisme du glucose a été montré comme régulant positivement la stabilité de MCL-1 en augmentant la phosphorylation inactivatrice de GSK3, ce qui limite la dégradation de MCL-1 (Y. Zhao et al., 2007). Nos résultats indiquent au contraire que l'absence de glucose augmente les niveaux de MCL-1 dans les cellules MDA-MB-468, et les protège de la mort induite par le ciblage des autres protéines anti-apoptotiques BCL-xL et BCL-2. La stabilité de la protéine MCL-1 est également régulée par les kinases ERK, JNK et P38, qui peuvent stabiliser ou au contraire faciliter la dégradation de MCL-1 suivant les phosphorylations effectuées (L. W. Thomas et al., 2010). La compréhension du mécanisme de régulation de MCL-1, dans un premier temps en regardant par western blot l'activation de ces différentes voies dans nos conditions, apporterait une plus-value à nos travaux. Ce mécanisme pourrait révéler les particularités du fond cellulaire étudié.

De plus, au-delà de l'augmentation du niveau protéique de MCL-1, il est envisageable que des fonctions non canoniques pro-tumorales de MCL-1 puissent être modulées sous influence des MC CAFs. En effet, MCL-1 a été décrite, notamment sa forme matricielle, comme pouvant réguler certaines voies métaboliques mitochondriales, et plus généralement la structure des mitochondries (Bonneaud et al., 2022; Perciavalle et al., 2012; Prew et al., 2022). Une autre étude a montré que MCL-1 favorise l'OXPPOS de cellules de CSTN, indépendamment de sa fonction anti-apoptotique dépendante du domaine BH3 (K. Lee et al., 2017). Ces fonctions non canoniques pourraient apporter un avantage considérable à des cellules soumises à des déprivations en nutriments, les aidant notamment à adapter leur métabolisme à des nouvelles conditions nutritives.

Nos travaux de recherche montrent ainsi l'importance de MCL-1 dans la survie de cellules malignes de CSTN, en particulier dans un contexte appauvri en nutriments et sous l'influence des CAFs du

microenvironnement. L'utilisation d'un ciblage pharmacologique de MCL-1 semble pour l'instant limité par sa toxicité sur les cardiomyocytes (Rasmussen et al., 2020). En revanche, une meilleure compréhension de la régulation de cette protéine anti-apoptotique par le microenvironnement permettrait de proposer des cibles potentielles pour outrepasser le dialogue entre les deux types cellulaires.

Vulnérabilités thérapeutiques induites par l'absence de glucose sous influence des CAFs

Nous avons montré que les cellules de CSTN présentent une meilleure sensibilité à l'ABT-737 en présence de glucose. Ce résultat suggère que des tumeurs ayant davantage accès au glucose seraient plus sensibles aux traitements. Cette notion d'un effet positif du glucose et par extension d'une glycémie élevée sur la réponse aux traitements est surprenante. En effet, de nombreuses analyses montrent que le diabète (principalement de type II) est un facteur de mauvais pronostic dans les cancers du sein en général (Erickson et al., 2011; Peairs et al., 2011; S. Shao et al., 2018; Verlatto et al., 2003). Une étude plus récente dans le cancer du sein métastatique montre l'absence d'association entre diabète et progression tumorale/survie à 5 ans (Cheung et al., 2022). Cependant, de nombreux autres paramètres associés au diabète (pathologies associées, traitements) ne sont pas pris en compte dans la majorité des études. De plus, le taux de glycémie n'est pas systématiquement proportionnel à la quantité de glucose accessible localement pour les cellules malignes, puisque le stroma module justement l'accessibilité des nutriments au sein de la tumeur (Altea-Manzano et al., 2020).

En lien avec des différences de sensibilité à l'apoptose des MDA-MB-468 et la disponibilité en glucose, nous avons montré qu'il était possible de prendre avantage de la déprivation en glucose induite par les CAFs en utilisant la metformine, qui abolit alors les effets protecteurs des CAFs contre l'ABT-737. Ces résultats sont en accord avec d'autres études *in vitro* montrant que la metformine induit davantage la mort des cellules de lignées de CSTN lorsque le glucose est absent (Y. Li et al., 2023b; Menendez et al., 2012; Wahdan-Alaswad et al., 2013).

L'action principale de la metformine consiste à inhiber le complexe I de la chaîne mitochondriale respiratoire, diminuant ainsi la production d'énergie par la cellule et activant AMPK (De & Kuppasamy, 2020). Ceci limite notamment l'efflux des traitements. L'activité inhibitrice de la metformine sur l'activité respiratoire des cellules explique que son efficacité est plus importante en absence de glucose. En effet, des cellules qui ne disposent plus de glucose vont avoir tendance à dépendre davantage de la respiration mitochondriale. L'absence de glucose et l'inhibition de la respiration

mitochondriale favorisent ainsi une crise énergétique délétère pour les cellules (Bost, 2012; Hua et al., 2023). De plus, il a été montré que cette crise est associée à une diminution particulièrement drastique de l'activité de mTOR par la metformine lorsque la concentration en glucose est diminuée (Zordoky et al., 2014). Cette diminution de mTOR pourrait expliquer la diminution de MCL-1 induite par la metformine en absence de glucose (Pradelli et al., 2010). De plus, il a été montré, dans des conditions limitées en glucose uniquement, que la metformine induit la phosphorylation inactivatrice de GSK3, ce qui diminue drastiquement les niveaux de MCL-1 (Elgendy et al., 2019). Il serait intéressant de préciser l'état d'activation de la voie mTOR et de la phosphorylation de GSK3 dans nos différentes conditions, qui pourraient expliquer les diminutions de MCL-1 observées sous metformine dans des conditions limitées en glucose uniquement.

Notre étude défend le potentiel thérapeutique de la metformine en cancérologie, d'autant plus dans un contexte intégré dans lequel les cellules malignes sont entourées de CAFs qui régulent leur accessibilité au glucose. Une étude rétrospective sur des patientes diabétiques atteintes de cancer du sein métastatique montre en effet que les patientes traitées à la metformine présentent une meilleure survie globale à 5 ans (Cheung et al., 2022). D'autres études sur des patientes atteintes de cancer du sein montrent que la metformine améliore l'efficacité de certaines chimiothérapies (De & Kuppasamy, 2020). A l'inverse, des études montrent une absence d'effet de la metformine sur la progression tumorale en combinaison avec d'autres traitements dans le cancer du sein (P. J. Goodwin et al., 2022; Lord & Harris, 2023). Cependant, ces études ne classent pas les effets selon les différents sous-types de cancer du sein alors que notre étude *in vitro* et d'autres suggèrent que les effets de la metformine seraient restreints au cancer du sein triple négatif (Y. Li et al., 2023b; Wahdan-Alaswad et al., 2013). L'essai BREAKFAST en cours (NCT04248998) évalue justement l'activité antitumorale de la combinaison d'un régime cyclique imitant le jeûne, qui reproduit les effets *in vitro* de la privation de glucose, avec une chimiothérapie préopératoire standard à base d'anthracycline-taxane, avec ou sans la metformine chez des patientes atteintes de CSTN de stades I à III.

Une étude rapporte une possible association entre les effets bénéfiques de la metformine sur la réponse aux traitements et la présence de l'allèle C du polymorphisme de nucléotide simple non codant (SNP) rs11212617 situé près du gène de l'ataxie télangiectasie mutée (ATM). Dans des cancers HER2+, une réponse complète a été observée chez des patientes traitées à la metformine en combinaison au trastuzumab et au paclitaxel (Cuyàs et al., 2019). Ces résultats appuient l'importance d'identifier les patientes susceptibles de répondre à la metformine en combinaison avec d'autres traitements, ce qui nécessite de mieux comprendre les spécificités des cellules cancéreuses résistantes aux traitements lors d'une déprivation en glucose.

De plus, notre analyse DGE sur données RNAseq a identifié le gène *GPR132*, codant pour un récepteur couplé aux protéines G, comme surexprimé dans les MDA-MB-468 sous l'influence des MC CAFs. De façon intéressante, il a été montré que la molécule ONC212, un agoniste de GPR132 en phase d'essais cliniques dans le cancer du pancréas, synergise avec l'inhibition de la glycolyse pour induire la mort des cellules malignes (Ferrarini et al., 2021; Nii et al., 2019). En particulier, seules les cellules dépendantes de l'OXPPOS semblent être sensibilisées à ONC212 (Ferrarini et al., 2021). Dans notre modèle, nous montrons également que la molécule ONC212 seule induit la mort de 50% des cellules malignes en absence de glucose (**Figure 41A**). Cette mort est amplifiée en présence d'ABT-737. De même, nous observons que la molécule ONC212, seule ou en association avec l'ABT-737, favorise la mort des MDA-MB-468 en présence des MC CAFs, en accord avec la déprivation en glucose dans ces milieux (**Figure 41B**). Nous montrons ainsi que les CAFs ne protègent plus les cellules MDA-MB-468 de l'ABT-737 en présence d'ONC212. Nous avons donc identifié une deuxième vulnérabilité thérapeutique dans le dialogue entre cellules malignes et CAFs, puisque nous montrons que la molécule ONC212 abolit les effets protecteurs des MC CAFs et induit même davantage de mort dans ces milieux, vraisemblablement en prenant avantage de la déprivation en glucose.

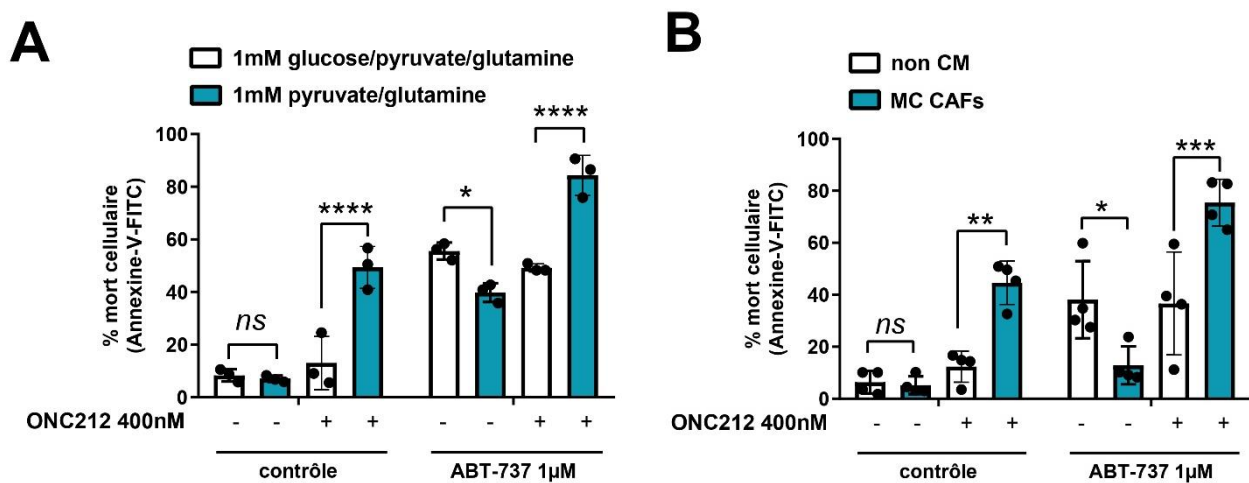


Figure 41 : Effet d'ONC212 sur la sensibilité des MDA-MB-468 à l'ABT-737 en absence de glucose et sous l'influence des MC CAFs.

A. Effet d'ONC212 en absence de glucose. **B.** Effet d'ONC212 en présence des MC CAFs. Les P-values ont été déterminées en réalisant un test ANOVA à 2 facteurs, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

CONCLUSION GENERALE

Dans les cancers du sein, l'efficacité des traitements est limitée par la résistance intrinsèque des cellules malignes à l'apoptose. Les cellules du microenvironnement participent à cette résistance à l'apoptose en établissant un dialogue étroit avec les cellules malignes.

Mes travaux de thèse ont mis en évidence l'importance des protéines BCL-xL et MCL-1 dans la survie de cellules de cancer du sein du sous type triple négatif. En particulier, BCL-xL est un frein majeur à l'efficacité d'une chimiothérapie conventionnelle dans ces cellules. Nous montrons que même lorsque ce frein est outrepassé, les CAFs du microenvironnement favorisent la survie des cellules malignes.

La suite de mes travaux a eu pour objectif de mieux comprendre le phénomène de résistance induit par les CAFs à un ciblage de BCL-xL dans les cellules de CSTN. Les expériences réalisées ont permis de mettre en évidence des dépendances métaboliques spécifiques dans la survie de la lignée de CSTN MDA-MB-468 contre le ciblage de BCL-xL et BCL-2 par l'ABT-737. De façon intéressante, au-delà d'apports de potentiels facteurs spécifiques des CAFs aux cellules cancéreuses, la protection des cellules malignes par les CAFs est médiée par une modulation du contexte nutritif dans le modèle étudié. En particulier, la privation en glucose induite par les CAFs est un élément clé de la protection contre l'ABT-737. J'ai mis en avant également l'implication de la protéine de compensation MCL-1 dans les effets protecteurs des CAFs et de la privation en glucose. Enfin, des vulnérabilités thérapeutiques induites par les CAFs en lien avec la privation en glucose qu'ils induisent ont pu être mises en avant. Ainsi, la metformine, déjà utilisée en clinique pour traiter des patients atteints de diabète, induit la perte totale des effets protecteurs des CAFs.

D'autres vulnérabilités sont associées à l'absence de glucose dans l'environnement des cellules malignes, qu'il serait intéressant d'exploiter. Les effets observés semblent spécifiques d'un certain contexte cellulaire cancéreux. Il me semble ainsi primordial de décrypter la spécificité des cellules malignes étudiées permettant le dialogue pro-tumoral avec les CAFs, dans le but de cibler plus spécifiquement les patientes susceptibles de répondre à une combinaison de metformine avec des traitements qui induisent la mort cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Abal, M., Andreu, J. M., & Barasoain, I. (2003). Taxanes : Microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Current Cancer Drug Targets*, 3(3), 193-203. <https://doi.org/10.2174/1568009033481967>
- Abe, R., Donnelly, S. C., Peng, T., Bucala, R., & Metz, C. N. (2001). Peripheral blood fibrocytes : Differentiation pathway and migration to wound sites. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(12), 7556-7562. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7556>
- Acerbi, I., Cassereau, L., Dean, I., Shi, Q., Au, A., Park, C., Chen, Y., Liphardt, J., Hwang, E., & Weaver, V. (2015). Human Breast Cancer Invasion and Aggression Correlates with ECM Stiffening and Immune Cell Infiltration. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 7(10), 1120-1134. <https://doi.org/10.1039/c5ib00040h>
- Adam, J., Hatipoglu, E., O'Flaherty, L., Ternette, N., Sahgal, N., Lockstone, H., Baban, D., Nye, E., Stamp, G. W., Wolhuter, K., Stevens, M., Fischer, R., Carmeliet, P., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Frizzell, N., Soga, T., Kessler, B. M., El-Bahrawy, M., ... Pollard, P. J. (2011). Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway : Roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell*, 20(4), 524-537. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.006>
- Adams, K. W., & Cooper, G. M. (2007). Rapid turnover of mcl-1 couples translation to cell survival and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(9), 6192-6200. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610643200>
- Ahirwar, D. K., Nasser, M. W., Ouseph, M. M., Elbaz, M., Cuitiño, M. C., Kladney, R. D., Varikuti, S., Kaul, K., Satoskar, A. R., Ramaswamy, B., Zhang, X., Ostrowski, M. C., Leone, G., & Ganju, R. K. (2018). Fibroblast-derived CXCL12 promotes breast cancer metastasis by facilitating tumor cell intravasation. *Oncogene*, 37(32), 4428-4442. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0263-7>
- Ahmadi, Y., Karimian, R., & Panahi, Y. (2018). Effects of statins on the chemoresistance-The antagonistic drug-drug interactions versus the anti-cancer effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 108, 1856-1865. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.122>
- Ahmadzadeh, M., & Rosenberg, S. A. (2005). TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(9), 5215-5223. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5215>
- Ahn, C. S., & Metallo, C. M. (2015). Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer & Metabolism*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40170-015-0128-2>
- Alavian, K. N., Li, H., Collis, L., Bonanni, L., Zeng, L., Sacchetti, S., Lazrove, E., Nabili, P., Flaherty, B., Graham, M., Chen, Y., Messerli, S. M., Mariggio, M. A., Rahner, C., McNay, E., Shore, G. C., Smith, P. J. S., Hardwick, J. M., & Jonas, E. A. (2011). Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nature Cell Biology*, 13(10), 1224-1233. <https://doi.org/10.1038/ncb2330>
- Albregues, J., Bertero, T., Grasset, E., Bonan, S., Mael, M., Bourget, I., Philippe, C., Herraiz Serrano, C., Benamar, S., Croce, O., Sanz-Moreno, V., Meneguzzi, G., Feral, C. C., Cristofari, G., & Gaggioli, C. (2015). Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nature Communications*, 6, 10204. <https://doi.org/10.1038/ncomms10204>
- Alday-Parejo, B., Stupp, R., & Rüegg, C. (2019). Are Integrins Still Practicable Targets for Anti-

- Cancer Therapy? *Cancers*, 11(7), 978. <https://doi.org/10.3390/cancers11070978>
- Allaoui, R., Bergenfelz, C., Mohlin, S., Hagerling, C., Salari, K., Werb, Z., Anderson, R. L., Ethier, S. P., Jirstrom, K., Pahlman, S., Bexell, D., Tahin, B., Johansson, M. E., Larsson, C., & Leandersson, K. (2016). Cancer-associated fibroblast-secreted CXCL16 attracts monocytes to promote stroma activation in triple-negative breast cancers. *Nature Communications*, 7, 13050. <https://doi.org/10.1038/ncomms13050>
- Allen, M., & Louise Jones, J. (2011). Jekyll and Hyde : The role of the microenvironment on the progression of cancer. *The Journal of Pathology*, 223(2), 162-176. <https://doi.org/10.1002/path.2803>
- Altea-Manzano, P., Cuadros, A. M., Broadfield, L. A., & Fendt, S. (2020). Nutrient metabolism and cancer in the in vivo context : A metabolic game of give and take. *EMBO Reports*, 21(10), Article 10. <https://doi.org/10.15252/embr.202050635>
- Altemus, M. A., Goo, L. E., Little, A. C., Yates, J. A., Cheriyan, H. G., Wu, Z. F., & Merajver, S. D. (2019). Breast cancers utilize hypoxic glycogen stores via PYGB, the brain isoform of glycogen phosphorylase, to promote metastatic phenotypes. *PLoS ONE*, 14(9), e0220973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220973>
- Alves, N. L., Derks, I. A. M., Berk, E., Spijker, R., van Lier, R. A. W., & Eldering, E. (2006). The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity*, 24(6), 703-716. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.03.018>
- Al-Zabeeby, A., Vogler, M., Milani, M., Richards, C., Alotibi, A., Greaves, G., Dyer, M. J. S., Cohen, G. M., & Varadarajan, S. (2019). Targeting intermediary metabolism enhances the efficacy of BH3 mimetic therapy in hematologic malignancies. *Haematologica*, 104(5), 1016-1025. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.204701>
- An, J., Enomoto, A., Weng, L., Kato, T., Iwakoshi, A., Ushida, K., Maeda, K., Ishida-Takagishi, M., Ishii, G., Ming, S., Sun, T., & Takahashi, M. (2013). Significance of cancer-associated fibroblasts in the regulation of gene expression in the leading cells of invasive lung cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(3), Article 3. <https://doi.org/10.1007/s00432-012-1328-6>
- Andreopoulou, E., & Sparano, J. A. (2013). Chemotherapy in Patients with Anthracycline- and Taxane-Pretreated Metastatic Breast Cancer : An Overview. *Current breast cancer reports*, 5(1), 42-50. <https://doi.org/10.1007/s12609-012-0097-1>
- Andrzejewski, S., Klimcakova, E., Johnson, R. M., Tabariès, S., Annis, M. G., McGuirk, S., Northey, J. J., Chénard, V., Sriram, U., Papadopoli, D. J., Siegel, P. M., & St-Pierre, J. (2017). PGC-1 α Promotes Breast Cancer Metastasis and Confers Bioenergetic Flexibility against Metabolic Drugs. *Cell Metabolism*, 26(5), 778-787.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.006>
- Antoch, G., Saoudi, N., Kuehl, H., Dahmen, G., Mueller, S. P., Beyer, T., Bockisch, A., Debatin, J. F., & Freudenberg, L. S. (2004). Accuracy of whole-body dual-modality fluorine-18-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography and computed tomography (FDG-PET/CT) for tumor staging in solid tumors : Comparison with CT and PET. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(21), 4357-4368. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.08.120>
- Ao, M., Brewer, B. M., Yang, L., Franco Coronel, O. E., Hayward, S. W., Webb, D. J., & Li, D. (2015). Stretching fibroblasts remodels fibronectin and alters cancer cell migration. *Scientific Reports*, 5, 8334. <https://doi.org/10.1038/srep08334>
- Aoudjit, F., & Vuori, K. (2001). Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, 20(36), Article 36. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204554>
- Arbour, N., Vanderluit, J. L., Le Grand, J. N., Jahani-Asl, A., Ruzhynsky, V. A., Cheung, E. C. C., Kelly, M. A., MacKenzie, A. E., Park, D. S., Opferman, J. T., & Slack, R. S. (2008). Mcl-1 is a key regulator of apoptosis during CNS development and after DNA damage. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(24), Article 24. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4940-07.2008>
- Armstrong, T. (2004). Type I Collagen Promotes the Malignant Phenotype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*,

- 10(21), Article 21.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0825>
- Augsten, M. (2014). Cancer-Associated Fibroblasts as Another Polarized Cell Type of the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 4, 62.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00062>
- Augsten, M., Hägglöf, C., Olsson, E., Stolz, C., Tsagozis, P., Levchenko, T., Frederick, M. J., Borg, A., Micke, P., Egevad, L., & Ostman, A. (2009). CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), Article 9.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0813144106>
- Avustinova, A., Iravani, M., Robertson, D., Fearn, A., Gao, Q., Klingbeil, P., Hanby, A. M., Speirs, V., Sahai, E., Calvo, F., & Isacke, C. M. (2016). Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. *Nature Communications*, 7, 10305.
<https://doi.org/10.1038/ncomms10305>
- Avnet, S., Lemma, S., Cortini, M., Pellegrini, P., Perut, F., Zini, N., Kusuzaki, K., Chano, T., Grisendi, G., Dominici, M., De Milito, A., & Baldini, N. (2016). Altered pH gradient at the plasma membrane of osteosarcoma cells is a key mechanism of drug resistance. *Oncotarget*, 7(39), 63408-63423.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11503>
- Aydinlik, S., Erkisa, M., Cevatemre, B., Sarimahmut, M., Dere, E., Ari, F., & Ulukaya, E. (2017). Enhanced cytotoxic activity of doxorubicin through the inhibition of autophagy in triple negative breast cancer cell line. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects*, 1861(2), 49-57.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.013>
- Azeez, J. M., Susmi, T. R., Remadevi, V., Ravindran, V., Sasikumar Sujatha, A., Ayswarya, R. nair S., & Sreeja, S. (2021). New insights into the functions of progesterone receptor (PR) isoforms and progesterone signaling. *American Journal of Cancer Research*, 11(11), 5214-5232.
- Bacci, M., Lorito, N., Ippolito, L., Ramazzotti, M., Luti, S., Romagnoli, S., Parri, M., Bianchini, F., Cappellesso, F., Virga, F., Gao, Q., Simões, B. M., Marangoni, E., Martin, L.-A., Comito, G., Ferracin, M., Giannoni, E., Mazzone, M., Chiarugi, P., & Morandi, A. (2019). Reprogramming of Amino Acid Transporters to Support Aspartate and Glutamate Dependency Sustains Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cell Reports*, 28(1), 104-118.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.010>
- Bae, J., Leo, C. P., Hsu, S. Y., & Hsueh, A. J. (2000). MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(33), Article 33.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M909826199>
- Baenke, F., Chaneton, B., Smith, M., Van Den Broek, N., Hogan, K., Tang, H., Viros, A., Martin, M., Galbraith, L., Girotti, M. R., Dhomen, N., Gottlieb, E., & Marais, R. (2016). Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. *Molecular Oncology*, 10(1), 73-84.
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.08.003>
- Bai, Y.-P., Shang, K., Chen, H., Ding, F., Wang, Z., Liang, C., Xu, Y., Sun, M.-H., & Li, Y.-Y. (2015). FGF-1/-3/FGFR4 signaling in cancer-associated fibroblasts promotes tumor progression in colon cancer through Erk and MMP-7. *Cancer Science*, 106(10), 1278-1287.
<https://doi.org/10.1111/cas.12745>
- Bajpai, R., Matulis, S. M., Wei, C., Nooka, A. K., Von Hollen, H. E., Lonial, S., Boise, L. H., & Shanmugam, M. (2016). Targeting glutamine metabolism in multiple myeloma enhances BIM binding to BCL-2 eliciting synthetic lethality to venetoclax. *Oncogene*, 35(30), 3955-3964.
<https://doi.org/10.1038/onc.2015.464>
- Balachander, S. B., Criscione, S. W., Byth, K. F., Cidado, J., Adam, A., Lewis, P., Macintyre, T., Wen, S., Lawson, D., Burke, K., Lubinski, T., Tyner, J. W., Kurtz, S. E., McWeeney, S. K., Varnes, J., Diebold, R. B., Gero, T., Ioannidis, S., Hennessy, E. J., ... Gibbons, F. D. (2020). AZD4320, A Dual Inhibitor of Bcl-2 and Bcl-xL, Induces Tumor Regression in Hematologic Cancer Models without Dose-limiting Thrombocytopenia. *Clinical Cancer Research*, 26(24), 6535-6549.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0863>
- Balic, M., Thomssen, C., Gnant, M., & Harbeck, N. (2023). St. Gallen/Vienna 2023 : Optimization of Treatment for Patients with Primary Breast Cancer – A Brief Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care*, 18(3), 213-222.
<https://doi.org/10.1159/000530584>

- Balko, J. M., Giltnane, J. M., Wang, K., Schwarz, L. J., Young, C. D., Cook, R. S., Owens, P., Sanders, M. E., Kuba, M. G., Sánchez, V., Kurupi, R., Moore, P. D., Pinto, J. A., Doimi, F. D., Gómez, H., Horiuchi, D., Goga, A., Lehmann, B. D., Bauer, J. A., ... Arteaga, C. L. (2014). Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer discovery*, 4(2), 232-245. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0286>
- Balsamo, M., Scordamaglia, F., Pietra, G., Manzini, C., Cantoni, C., Boitano, M., Queirolo, P., Vermi, W., Facchetti, F., Moretta, A., Moretta, L., Mingari, M. C., & Vitale, M. (2009). Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(49), Article 49. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906481106>
- Baratelli, F., Lin, Y., Zhu, L., Yang, S.-C., Heuzé-Vourc'h, N., Zeng, G., Reckamp, K., Dohadwala, M., Sharma, S., & Dubinett, S. M. (2005). Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(3), 1483-1490. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1483>
- Bárdos, J. I., & Ashcroft, M. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *BioEssays*, 26(3), 262-269. <https://doi.org/10.1002/bies.20002>
- Bashari, M. H., Fan, F., Vallet, S., Sattler, M., Arn, M., Luckner-Minden, C., Schulze-Bergkamen, H., Zörnig, I., Marme, F., Schneeweiss, A., Cardone, M. H., Opferman, J. T., Jäger, D., & Podar, K. (2016). Mcl-1 confers protection of Her2-positive breast cancer cells to hypoxia : Therapeutic implications. *Breast Cancer Research: BCR*, 18(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0686-4>
- Basu, A., & Sridharan, S. (2017). Regulation of anti-apoptotic Bcl-2 family protein Mcl-1 by S6 kinase 2. *PLOS ONE*, 12(3), e0173854. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173854>
- Bazzichetto, C., Conciatori, F., Pallocca, M., Falcone, I., Fanciulli, M., Cognetti, F., Milella, M., & Ciuffreda, L. (2019). PTEN as a Prognostic/Predictive Biomarker in Cancer : An Unfulfilled Promise? *Cancers*, 11(4), 435. <https://doi.org/10.3390/cancers11040435>
- Belisario, D. C., Kopecka, J., Pasino, M., Akman, M., De Smaele, E., Donadelli, M., & Riganti, C. (2020). Hypoxia Dictates Metabolic Rewiring of Tumors : Implications for Chemoresistance. *Cells*, 9(12), 2598. <https://doi.org/10.3390/cells9122598>
- Beloueche-Babari, M., Wantuch, S., Casals Galobart, T., Koniordou, M., Parkes, H. G., Arunan, V., Chung, Y.-L., Eykyn, T. R., Smith, P. D., & Leach, M. O. (2017). MCT1 inhibitor AZD3965 increases mitochondrial metabolism, facilitating combination therapy and non-invasive magnetic resonance spectroscopy. *Cancer research*, 77(21), 5913-5924. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2686>
- Berman, S. B., Chen, Y., Qi, B., McCaffery, J. M., Rucker, E. B., Goebbels, S., Nave, K.-A., Arnold, B. A., Jonas, E. A., Pineda, F. J., & Hardwick, J. M. (2009). Bcl-x L increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons. *The Journal of Cell Biology*, 184(5), 707-719. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809060>
- Beroukhim, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J. S., Dobson, J., Urashima, M., McHenry, K. T., Pinchback, R. M., Ligon, A. H., Cho, Y.-J., Haery, L., Greulich, H., Reich, M., Winckler, W., Lawrence, M. S., ... Meyerson, M. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 463(7283), Article 7283. <https://doi.org/10.1038/nature08822>
- Bertero, T., Oldham, W. M., Grasset, E. M., Bourget, I., Boulter, E., Pisano, S., Hofman, P., Bellvert, F., Meneguzzi, G., Bulavin, D. V., Estrach, S., Feral, C. C., Chan, S. Y., Bozec, A., & Gaggioli, C. (2019). Tumor-Stroma Mechanics Coordinate Amino Acid Availability to Sustain Tumor Growth and Malignancy. *Cell Metabolism*, 29(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.012>
- Bertout, J. A., Patel, S. A., & Simon, M. C. (2008). The impact of O2 availability on human cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 8(12), 967-975. <https://doi.org/10.1038/nrc2540>
- Besse, B., Tsao, L. C., Chao, D. T., Fang, Y., Soria, J.-C., Almokadem, S., & Belani, C. P. (2013). Phase Ib safety and pharmacokinetic study of volociximab, an anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibody, in combination with carboplatin and paclitaxel in advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology: Official Journal*

- of the European Society for Medical Oncology, 24(1), 90-96. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds281>
- Bessou, M., Lopez, J., Gadet, R., Deygas, M., Popgeorgiev, N., Poncet, D., Nougarede, A., Billard, P., Mikaelian, I., Gonzalo, P., Rimokh, R., & Gillet, G. (2020). The apoptosis inhibitor Bcl-xL controls breast cancer cell migration through mitochondria-dependent reactive oxygen species production. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1212-9>
- Bervers, E. M., Comfurius, P., van Rijn, J. L., Hemker, H. C., & Zwaal, R. F. (1982). Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *European Journal of Biochemistry*, 122(2), 429-436. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb05898.x>
- Bhatt, S., Pioso, M. S., Olesinski, E. A., Yilma, B., Ryan, J. A., Mashaka, T., Leutz, B., Adamia, S., Zhu, H., Kuang, Y., Mogili, A., Louissaint, A., Bohl, S. R., Kim, A. S., Mehta, A. K., Sanghavi, S., Wang, Y., Morris, E., Halilovic, E., ... Letai, A. (2020). Reduced Mitochondrial Apoptotic Priming Drives Resistance to BH3 Mimetics in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*, 38(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.10.010>
- Biffi, G., Oni, T. E., Spielman, B., Hao, Y., Elyada, E., Park, Y., Preall, J., & Tuveson, D. A. (2019). IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF β to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discovery*, 9(2), 282-301. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0710>
- Birsoy, K., Wang, T., Chen, W. W., Freinkman, E., Abu-Remaileh, M., & Sabatini, D. M. (2015). An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell*, 162(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.016>
- Blagosklonny, M. V., Alvarez, M., Fojo, A., & Neckers, L. M. (1996). Bcl-2 protein downregulation is not required for differentiation of multidrug resistant HL60 leukemia cells. *Leukemia Research*, 20(2), 101-107. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(95\)00103-4](https://doi.org/10.1016/0145-2126(95)00103-4)
- Blaner, W. S., O'Byrne, S. M., Wongsiriroj, N., Kluwe, J., D'Ambrosio, D. M., Jiang, H., Schwabe, R. F., Hillman, E. M. C., Piantedosi, R., & Libien, J. (2009). Hepatic stellate cell lipid droplets : A specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1791(6), 467-473. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2008.11.001>
- Boire, A., Covic, L., Agarwal, A., Jacques, S., Sherifi, S., & Kuliopulos, A. (2005). PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell*, 120(3), 303-313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.018>
- Boisserie-Lacroix, M., Bullier, B., Hurtevent-Labrot, G., Ferron, S., Lippa, N., & Mac Grogan, G. (2014). Correlation between imaging and prognostic factors : Molecular classification of breast cancers. *Diagnostic and Interventional Imaging*, 95(2), 227-233. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2013.12.013>
- Bojarczuk, K., Sasi, B. K., Gobessi, S., Innocenti, I., Pozzato, G., Laurenti, L., & Efremov, D. G. (2016). BCR signaling inhibitors differ in their ability to overcome Mcl-1-mediated resistance of CLL B cells to ABT-199. *Blood*, 127(25), 3192-3201. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-675009>
- Bolomsky, A., Vogler, M., Köse, M. C., Heckman, C. A., Ehx, G., Ludwig, H., & Caers, J. (2020). MCL-1 inhibitors, fast-lane development of a new class of anti-cancer agents. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01007-9>
- Bonneau, C., Eliès, A., Kieffer, Y., Bourachot, B., Ladoire, S., Pelon, F., Hequet, D., Guinebretière, J.-M., Blanchet, C., Vincent-Salomon, A., Rouzier, R., & Mehta-Grigoriou, F. (2020). A subset of activated fibroblasts is associated with distant relapse in early luminal breast cancer. *Breast Cancer Research*, 22(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01311-9>
- Bonneaud, T. L., Lefebvre, C. C., Nocquet, L., Basseville, A., Roul, J., Weber, H., Campone, M., Juin, P. P., & Souazé, F. (2022). Targeting of MCL-1 in breast cancer-associated fibroblasts reverses their myofibroblastic phenotype and pro-invasive properties. *Cell Death & Disease*, 13(9), 787. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05214-9>
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), 730-737. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>

- Borgan, E., Sitter, B., Lingjærde, O. C., Johnsen, H., Lundgren, S., Bathen, T. F., Sørli, T., Børresen-Dale, A.-L., & Gribbestad, I. S. (2010). Merging transcriptomics and metabolomics—Advances in breast cancer profiling. *BMC Cancer*, *10*(1), 628. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-628>
- Borriello, L., Nakata, R., Sheard, M. A., Fernandez, G. E., Sposto, R., Malvar, J., Blavier, L., Shimada, H., Asgharzadeh, S., Seeger, R. C., & DeClerck, Y. A. (2017). Cancer-Associated Fibroblasts Share Characteristics and Protumorigenic Activity with Mesenchymal Stromal Cells. *Cancer Research*, *77*(18), 5142-5157. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2586>
- Bosc, C., Broin, N., Fanjul, M., Saland, E., Farge, T., Courdy, C., Batut, A., Masoud, R., Larrue, C., Skuli, S., Espagnol, N., Pagès, J.-C., Carrier, A., Bost, F., Bertrand-Michel, J., Tamburini, J., Récher, C., Bertoli, S., Mansat-De Mas, V., ... Joffre, C. (2020). Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nature Communications*, *11*(1), 4056. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17882-2>
- Bost, F. (2012). « Double hit » makes the difference. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *11*(16), 2979. <https://doi.org/10.4161/cc.21532>
- Boya, P., González-Polo, R.-A., Casares, N., Perfettini, J.-L., Dessen, P., Larochette, N., Métivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P., & Kroemer, G. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(3), 1025-1040. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.3.1025-1040.2005>
- Brahimi-Horn, M. C., Bellot, G., & Pouyssegur, J. (2011). Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Current Opinion in Genetics & Development*, *21*(1), 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.10.006>
- Brand, A., Singer, K., Koehl, G. E., Kolitzus, M., Schoenhammer, G., Thiel, A., Matos, C., Bruss, C., Klobuch, S., Peter, K., Kastenberger, M., Bogdan, C., Schleicher, U., Mackensen, A., Ullrich, E., Fichtner-Feigl, S., Kesselring, R., Mack, M., Ritter, U., ... Kreutz, M. (2016). LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metabolism*, *24*(5), 657-671. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.011>
- Brand, M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology*, *45*(7-8), 466-472. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>
- Briskin, C., & O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(12), a003178. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003178>
- Brizzi, M. F., Tarone, G., & Defilippi, P. (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Current Opinion in Cell Biology*, *24*(5), 645-651. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.07.001>
- Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z.-J., & Dong, Z. (2007). Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(28), 11649-11654. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703976104>
- Buechler, M. B., & Turley, S. J. (2018). A short field guide to fibroblast function in immunity. *Seminars in Immunology*, *35*, 48-58. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.11.001>
- Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A. W., Savage, M. I., Osborne, C. K., Hilsenbeck, S. G., Chang, J. C., Mills, G. B., Lau, C. C., & Brown, P. H. (2015). Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(7), 1688-1698. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>
- Burt, R., Dey, A., Aref, S., Aguiar, M., Akarca, A., Bailey, K., Day, W., Hooper, S., Kirkwood, A., Kirschner, K., Lee, S.-W., Lo Celso, C., Manji, J., Mansour, M. R., Marafioti, T., Mitchell, R. J., Muirhead, R. C., Cheuk Yan Ng, K., Pospori, C., ... Fielding, A. K. (2019). Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress. *Blood*, *134*(17), Article 17. <https://doi.org/10.1182/blood.2019001398>
- Busch, S., Andersson, D., Bom, E., Walsh, C., Ståhlberg, A., & Landberg, G. (2017). Cellular organization and molecular differentiation model of breast cancer-associated

- fibroblasts. *Molecular Cancer*, 16(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0642-7>
- Cacheux, W., Lièvre, A., Richon, S., Vacher, S., El Alam, E., Briaux, A., El Botty, R., Mariani, P., Buecher, B., Schnitzler, A., Barbazan, J., Roman-Roman, S., Bièche, I., & Dangles-Marie, V. (2019). Interaction between IGF2-PI3K axis and cancer-associated-fibroblasts promotes anal squamous carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 145(7), 1852-1859. <https://doi.org/10.1002/ijc.32178>
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R. P., Chaudhry, S. I., Harrington, K., Williamson, P., Moeendarbary, E., Charras, G., & Sahai, E. (2013). Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nature Cell Biology*, 15(6), 637-646. <https://doi.org/10.1038/ncb2756>
- Camelo, F., & Le, A. (2021). The Intricate Metabolism of Pancreatic Cancers. In *The Heterogeneity of Cancer Metabolism [Internet]*. 2nd edition. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65768-0_5
- Campbell, K. J., Dhayade, S., Ferrari, N., Sims, A. H., Johnson, E., Mason, S. M., Dickson, A., Ryan, K. M., Kalna, G., Edwards, J., Tait, S. W. G., & Blyth, K. (2018). MCL-1 is a prognostic indicator and drug target in breast cancer. *Cell Death & Disease*, 9(2), 19. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0035-2>
- Campbell, K. J., & Tait, S. W. G. (2018). Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biology*, 8(5), 180002. <https://doi.org/10.1098/rsob.180002>
- Camponé, M., Noël, B., Couriaud, C., Grau, M., Guillemin, Y., Gautier, F., Gouraud, W., Charbonnel, C., Campion, L., Jézéquel, P., Braun, F., Barré, B., Coqueret, O., Barillé-Nion, S., & Juin, P. (2011). C-Myc dependent expression of pro-apoptotic Bim renders HER2-overexpressing breast cancer cells dependent on anti-apoptotic Mcl-1. *Molecular Cancer*, 10, 110. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-110>
- Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61-70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Cano-González, A., Mauro-Lizcano, M., Iglesias-Serret, D., Gil, J., & López-Rivas, A. (2018). Involvement of both caspase-8 and Noxa-activated pathways in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in triple-negative breast tumor cells. *Cell Death & Disease*, 9(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0164-7>
- Cantley, L. C., & Neel, B. G. (1999). New insights into tumor suppression : PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), 4240-4245.
- Cantor, J. R., Abu-Remaileh, M., Kanarek, N., Freinkman, E., Gao, X., Louissaint, A., Lewis, C. A., & Sabatini, D. M. (2017). Physiologic Medium Rewires Cellular Metabolism and Reveals Uric Acid as an Endogenous Inhibitor of UMP Synthase. *Cell*, 169(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.023>
- Cárdenas-Aguayo, M. del C., Santa-Olalla, J., Baizabal, J.-M., Salgado, L.-M., & Covarrubias, L. (2003). Growth factor deprivation induces an alternative non-apoptotic death mechanism that is inhibited by Bcl2 in cells derived from neural precursor cells. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 12(6), 735-748. <https://doi.org/10.1089/15258160360732759>
- Carey, L. A. (2010). Through a Glass Darkly : Advances in Understanding Breast Cancer Biology, 2000–2010. *Clinical Breast Cancer*, 10(3), 188-195. <https://doi.org/10.3816/CBC.2010.n.026>
- Castiglione-Gertsch, M., Tattersall, M., Hacking, A., Goldhirsch, A., Gudgeon, A., Gelber, R. D., Lindtner, J., Coates, A., Collins, J., Isley, M., Senn, H. J., & Rudenstam, C. M. (1997). Retreating recurrent breast cancer with the same CMF-containing regimen used as adjuvant therapy. The International Breast Cancer Study Group. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 33(14), 2321-2325. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(97\)10011-9](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(97)10011-9)
- Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., & Moretta, A. (2003). Transforming growth factor β 1 inhibits expression of Nkp30 and NKG2D receptors : Consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 4120-4125. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730640100>

- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio cancer genomics portal : An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, 2(5), 401-404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., & Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, 9(5), 351-365. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.027>
- Chai, Y., Wang, C., Liu, W., Fan, Y., & Zhang, Y. (2019). MPC1 deletion is associated with poor prognosis and temozolomide resistance in glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 144(2), 293-301. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03226-8>
- Chan, S. M., Thomas, D., Corces-Zimmerman, M. R., Xavy, S., Rastogi, S., Hong, W.-J., Zhao, F., Medeiros, B. C., Tyvoll, D. A., & Majeti, R. (2015). Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia. *Nature Medicine*, 21(2), 178-184. <https://doi.org/10.1038/nm.3788>
- Chang, C.-H., Qiu, J., O'Sullivan, D., Buck, M. D., Noguchi, T., Curtis, J. D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M. M., van der Windt, G. J. W., Tonc, E., Schreiber, R. D., Pearce, E. J., & Pearce, E. L. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell*, 162(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.016>
- Chang, P.-H., Hwang-Verslues, W. W., Chang, Y.-C., Chen, C.-C., Hsiao, M., Jeng, Y.-M., Chang, K.-J., Lee, E. Y.-H. P., Shew, J.-Y., & Lee, W.-H. (2012). Activation of Robo1 signaling of breast cancer cells by Slit2 from stromal fibroblast restrains tumorigenesis via blocking PI3K/Akt/ β -catenin pathway. *Cancer Research*, 72(18), 4652-4661. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0877>
- Charpentier, E., Cornec, M., Dumont, S., Meistermann, D., Bordron, P., David, L., Redon, R., Bonnaud, S., & Bihouée, A. (2021). 3' RNA sequencing for robust and low-cost gene expression profiling [Preprint]. Protocol Exchange. <https://doi.org/10.21203/rs.3.pex-1336/v1>
- Chaveroux, C., Sarcinelli, C., Barbet, V., Belfeki, S., Barthelaix, A., Ferraro-Peyret, C., Lebecque, S., Renno, T., Bruhat, A., Fafournoux, P., & Manié, S. (2016). Nutrient shortage triggers the hexosamine biosynthetic pathway via the GCN2-ATF4 signalling pathway. *Scientific Reports*, 6, 27278. <https://doi.org/10.1038/srep27278>
- Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines : One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast disease*, 32(1-2), 35-48. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>
- Chen, D., Rauh, M., Buchfelder, M., Eyupoglu, I. Y., & Savaskan, N. (2017). The oxido-metabolic driver ATF4 enhances temozolamide chemoresistance in human gliomas. *Oncotarget*, 8(31), 51164-51176. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17737>
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M., & Huang, D. C. S. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell*, 17(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.12.030>
- Chen, P., Li, B., & Ou-Yang, L. (2022). Role of estrogen receptors in health and disease. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.839005>
- Chen, P., Zuo, H., Xiong, H., Kolar, M. J., Chu, Q., Saghatelian, A., Siegwart, D. J., & Wan, Y. (2017). Gpr132 sensing of lactate mediates tumor-macrophage interplay to promote breast cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(3), 580-585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614035114>
- Chen, P.-H., Cai, L., Huffman, K., Yang, C., Kim, J., Faubert, B., Boroughs, L., Ko, B., Sudderth, J., McMillan, E. A., Girard, L., Chen, D., Peyton, M., Shields, M. D., Yao, B., Shames, D. S., Kim, H. S., Timmons, B., Sekine, I., ... DeBerardinis, R. J. (2019). Metabolic Diversity in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Molecular Cell*, 76(5), 838-851.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.028>
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., & Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25-naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells

- by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1875-1886. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>
- Chen, W.-J., Ho, C.-C., Chang, Y.-L., Chen, H.-Y., Lin, C.-A., Ling, T.-Y., Yu, S.-L., Yuan, S.-S., Chen, Y.-J. L., Lin, C.-Y., Pan, S.-H., Chou, H.-Y. E., Chen, Y.-J., Chang, G.-C., Chu, W.-C., Lee, Y.-M., Lee, J.-Y., Lee, P.-J., Li, K.-C., ... Yang, P.-C. (2014). Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling. *Nature Communications*, 5, 3472. <https://doi.org/10.1038/ncomms4472>
- Chen, X., Glytsou, C., Zhou, H., Narang, S., Reyna, D. E., Lopez, A., Sakellaropoulos, T., Gong, Y., Kloetgen, A., Yap, Y. S., Wang, E., Gavathiotis, E., Tsirigos, A., Tibes, R., & Aifantis, I. (2019). Targeting mitochondrial structure sensitizes acute myeloid leukemia to Venetoclax treatment. *Cancer discovery*, 9(7), 890-909. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0117>
- Chen, X., Liu, J., Zhang, Q., Liu, B., Cheng, Y., Zhang, Y., Sun, Y., Ge, H., & Liu, Y. (2020). Exosome-mediated transfer of miR-93-5p from cancer-associated fibroblasts confer radioresistance in colorectal cancer cells by downregulating FOXA1 and upregulating TGFβ3. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 39(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1507-2>
- Chen, X., & Song, E. (2019). Turning foes to friends : Targeting cancer-associated fibroblasts. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0004-1>
- Chen, Y., Aon, M. A., Hsu, Y.-T., Soane, L., Teng, X., McCaffery, J. M., Cheng, W.-C., Qi, B., Li, H., Alavian, K. N., Dayhoff-Brannigan, M., Zou, S., Pineda, F. J., O'Rourke, B., Ko, Y. H., Pedersen, P. L., Kaczmarek, L. K., Jonas, E. A., & Hardwick, J. M. (2011). Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential. *Journal of Cell Biology*, 195(2), Article 2. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108059>
- Chen, Z. X., & Pervaiz, S. (2007). Bcl-2 induces pro-oxidant state by engaging mitochondrial respiration in tumor cells. *Cell Death & Differentiation*, 14(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402165>
- Cheng, E., Souza, R. F., & Spechler, S. J. (2012). Tissue remodeling in eosinophilic esophagitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(11), G1175-1187. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00313.2012>
- Cheng, T., Sudderth, J., Yang, C., Mullen, A. R., Jin, E. S., Matés, J. M., & DeBerardinis, R. J. (2011). Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21), 8674-8679. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016627108>
- Cheung, Y.-M. M., Hughes, M., Harrod, J., Files, J., Kirkner, G., Buckley, L., Lin, N. U., Tolaney, S. M., McDonnell, M. E., & Min, L. (2022). The Effects of Diabetes and Glycemic Control on Cancer Outcomes in Individuals With Metastatic Breast Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 107(9), 2511-2521. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac375>
- Chin, H. S., Li, M. X., Tan, I. K. L., Ninnis, R. L., Reljic, B., Scicluna, K., Dagley, L. F., Sandow, J. J., Kelly, G. L., Samson, A. L., Chappaz, S., Khaw, S. L., Chang, C., Morokoff, A., Brinkmann, K., Webb, A., Hockings, C., Hall, C. M., Kueh, A. J., ... Dewson, G. (2018). VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development. *Nature Communications*, 9(1), 4976. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07309-4>
- Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I., & Guild, B. C. (1995). Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*, 374(6524), 733-736. <https://doi.org/10.1038/374733a0>
- Choi, J., Kim, D. H., Jung, W. H., & Koo, J. S. (2013). Metabolic interaction between cancer cells and stromal cells according to breast cancer molecular subtype. *Breast Cancer Research : BCR*, 15(5), Article 5. <https://doi.org/10.1186/bcr3472>
- Choi, J., Kim, E.-S., & Koo, J. S. (2018). Expression of Pentose Phosphate Pathway-Related Proteins in Breast Cancer. *Disease Markers*, 2018, 9369358. <https://doi.org/10.1155/2018/9369358>
- Choi, S. S., Park, I. C., Yun, J. W., Sung, Y. C., Hong, S. I., & Shin, H. S. (1995). A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene*, 11(9), Article 9.
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., & Palucka, A. K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature Immunology*, 1(6), 510-514. <https://doi.org/10.1038/82763>
- Chonghaile, T. N., Gupta, S., John, M., Szegezdi, E., Logue, S. E., & Samali, A. (2015). BCL-2

- modulates the unfolded protein response by enhancing splicing of X-box binding protein-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 466(1), 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.100>
- Christen, S., Lorendeau, D., Schmieder, R., Broekaert, D., Metzger, K., Veys, K., Elia, I., Buescher, J. M., Orth, M. F., Davidson, S. M., Grünewald, T. G. P., De Bock, K., & Fendt, S.-M. (2016). Breast Cancer-Derived Lung Metastases Show Increased Pyruvate Carboxylase-Dependent Anaplerosis. *Cell Reports*, 17(3), 837-848. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.042>
- Chubukov, V., Uhr, M., Le Chat, L., Kleijn, R. J., Jules, M., Link, H., Aymerich, S., Stelling, J., & Sauer, U. (2013). Transcriptional regulation is insufficient to explain substrate-induced flux changes in *Bacillus subtilis*. *Molecular Systems Biology*, 9(1), 709. <https://doi.org/10.1038/msb.2013.66>
- Chun, K.-S., Kim, D.-H., & Surh, Y.-J. (2021). Role of Reductive versus Oxidative Stress in Tumor Progression and Anticancer Drug Resistance. *Cells*, 10(4), 758. <https://doi.org/10.3390/cells10040758>
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.-G., Kipps, T. J., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13944-13949. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506654102>
- Cirri, P., & Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: The dark side of the coin. *American Journal of Cancer Research*, 1(4), 482-497.
- Coates, A. S., Winer, E. P., Goldhirsch, A., Gelber, R. D., Gnant, M., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H.-J., André, F., Baselga, J., Bergh, J., Bonnefoi, H., Burstein, H., Cardoso, F., Castiglione-Gertsch, M., Coates, A. S., Colleoni, M., Curigliano, G., Davidson, N. E., ... Xu, B. (2015). Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of Oncology*, 26(8), 1533-1546. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv221>
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L. C., Perales-Clemente, E., Salviati, L., Fernandez-Silva, P., Enriquez, J. A., & Scorrano, L. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*, 155(1), 160-171. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.032>
- Colegio, O. R., Chu, N.-Q., Szabo, A. L., Chu, T., Rhebergen, A. M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C. E., Eisenbarth, S. C., Phillips, G. M., Cline, G. W., Phillips, A. J., & Medzhitov, R. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*, 513(7519), Article 7519. <https://doi.org/10.1038/nature13490>
- Colell, A., Ricci, J.-E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N. J., Li, C. W., Mari, B., Barbry, P., Newmeyer, D. D., Beere, H. M., & Green, D. R. (2007). GAPDH and Autophagy Preserve Survival after Apoptotic Cytochrome c Release in the Absence of Caspase Activation. *Cell*, 129(5), 983-997. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.045>
- Coloff, J. L., Macintyre, A. N., Nichols, A. G., Liu, T., Gallo, C. A., Plas, D. R., & Rathmell, J. C. (2011a). Akt-dependent glucose metabolism promotes Mcl-1 synthesis to maintain cell survival and resistance to Bcl-2 inhibition. *Cancer Research*, 71(15), Article 15. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4531>
- Coloff, J. L., Macintyre, A. N., Nichols, A. G., Liu, T., Gallo, C. A., Plas, D. R., & Rathmell, J. C. (2011b). Akt-Dependent Glucose Metabolism Promotes Mcl-1 Synthesis to Maintain Cell Survival and Resistance to Bcl-2 Inhibition. *Cancer Research*, 71(15), 5204-5213. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4531>
- Coloff, J. L., Mason, E. F., Altman, B. J., Gerriets, V. A., Liu, T., Nichols, A. N., Zhao, Y., Wofford, J. A., Jacobs, S. R., Ilkayeva, O., Garrison, S. P., Zambetti, G. P., & Rathmell, J. C. (2011). Akt Requires Glucose Metabolism to Suppress Puma Expression and Prevent Apoptosis of Leukemic T Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5921-5933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.179101>
- Comito, G., Iscaro, A., Bacci, M., Morandi, A., Ippolito, L., Parri, M., Montagnani, I., Raspollini, M. R., Serni, S., Simeoni, L., Giannoni, E., & Chiarugi, P. (2019). Lactate modulates CD4+ T-cell polarization and induces an immunosuppressive environment, which sustains prostate carcinoma progression via TLR8/miR21 axis. *Oncogene*, 38(19), Article

19. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0688-7>
- Corbet, C., Bastien, E., Draoui, N., Doix, B., Mignon, L., Jordan, B. F., Marchand, A., Vanherck, J.-C., Chaltin, P., Schakman, O., Becker, H. M., Riant, O., & Feron, O. (2018). Interruption of lactate uptake by inhibiting mitochondrial pyruvate transport unravels direct antitumor and radiosensitizing effects. *Nature Communications*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03525-0>
- Corbet, C., & Feron, O. (2017a). Cancer cell metabolism and mitochondria: Nutrient plasticity for TCA cycle fueling. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, *1868*(1), 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.01.002>
- Corbet, C., & Feron, O. (2017b). Emerging roles of lipid metabolism in cancer progression. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *20*(4), 254-260. <https://doi.org/10.1097/MCO.00000000000000381>
- Corchado-Cobos, R., García-Sancha, N., Mendiburu-Eliçabe, M., Gómez-Vecino, A., Jiménez-Navas, A., Pérez-Baena, M. J., Holgado-Madruga, M., Mao, J.-H., Cañueto, J., Castillo-Lluva, S., & Pérez-Losada, J. (2022). Pathophysiological Integration of Metabolic Reprogramming in Breast Cancer. *Cancers*, *14*(2), 322. <https://doi.org/10.3390/cancers14020322>
- Corcoran, R. B., Cheng, K. A., Hata, A. N., Faber, A. C., Ebi, H., Coffee, E. M., Greninger, P., Brown, R. D., Godfrey, J. T., Cohoon, T. J., Song, Y., Lifshits, E., Hung, K. E., Shioda, T., Dias-Santagata, D., Singh, A., Settleman, J., Benes, C. H., Mino-Kenudson, M., ... Engelman, J. A. (2013). Synthetic lethal interaction of combined BCL-XL and MEK inhibition promotes tumor regressions in KRAS mutant cancer models. *Cancer Cell*, *23*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.007>
- Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews. Cancer*, *2*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrc883>
- Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C., Bonneau, C., Kondratova, M., Kuperstein, I., Zinovyev, A., Givel, A.-M., Parrini, M.-C., Soumelis, V., Vincent-Salomon, A., & Mechta-Grigoriou, F. (2018). Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell*, *33*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.011>
- Costa, A., Scholer-Dahirel, A., & Mechta-Grigoriou, F. (2014). The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*, *25*, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2013.12.007>
- Costea, D. E., Hills, A., Osman, A. H., Thurlow, J., Kalna, G., Huang, X., Pena Murillo, C., Parajuli, H., Suliman, S., Kulasekara, K. K., Johannessen, A. C., & Partridge, M. (2013). Identification of two distinct carcinoma-associated fibroblast subtypes with differential tumor-promoting abilities in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, *73*(13), 3888-3901. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4150>
- Cotte, A. K., Aires, V., Fredon, M., Limagne, E., Derangère, V., Thibaudin, M., Humblin, E., Scagliarini, A., de Barros, J.-P. P., Hillon, P., Ghiringhelli, F., & Delmas, D. (2018). Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-mediated lipid droplet production supports colorectal cancer chemoresistance. *Nature Communications*, *9*(1), 322. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02732-5>
- Coughlin, C. M., Johnston, D. S., Strahs, A., Burczynski, M. E., Bacus, S., Hill, J., Feingold, J. M., Zacharchuk, C., & Berkenblit, A. (2010). Approaches and limitations of phosphatidylinositol-3-kinase pathway activation status as a predictive biomarker in the clinical development of targeted therapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, *124*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1108-4>
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B. E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V. H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G. S., Gerber, H. P., Ferrara, N., & Johnson, R. S. (2003). HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, *112*(5), 645-657. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00154-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00154-5)
- Croxton, R., Ma, Y., Song, L., Haura, E. B., & Cress, W. D. (2002). Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene*, *21*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205157>
- Cui, Q., Wang, J.-Q., Assaraf, Y. G., Ren, L., Gupta, P., Wei, L., Ashby, C. R., Yang, D.-H., & Chen, Z.-S. (2018). Modulating ROS to overcome

- multidrug resistance in cancer. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 41, 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.11.001>
- Cui, Y., Hameed, F. M., Yang, B., Lee, K., Pan, C. Q., Park, S., & Sheetz, M. (2015). Cyclic stretching of soft substrates induces spreading and growth. *Nature Communications*, 6, 6333. <https://doi.org/10.1038/ncomms7333>
- Curioni, A., Britschgi, C., Hiltbrunner, S., Bankel, L., Gulati, P., Weder, W., Opitz, I., Lauk, O., Caviezel, C., Knuth, A., Münz, C., Renner, C., Stahel, R. A., & Petrausch, U. (2019). 1226P - A phase I clinical trial of malignant pleural mesothelioma treated with locally delivered autologous anti-FAP-targeted CAR T-cells. *Annals of Oncology*, 30, v501. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz253.052>
- Curtis, M., Kenny, H. A., Ashcroft, B., Mukherjee, A., Johnson, A., Zhang, Y., Helou, Y., Batlle, R., Liu, X., Gutierrez, N., Gao, X., Yamada, S. D., Lastra, R., Montag, A., Ahsan, N., Locasale, J. W., Salomon, A. R., Nebreda, A. R., & Lengyel, E. (2019). Fibroblasts Mobilize Tumor Cell Glycogen to Promote Proliferation and Metastasis. *Cell Metabolism*, 29(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.007>
- Cuyàs, E., Buxó, M., Ferri Iglesias, M. J., Verdura, S., Pernas, S., Dorca, J., Álvarez, I., Martínez, S., Pérez-García, J. M., Batista-López, N., Rodríguez-Sánchez, C. A., Amillano, K., Domínguez, S., Luque, M., Morilla, I., Stradella, A., Viñas, G., Cortés, J., Joven, J., ... Menendez, J. A. (2019). The C Allele of ATM rs11212617 Associates With Higher Pathological Complete Remission Rate in Breast Cancer Patients Treated With Neoadjuvant Metformin. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00193>
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family : Implications for physiology and therapy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
- D'Aguanno, S., & Del Bufalo, D. (2020). Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies : Current Overview in Cancer. *Cells*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/cells9051287>
- Danial, N. N., Gramm, C. F., Scorrano, L., Zhang, C.-Y., Krauss, S., Ranger, A. M., Datta, S. R., Greenberg, M. E., Licklider, L. J., Lowell, B. B., Gygi, S. P., & Korsmeyer, S. J. (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*, 424(6951), 952-956. <https://doi.org/10.1038/nature01825>
- Daniels, V. W., Zoeller, J. J., van Gastel, N., McQueeney, K. E., Parvin, S., Potter, D. S., Fell, G. G., Ferreira, V. G., Yilma, B., Gupta, R., Spetz, J., Bhola, P. D., Endress, J. E., Harris, I. S., Carrilho, E., Sarosiek, K. A., Scadden, D. T., Brugge, J. S., & Letai, A. (2021). Metabolic perturbations sensitize triple-negative breast cancers to apoptosis induced by BH3 mimetics. *Science Signaling*, 14(686), eabc7405. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abc7405>
- Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 7, 301-311. <https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>
- Davidson, S. M., Papagiannakopoulos, T., Olenchok, B. A., Heyman, J. E., Keibler, M. A., Luengo, A., Bauer, M. R., Jha, A. K., O'Brien, J. P., Pierce, K. A., Gui, D. Y., Sullivan, L. B., Wasylenko, T. M., Subbaraj, L., Chin, C. R., Stephanopoulos, G., Mott, B. T., Jacks, T., Clish, C. B., & Vander Heiden, M. G. (2016). Environment Impacts the Metabolic Dependencies of Ras-Driven Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Metabolism*, 23(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.007>
- Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103(2), 239-252. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00116-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00116-1)
- De, A., & Kuppasamy, G. (2020). Metformin in breast cancer : Preclinical and clinical evidence. *Current Problems in Cancer*, 44(1), 100488. <https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2019.06.003>
- De Clercq, E. (2019). Mozobil® (Plerixafor, AMD3100), 10 years after its approval by the US Food and Drug Administration. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 27, 2040206619829382. <https://doi.org/10.1177/2040206619829382>
- De Francesco, E. M., Lappano, R., Santolla, M. F., Marsico, S., Caruso, A., & Maggiolini, M. (2013). HIF-1 α /GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in

- breast cancer associated fibroblasts (CAFs). *Breast Cancer Research: BCR*, 15(4), R64. <https://doi.org/10.1186/bcr3458>
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5), e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- DeBerardinis, R. J., & Thompson, C. B. (2012). Cellular metabolism and disease: What do metabolic outliers teach us? *Cell*, 148(6), 1132-1144. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.032>
- deCathelineau, A. M., & Henson, P. M. (2003). The final step in programmed cell death: Phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays in Biochemistry*, 39, 105-117. <https://doi.org/10.1042/bse0390105>
- Delbridge, A. R. D., & Strasser, A. (2015). The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*, 22(7), 1071-1080. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.50>
- Delozier, T. (2010). Hormonothérapie du cancer du sein. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 39(8, Supplement), F71-F78. <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2010.10.004>
- DeMichele, A., Yee, D., & Esserman, L. (2017). Mechanisms of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 377(23), 2287-2289. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1711545>
- Deng, X., Kornblau, S. M., Ruvolo, P. P., & May, W. S., Jr. (2000). Regulation of Bcl2 Phosphorylation and Potential Significance for Leukemic Cell Chemoresistance. *JNCI Monographs*, 2000(28), 30-37. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jnci-monographs.a024254>
- DeNicola, G. M., Chen, P.-H., Mullarky, E., Sudderth, J. A., Hu, Z., Wu, D., Tang, H., Xie, Y., Asara, J. M., Huffman, K. E., Wistuba, I. I., Minna, J. D., DeBerardinis, R. J., & Cantley, L. C. (2015). NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nature Genetics*, 47(12), 1475-1481. <https://doi.org/10.1038/ng.3421>
- DeNicola, G. M., Karreth, F. A., Humpton, T. J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K. H., Yeo, C. J., Calhoun, E. S., Scrimieri, F., Winter, J. M., Hruban, R. H., Iacobuzio-Donahue, C., Kern, S. E., Blair, I. A., & Tuveson, D. A. (2011). Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature*, 475(7354), 106-109. <https://doi.org/10.1038/nature10189>
- Denton, D., Nicolson, S., & Kumar, S. (2012). Cell death by autophagy: Facts and apparent artefacts. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 87-95. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.146>
- Denu, R. A., Nemcek, S., Bloom, D. D., Goodrich, A. D., Kim, J., Mosher, D. F., & Hematti, P. (2016). Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. *Acta Haematologica*, 136(2), 85-97. <https://doi.org/10.1159/000445096>
- Denys, H., Derycke, L., Hendrix, A., Westbroek, W., Gheldof, A., Narine, K., Pauwels, P., Gespach, C., Bracke, M., & De Wever, O. (2008). Differential impact of TGF-beta and EGF on fibroblast differentiation and invasion reciprocally promotes colon cancer cell invasion. *Cancer Letters*, 266(2), 263-274. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.068>
- de Pablo, M. A., Susin, S. A., Jacotot, E., Larochette, N., Costantini, P., Ravagnan, L., Zamzami, N., & Kroemer, G. (1999). Palmitate induces apoptosis via a direct effect on mitochondria. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 4(2), 81-87. <https://doi.org/10.1023/a:1009694124241>
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., & Martinou, J. C. (2001). Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Molecular Cell*, 8(3), Article 3.
- Desmoulière, A., Darby, I. A., & Gabbiani, G. (2003). Normal and pathologic soft tissue remodeling: Role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 83(12), 1689-1707. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000101911.53973.90>
- Desmoulière, A., Guyot, C., & Gabbiani, G. (2004). The stroma reaction myofibroblast: A key player in the control of tumor cell behavior. *The International Journal of Developmental Biology*, 48(5-6), Article 5-6. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041802ad>
- Desmoulière, A., Redard, M., Darby, I., & Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American Journal of Pathology*, 146(1), 56-66.

- Dietl, K., Renner, K., Dettmer, K., Timischl, B., Eberhart, K., Dorn, C., Hellerbrand, C., Kastenberger, M., Kunz-Schughart, L. A., Oefner, P. J., Andreesen, R., Gottfried, E., & Kreutz, M. P. (2010). Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *184*(3), 1200-1209. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902584>
- DiNardo, C. D., Pratz, K., Pullarkat, V., Jonas, B. A., Arellano, M., Becker, P. S., Frankfurt, O., Konopleva, M., Wei, A. H., Kantarjian, H. M., Xu, T., Hong, W.-J., Chyla, B., Potluri, J., Pollyea, D. A., & Letai, A. (2019). Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, *133*(1), 7-17. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-868752>
- DiNardo, C. D., Stein, E. M., de Botton, S., Roboz, G. J., Altman, J. K., Mims, A. S., Swords, R., Collins, R. H., Mannis, G. N., Pollyea, D. A., Donnellan, W., Fathi, A. T., Pigneux, A., Erba, H. P., Prince, G. T., Stein, A. S., Uy, G. L., Foran, J. M., Traer, E., ... Kantarjian, H. M. (2018). Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML. *New England Journal of Medicine*, *378*(25), 2386-2398. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716984>
- Ding, Q., He, X., Xia, W., Hsu, J.-M., Chen, C.-T., Li, L.-Y., Lee, D.-F., Yang, J.-Y., Xie, X., Liu, J.-C., & Hung, M.-C. (2007). Myeloid cell leukemia-1 inversely correlates with glycogen synthase kinase-3beta activity and associates with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Research*, *67*(10), 4564-4571. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1788>
- Ding, Y., Liu, Z., Desai, S., Zhao, Y., Liu, H., Pannell, L. K., Yi, H., Wright, E. R., Owen, L. B., Dean-Colomb, W., Fodstad, O., Lu, J., LeDoux, S. P., Wilson, G. L., & Tan, M. (2012). Receptor Tyrosine Kinase ErbB2 Translocates into Mitochondria and Regulates Cellular Metabolism. *Nature communications*, *3*, 1271. <https://doi.org/10.1038/ncomms2236>
- Doedens, A. L., Phan, A. T., Stradner, M. H., Fujimoto, J. K., Nguyen, J. V., Yang, E., Johnson, R. S., & Goldrath, A. W. (2013). Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nature Immunology*, *14*(11), 1173-1182. <https://doi.org/10.1038/ni.2714>
- Dogan, E., Kara, H. G., Kosova, B., & Cetintas, V. B. (2022). Targeting Apoptosis to Overcome Chemotherapy Resistance. In C. M. Sergi (Éd.), *Metastasis*. Exon Publications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK580869/>
- Doherty, J. R., & Cleveland, J. L. (2013). Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1172/JCI69741>
- Domina, A. M., Vrana, J. A., Gregory, M. A., Hann, S. R., & Craig, R. W. (2004). MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene*, *23*(31), Article 31. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207692>
- Donatelli, S. S., Zhou, J.-M., Gilvary, D. L., Eksioğlu, E. A., Chen, X., Cress, W. D., Haura, E. B., Schabath, M. B., Coppola, D., Wei, S., & Djeu, J. Y. (2014). TGF- β -inducible microRNA-183 silences tumor-associated natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(11), 4203-4208. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319269111>
- Donati, S., Sander, T., & Link, H. (2018). Crosstalk between transcription and metabolism: How much enzyme is enough for a cell? *WIREs Systems Biology and Medicine*, *10*(1), e1396. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1396>
- Dong, L., Jiang, C. C., Thorne, R. F., Croft, A., Yang, F., Liu, H., de Bock, C. E., Hersey, P., & Zhang, X. D. (2011). Ets-1 mediates upregulation of Mcl-1 downstream of XBP-1 in human melanoma cells upon ER stress. *Oncogene*, *30*(34), 3716-3726. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.87>
- Dragic, H., Chaveroux, C., Cosset, É., & Manié, S. (2022). Modeling cancer metabolism in vitro: Current improvements and future challenges. *The FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.16704>
- Duluc, C., Moatassim-Billah, S., Chalabi-Dchar, M., Perraud, A., Samain, R., Breibach, F., Gayral, M., Cordelier, P., Delisle, M.-B., Bousquet-Dubouch, M.-P., Tomasini, R., Schmid, H., Mathonnet, M., Pyronnet, S., Martineau, Y., & Bousquet, C. (2015). Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO Molecular Medicine*, *7*(6), Article 6. <https://doi.org/10.15252/emmm.20140434>

- Duperret, E. K., Trautz, A., Ammons, D., Perales-Puchalt, A., Wise, M. C., Yan, J., Reed, C., & Weiner, D. B. (2018). Alteration of the tumor stroma using a consensus DNA vaccine targeting Fibroblast Activation Protein (FAP) synergizes with anti-tumor vaccine therapy in mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24(5), 1190-1201. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2033>
- Dupuy, F., Tabariès, S., Andrzejewski, S., Dong, Z., Blagih, J., Annis, M. G., Omeroglu, A., Gao, D., Leung, S., Amir, E., Clemons, M., Aguilar-Mahecha, A., Basik, M., Vincent, E. E., St-Pierre, J., Jones, R. G., & Siegel, P. M. (2015). PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metabolism*, 22(4), 577-589. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.007>
- Durning, P., Schor, S. L., & Sellwood, R. A. (1984). Fibroblasts from patients with breast cancer show abnormal migratory behaviour in vitro. *Lancet (London, England)*, 2(8408), 890-892. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)90653-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)90653-6)
- Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., Vander Heiden, M. G., MacKeigan, J. P., Finan, P. M., Clish, C. B., Murphy, L. O., & Manning, B. D. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular Cell*, 39(2), 171-183. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022>
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors : Wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England Journal of Medicine*, 315(26), 1650-1659. <https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606>
- Dybdal, N., Leiberman, G., Anderson, S., McCune, B., Bajamonde, A., Cohen, R. L., Mass, R. D., Sanders, C., & Press, M. F. (2005). Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Research and Treatment*, 93(1), 3-11. <https://doi.org/10.1007/s10549-004-6275-8>
- Ebbing, E. A., van der Zalm, A. P., Steins, A., Creemers, A., Hermsen, S., Rentenaar, R., Klein, M., Waasdorp, C., Hooijer, G. K. J., Meijer, S. L., Krishnadath, K. K., Punt, C. J. A., van Berge Henegouwen, M. I., Gisbertz, S. S., van Delden, O. M., Hulshof, M. C. C. M., Medema, J. P., van Laarhoven, H. W. M., & Bijlsma, M. F. (2019). Stromal-derived interleukin 6 drives epithelial-to-mesenchymal transition and therapy resistance in esophageal adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(6), 2237-2242. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820459116>
- Echeverry, N., Bachmann, D., Ke, F., Strasser, A., Simon, H. U., & Kaufmann, T. (2013). Intracellular localization of the BCL-2 family member BOK and functional implications. *Cell Death and Differentiation*, 20(6), 785-799. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.10>
- Edinger, A. L., & Thompson, C. B. (2004). Death by design : Apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 663-669. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>
- Egle, A., Harris, A. W., Bath, M. L., O'Reilly, L., & Cory, S. (2004). VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood*, 103(6), 2276-2283. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2469>
- Einsele-Scholz, S., Malmshemer, S., Bertram, K., Stehle, D., Johanning, J., Manz, M., Daniel, P. T., Gillissen, B. F., Schulze-Osthoff, K., & Essmann, F. (2016). Bok is a genuine multi-BH-domain protein that triggers apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Journal of Cell Science*, 129(11), 2213-2223. <https://doi.org/10.1242/jcs.181727>
- Eischen, C. M., Roussel, M. F., Korsmeyer, S. J., & Cleveland, J. L. (2001). Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 21(22), 7653-7662. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.22.7653-7662.2001>
- El-Botty, R., Morriset, L., Montaudon, E., Tariq, Z., Schnitzler, A., Bacci, M., Lorito, N., Sourd, L., Huguet, L., Dahmani, A., Painsec, P., Derrien, H., Vacher, S., Masliah-Planchon, J., Raynal, V., Baulande, S., Larcher, T., Vincent-Salomon, A., Dutertre, G., ... Marangoni, E. (2023). Oxidative phosphorylation is a metabolic vulnerability of endocrine therapy

- and palbociclib resistant metastatic breast cancers. *Nature Communications*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40022-5>
- Elgendy, M., Cirò, M., Hosseini, A., Weiszmann, J., Mazzarella, L., Ferrari, E., Cazzoli, R., Curigliano, G., DeCensi, A., Bonanni, B., Budillon, A., Pelicci, P. G., Janssens, V., Ogris, M., Baccarini, M., Lanfrancone, L., Weckwerth, W., Foiani, M., & Minucci, S. (2019). Combination of Hypoglycemia and Metformin Impairs Tumor Metabolic Plasticity and Growth by Modulating the PP2A-GSK3 β -MCL-1 Axis. *Cancer Cell*, 35(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.03.007>
- Elgendy, M., Sheridan, C., Brumatti, G., & Martin, S. J. (2011). Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Molecular Cell*, 42(1), 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.009>
- Elia, I., Broekaert, D., Christen, S., Boon, R., Radaelli, E., Orth, M. F., Verfaillie, C., Grünewald, T. G. P., & Fendt, S.-M. (2017). Proline metabolism supports metastasis formation and could be inhibited to selectively target metastasizing cancer cells. *Nature Communications*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms15267>
- Elia, I., & Haigis, M. C. (2021). Metabolites and the tumour microenvironment: From cellular mechanisms to systemic metabolism. *Nature Metabolism*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-00317-z>
- Elia, I., Rossi, M., Stegen, S., Broekaert, D., Doglioni, G., van Gorsel, M., Boon, R., Escalona-Noguero, C., Torrekens, S., Verfaillie, C., Verbeken, E., Carmeliet, G., & Fendt, S.-M. (2019). Breast cancer cells rely on environmental pyruvate to shape the metastatic niche. *Nature*, 568(7750), 117-121. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0977-x>
- Elliott, J. I., Surprenant, A., Marelli-Berg, F. M., Cooper, J. C., Cassady-Cain, R. L., Wooding, C., Linton, K., Alexander, D. R., & Higgins, C. F. (2005). Membrane phosphatidylserine distribution as a non-apoptotic signalling mechanism in lymphocytes. *Nature Cell Biology*, 7(8), 808-816. <https://doi.org/10.1038/ncb1279>
- Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44(6), 817-829. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90004-8)
- Ellis, P. A., Smith, I. E., Detre, S., Burton, S. A., Salter, J., A'Hern, R., Walsh, G., Johnston, S. R., & Dowsett, M. (1998). Reduced apoptosis and proliferation and increased Bcl-2 in residual breast cancer following preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment*, 48(2), 107-116. <https://doi.org/10.1023/a:1005933815809>
- Emwas, A.-H., Szczepski, K., Al-Younis, I., Lachowicz, J. I., & Jaremko, M. (2022). Fluxomics—New Metabolomics Approaches to Monitor Metabolic Pathways. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.805782>
- Eom, Y. H., Kim, H. S., Lee, A., Song, B. J., & Chae, B. J. (2016). BCL2 as a Subtype-Specific Prognostic Marker for Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer*, 19(3), 252-260. <https://doi.org/10.4048/jbc.2016.19.3.252>
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S. T., & Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*, 17(2), 135-147. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.041>
- Erickson, K., Patterson, R. E., Flatt, S. W., Natarajan, L., Parker, B. A., Heath, D. D., Laughlin, G. A., Saquib, N., Rock, C. L., & Pierce, J. P. (2011). Clinically defined type 2 diabetes mellitus and prognosis in early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(1), 54-60. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.29.3183>
- Erlich, S., Mizrachy, L., Segev, O., Lindenboim, L., Zmira, O., Adi-Harel, S., Hirsch, J. A., Stein, R., & Pinkas-Kramarski, R. (2007). Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy*, 3(6), 561-568. <https://doi.org/10.4161/auto.4713>
- Escudero, S., Zaganjor, E., Lee, S., Mill, C. P., Morgan, A. M., Crawford, E. B., Chen, J., Wales, T. E., Mourtada, R., Luccarelli, J., Bird, G. H., Steidl, U., Engen, J. R., Haigis, M. C., Opferman, J. T., & Walensky, L. D. (2018). Dynamic Regulation of Long-Chain Fatty Acid Oxidation by a Noncanonical Interaction between the MCL-1 BH3 Helix and VLCAD. *Molecular Cell*, 69(5), 729-743.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.005>
- Evrard, A., Cuq, P., Ciccolini, J., Vian, L., & Cano, J.-P. (1999). Increased cytotoxicity and bystander

- effect of 5-fluorouracil and 5'-deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transfected with thymidine phosphorylase. *British Journal of Cancer*, *80*(11), 1726-1733. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690589>
- Fadeel, B., Gleiss, B., Högstrand, K., Chandra, J., Wiedmer, T., Sims, P. J., Henter, J.-I., Orrenius, S., & Samali, A. (1999). Phosphatidylserine Exposure during Apoptosis Is a Cell-Type-Specific Event and Does Not Correlate with Plasma Membrane Phospholipid Scramblase Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *266*(2), 504-511. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1820>
- Fang, Q., Chen, X., & Zhi, X. (2016). Long Non-Coding RNA (LncRNA) Urothelial Carcinoma Associated 1 (UCA1) Increases Multi-Drug Resistance of Gastric Cancer via Downregulating miR-27b. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *22*, 3506-3513. <https://doi.org/10.12659/msm.900688>
- Farmer, P., Bonnefoi, H., Anderle, P., Cameron, D., Wirapati, P., Becette, V., André, S., Piccart, M., Campone, M., Brain, E., Macgrogan, G., Petit, T., Jassem, J., Bibeau, F., Blot, E., Bogaerts, J., Aguet, M., Bergh, J., Iggo, R., & Delorenzi, M. (2009). A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nature Medicine*, *15*(1), 68-74. <https://doi.org/10.1038/nm.1908>
- Federici, C., Petrucci, F., Caimi, S., Cesolini, A., Logozzi, M., Borghi, M., D'Illo, S., Lugini, L., Violante, N., Azzarito, T., Majorani, C., Brambilla, D., & Fais, S. (2014). Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin. *PloS One*, *9*(2), e88193. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088193>
- Feig, C., Jones, J. O., Kraman, M., Wells, R. J. B., Deonarine, A., Chan, D. S., Connell, C. M., Roberts, E. W., Zhao, Q., Caballero, O. L., Teichmann, S. A., Janowitz, T., Jodrell, D. I., Tuveson, D. A., & Fearon, D. T. (2013). Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(50), 20212-20217. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320318110>
- Feng, W., Gentles, A., Nair, R. V., Huang, M., Lin, Y., Lee, C. Y., Cai, S., Scheeren, F. A., Kuo, A. H., & Diehn, M. (2014). Targeting unique metabolic properties of breast tumor initiating cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *32*(7), 1734-1745. <https://doi.org/10.1002/stem.1662>
- Ferrarini, I., Louie, A., Zhou, L., & El-Deiry, W. S. (2021). ONC212 is a Novel Mitocan Acting Synergistically with Glycolysis Inhibition in Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, *20*(9), 1572-1583. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0962>
- Ferrer, C. M., Lynch, T. P., Sodi, V. L., Falcone, J. N., Schwab, L. P., Peacock, D. L., Vocadlo, D. J., Seagroves, T. N., & Reginato, M. J. (2014). O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Molecular Cell*, *54*(5), 820-831. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.026>
- Fiaschi, T., Marini, A., Giannoni, E., Taddei, M. L., Gandellini, P., De Donatis, A., Lanciotti, M., Serni, S., Cirri, P., & Chiarugi, P. (2012). Reciprocal Metabolic Reprogramming through Lactate Shuttle Coordinately Influences Tumor-Stroma Interplay. *Cancer Research*, *72*(19), Article 19. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1949>
- Filipits, M., Rudas, M., Jakesz, R., Dubsy, P., Fitzal, F., Singer, C. F., Dietze, O., Greil, R., Jelen, A., Sevelde, P., Freibauer, C., Müller, V., Jänicke, F., Schmidt, M., Kölbl, H., Rody, A., Kaufmann, M., Schroth, W., Brauch, H., ... EP Investigators. (2011). A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(18), 6012-6020. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0926>
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, *73*(4), 1907-1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>
- Finkel, T. (2012). From sulfenylation to sulfhydration: What a thiolate needs to tolerate. *Science Signaling*, *5*(215), pe10. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002943>

- Finley, L. W. S. (2023a). What is cancer metabolism? *Cell*, 186(8), 1670-1688. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.01.038>
- Finley, L. W. S. (2023b). What is cancer metabolism? *Cell*, 186(8), Article 8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.01.038>
- Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., Renner, K., Timischl, B., Mackensen, A., Kunz-Schughart, L., Andreesen, R., Krause, S. W., & Kreutz, M. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 109(9), 3812-3819. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-035972>
- Foight, G. W., Ryan, J. A., Gullá, S. V., Letai, A., & Keating, A. E. (2014). Designed BH3 Peptides with High Affinity and Specificity for Targeting Mcl-1 in Cells. *ACS Chemical Biology*, 9(9), 1962-1968. <https://doi.org/10.1021/cb500340w>
- Fordyce, C. A., Patten, K. T., Fessenden, T. B., DeFilippis, R., Hwang, E. S., Zhao, J., & Tlsty, T. D. (2012). Cell-extrinsic consequences of epithelial stress: Activation of protumorigenic tissue phenotypes. *Breast Cancer Research: BCR*, 14(6), R155. <https://doi.org/10.1186/bcr3368>
- Foster, C. T., Gualdrini, F., & Treisman, R. (2017). Mutual dependence of the MRTF-SRF and YAP-TEAD pathways in cancer-associated fibroblasts is indirect and mediated by cytoskeletal dynamics. *Genes & Development*, 31(23-24), 2361-2375. <https://doi.org/10.1101/gad.304501.117>
- Freemerman, A. J., Johnson, A. R., Sacks, G. N., Milner, J. J., Kirk, E. L., Troester, M. A., Macintyre, A. N., Goraksha-Hicks, P., Rathmell, J. C., & Makowski, L. (2014). Metabolic Reprogramming of Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(11), 7884-7896. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.522037>
- Frenzel, A., Labi, V., Chmielewskij, W., Ploner, C., Geley, S., Fiegl, H., Tzankov, A., & Villunger, A. (2010). Suppression of B-cell lymphomagenesis by the BH3-only proteins Bmf and Bad. *Blood*, 115(5), 995-1005. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-212670>
- Friedman, G., Levi-Galibov, O., David, E., Bornstein, C., Giladi, A., Dadiani, M., Mayo, A., Halperin, C., Pevsner-Fischer, M., Lavon, H., Mayer, S., Nevo, R., Stein, Y., Balint-Lahat, N., Barshack, I., Ali, H. R., Caldas, C., Nili-Gal-Yam, E., Alon, U., ... Scherz-Shouval, R. (2020). Cancer-associated fibroblast compositions change with breast cancer progression linking the ratio of S100A4+ and PDPN+ CAFs to clinical outcome. *Nature Cancer*, 1(7), 692-708. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-0082-y>
- Fritz, V., & Fajas, L. (2010). Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells. *Oncogene*, 29(31), 4369-4377. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.182>
- Froeling, F. E. M., Feig, C., Chelala, C., Dobson, R., Mein, C. E., Tuveson, D. A., Clevers, H., Hart, I. R., & Kocher, H. M. (2011). Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt- β -catenin signaling to slow tumor progression. *Gastroenterology*, 141(4), 1486-1497, 1497.e1-14. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.047>
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E. C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R. K., & Seed, B. (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell*, 94(6), 715-725. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81731-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81731-6)
- Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of Pathology*, 200(4), 500-503. <https://doi.org/10.1002/path.1427>
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J. F., Harrington, K., & Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nature Cell Biology*, 9(12), 1392-1400. <https://doi.org/10.1038/ncb1658>
- Galbo, P. M., Zang, X., & Zheng, D. (2021). Molecular Features of Cancer-associated Fibroblast Subtypes and their Implication on Cancer Pathogenesis, Prognosis, and Immunotherapy Resistance. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 27(9), 2636-2647. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4226>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death &*

- Differentiation*, 25(3), 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gómez-Pozo, A., Berges-Soria, J., Arevalillo, J. M., Nanni, P., López-Vacas, R., Navarro, H., Grossmann, J., Castaneda, C. A., Main, P., Díaz-Almirón, M., Espinosa, E., Ciruelos, E., & Fresno Vara, J. Á. (2015). Combined Label-Free Quantitative Proteomics and microRNA Expression Analysis of Breast Cancer Unravel Molecular Differences with Clinical Implications. *Cancer Research*, 75(11), 2243-2253. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1937>
- Gandhi, L., Camidge, D. R., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P., Gandara, D., Khaira, D., Hann, C. L., McKeegan, E. M., Litvinovich, E., Hemken, P. M., Dive, C., Enschede, S. H., Nolan, C., Chiu, Y.-L., Busman, T., Xiong, H., Krivoshik, A. P., Humerickhouse, R., Shapiro, G. I., & Rudin, C. M. (2011). Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(7), Article 7. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.6208>
- Gao, J., Guo, Z., Cheng, J., Sun, B., Yang, J., Li, H., Wu, S., Dong, F., & Yan, X. (2020). Differential metabolic responses in breast cancer cell lines to acidosis and lactic acidosis revealed by stable isotope assisted metabolomics. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78955-2>
- Gao, R., Buechel, D., Kalathur, R. K. R., Morini, M. F., Coto-Llerena, M., Ercan, C., Piscuoglio, S., Chen, Q., Blumer, T., Wang, X., Dazert, E., Heim, M. H., Hall, M. N., Tang, F., & Christofori, G. (2021). USP29-mediated HIF1 α stabilization is associated with Sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by upregulating glycolysis. *Oncogenesis*, 10(7), 52. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00338-7>
- Garama, D. J., Harris, T. J., White, C. L., Rossello, F. J., Abdul-Hay, M., Gough, D. J., & Levy, D. E. (2015). A Synthetic Lethal Interaction between Glutathione Synthesis and Mitochondrial Reactive Oxygen Species Provides a Tumor-Specific Vulnerability Dependent on STAT3. *Molecular and Cellular Biology*, 35(21), 3646-3656. <https://doi.org/10.1128/MCB.00541-15>
- Garcia-Cao, I., Song, M. S., Hobbs, R. M., Laurent, G., Giorgi, C., de Boer, V. C. J., Anastasiou, D., Ito, K., Sasaki, A. T., Rameh, L., Carracedo, A., Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., Pinton, P., Haigis, M. C., & Pandolfi, P. P. (2012). Systemic Elevation of PTEN Induces a Tumor-Suppressive Metabolic State. *Cell*, 149(1), 49-62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.030>
- Garrison, S. P., Jeffers, J. R., Yang, C., Nilsson, J. A., Hall, M. A., Rehg, J. E., Yue, W., Yu, J., Zhang, L., Onciu, M., Sample, J. T., Cleveland, J. L., & Zambetti, G. P. (2008). Selection against PUMA gene expression in Myc-driven B-cell lymphomagenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 28(17), 5391-5402. <https://doi.org/10.1128/MCB.00907-07>
- Gee, J. M., Robertson, J. F., Ellis, I. O., Willsher, P., McClelland, R. A., Hoyle, H. B., Kyme, S. R., Finlay, P., Blamey, R. W., & Nicholson, R. I. (1994). Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *International Journal of Cancer*, 59(5), Article 5.
- Geiger, R., Rieckmann, J. C., Wolf, T., Basso, C., Feng, Y., Fuhrer, T., Kogadeeva, M., Picotti, P., Meissner, F., Mann, M., Zamboni, N., Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (2016). L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell*, 167(3), 829-842.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.031>
- Gelsomino, G., Corsetto, P. A., Campia, I., Montorfano, G., Kopecka, J., Castella, B., Gazzano, E., Ghigo, D., Rizzo, A. M., & Riganti, C. (2013). Omega 3 fatty acids chemosensitize multidrug resistant colon cancer cells by down-regulating cholesterol synthesis and altering detergent resistant membranes composition. *Molecular Cancer*, 12, 137. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-137>
- Gentric, G., Kieffer, Y., Mieulet, V., Goundiam, O., Bonneau, C., Nemati, F., Hurbain, I., Raposo, G., Popova, T., Stern, M.-H., Lallemand-Breitenbach, V., Müller, S., Cañeque, T., Rodriguez, R., Vincent-Salomon, A., de Thé, H., Rossignol, R., & Mechta-Grigoriou, F. (2019). PML-Regulated Mitochondrial Metabolism Enhances Chemosensitivity in Human Ovarian Cancers. *Cell Metabolism*, 29(1), 156-173.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.002>

- Gentric, G., Mieulet, V., & Mechta-Grigoriou, F. (2017). Heterogeneity in Cancer Metabolism : New Concepts in an Old Field. *Antioxidants & Redox Signaling*, 26(9), Article 9. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6750>
- Germain, M., Nguyen, A. P., Le Grand, J. N., Arbour, N., Vanderluit, J. L., Park, D. S., Opferman, J. T., & Slack, R. S. (2011). MCL-1 is a stress sensor that regulates autophagy in a developmentally regulated manner. *The EMBO Journal*, 30(2), 395-407. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.327>
- Gerosa, L., Haverkorn van Rijsewijk, B. R. B., Christodoulou, D., Kochanowski, K., Schmidt, T. S. B., Noor, E., & Sauer, U. (2015). Pseudo-transition Analysis Identifies the Key Regulators of Dynamic Metabolic Adaptations from Steady-State Data. *Cell Systems*, 1(4), 270-282. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.09.008>
- Ghafouri-Fard, S., & Taheri, M. (2019). UCA1 long non-coding RNA : An update on its roles in malignant behavior of cancers. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 120, 109459. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109459>
- Gherguson, J. M., Lang, J. D., Levin, M. K., Briones, N., Facista, S. J., Mueller, C., Cowan, A. J., McBride, M. J., Rodriguez, E. S. R., Killian, A., Dao, T., Lamont, J., Barron, A., Su, X., Hendricks, W. P. D., Espina, V., Von Hoff, D. D., O'Shaughnessy, J., & Rabinowitz, J. D. (2021). Local production of lactate, ribose phosphate, and amino acids within human triple-negative breast cancer. *Med (New York, N.Y.)*, 2(6), 736-754. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.03.009>
- Giacomini, I., Ragazzi, E., Pasut, G., & Montopoli, M. (2020). The Pentose Phosphate Pathway and Its Involvement in Cisplatin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 937. <https://doi.org/10.3390/ijms21030937>
- Gibson, L., Holmgreen, S. P., Huang, D. C., Bernard, O., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Sutherland, G. R., Baker, E., Adams, J. M., & Cory, S. (1996). Bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene*, 13(4), Article 4.
- Giddings, E. L., Champagne, D. P., Wu, M.-H., Laffin, J. M., Thornton, T. M., Valenca-Pereira, F., Culp-Hill, R., Fortner, K. A., Romero, N., East, J., Cao, P., Arias-Pulido, H., Sidhu, K. S., Silverstrim, B., Kam, Y., Kelley, S., Pereira, M., Bates, S. E., Bunn, J. Y., ... Rincon, M. (2021). Mitochondrial ATP fuels ABC transporter-mediated drug efflux in cancer chemoresistance. *Nature Communications*, 12(1), 2804. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23071-6>
- Gill, P. G., Farshid, G., Luke, C. G., & Roder, D. M. (2004). Detection by screening mammography is a powerful independent predictor of survival in women diagnosed with breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 13(1), 15-22. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(03\)00169-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(03)00169-3)
- Giordano, A., Calvani, M., Petillo, O., Grippo, P., Tuccillo, F., Melone, M. a. B., Bonelli, P., Calarco, A., & Peluso, G. (2005). tBid induces alterations of mitochondrial fatty acid oxidation flux by malonyl-CoA-independent inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1. *Cell Death and Differentiation*, 12(6), 603-613. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401636>
- Givel, A.-M., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Sirven, P., Cardon, M., Pelon, F., Magagna, I., Gentric, G., Costa, A., Bonneau, C., Mieulet, V., Vincent-Salomon, A., & Mechta-Grigoriou, F. (2018). miR200-regulated CXCL12 β promotes fibroblast heterogeneity and immunosuppression in ovarian cancers. *Nature Communications*, 9(1), 1056. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03348-z>
- Godet, I., & Gilkes, D. M. (2017). BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, 4(1). <https://doi.org/10.15761/ICST.1000228>
- Goetze, K., Walenta, S., Ksiazkiewicz, M., Kunz-Schughart, L. A., & Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *International Journal of Oncology*, 39(2), 453-463. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1055>
- Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., Senn, H.-J., Albain, K. S., André, F., Bergh, J., Bonnefoi, H., Bretel-Morales, D., Burstein, H., Cardoso, F., Castiglione-Gertsch, M., Coates, A. S., Colleoni, M., Costa, A., Curigliano, G., ... Wood, W. C. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer : Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer

2013. *Annals of Oncology*, 24(9), 2206-2223. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt303>
- Goldie, J. H. (1983). Drug resistance and cancer chemotherapy strategy in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 3(2), 129-136. <https://doi.org/10.1007/BF01803555>
- Gonçalves, A. C., Richiardone, E., Jorge, J., Polónia, B., Xavier, C. P. R., Salaroglio, I. C., Riganti, C., Vasconcelos, M. H., Corbet, C., & Sarmento-Ribeiro, A. B. (2021). Impact of cancer metabolism on therapy resistance—Clinical implications. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 59, 100797. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2021.100797>
- Goodwin, C. M., Rossanese, O. W., Olejniczak, E. T., & Fesik, S. W. (2015). Myeloid cell leukemia-1 is an important apoptotic survival factor in triple-negative breast cancer. *Cell Death and Differentiation*, 22(12), 2098-2106. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.73>
- Goodwin, P. J., Chen, B. E., Gelmon, K. A., Whelan, T. J., Ennis, M., Lemieux, J., Ligibel, J. A., Hershman, D. L., Mayer, I. A., Hobday, T. J., Bliss, J. M., Rastogi, P., Rabaglio-Poretti, M., Mukherjee, S. D., Mackey, J. R., Abramson, V. G., Oja, C., Wesolowski, R., Thompson, A. M., ... Parulekar, W. R. (2022). Effect of Metformin vs Placebo on Invasive Disease-Free Survival in Patients With Breast Cancer : The MA.32 Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 327(20), Article 20. <https://doi.org/10.1001/jama.2022.6147>
- Gorodetska, I., Kozeretska, I., & Dubrovska, A. (2019). BRCA Genes : The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *Journal of Cancer*, 10(9), 2109-2127. <https://doi.org/10.7150/jca.30410>
- Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer : Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews. Cancer*, 2(1), 48-58. <https://doi.org/10.1038/nrc706>
- Goulet, C. R., Champagne, A., Bernard, G., Vandal, D., Chabaud, S., Pouliot, F., & Bolduc, S. (2019). Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling. *BMC Cancer*, 19(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5353-6>
- Grasset, E. M., Bertero, T., Bozec, A., Friard, J., Bourget, I., Pisano, S., Lecacheur, M., Maiel, M., Bailleux, C., Emelyanov, A., Ilie, M., Hofman, P., Meneguzzi, G., Durantou, C., Bulavin, D. V., & Gaggioli, C. (2018). Matrix Stiffening and EGFR Cooperate to Promote the Collective Invasion of Cancer Cells. *Cancer Research*, 78(18), 5229-5242. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0601>
- Greaves, M., & Maley, C. C. (2012). CLONAL EVOLUTION IN CANCER. *Nature*, 481(7381), 306-313. <https://doi.org/10.1038/nature10762>
- Green, D. R. (2019). Paradoxical Puma Prohibits Pyruvate Pumps to Prime Pathology. *Cancer Cell*, 35(2), 163-165. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.01.016>
- Green, J. L., La, J., Yum, K. W., Desai, P., Rodewald, L.-W., Zhang, X., Leblanc, M., Nusse, R., Lewis, M. T., & Wahl, G. M. (2013). Paracrine Wnt signaling both promotes and inhibits human breast tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6991-6996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303671110>
- Grinnell, F. (1994). Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *The Journal of Cell Biology*, 124(4), 401-404. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.4.401>
- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(18), 2847-2849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>
- Guièze, R., Liu, V. M., Rosebrock, D., Jourdain, A. A., Hernández-Sánchez, M., Martínez Zurita, A., Sun, J., Ten Hacken, E., Baranowski, K., Thompson, P. A., Heo, J.-M., Cartun, Z., Aygün, O., Iorgulescu, J. B., Zhang, W., Notarangelo, G., Livitz, D., Li, S., Davids, M. S., ... Wu, C. J. (2019). Mitochondrial Reprogramming Underlies Resistance to BCL-2 Inhibition in Lymphoid Malignancies. *Cancer Cell*, 36(4), 369-384.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.08.005>
- Guo, D., Prins, R. M., Dang, J., Kuga, D., Iwanami, A., Soto, H., Lin, K. Y., Huang, T. T., Akhavan, D., Hock, M. B., Kofman, A. A., Bensinger, S. J., Yong, W. H., Vinters, H. V., Horvath, S., Watson, A. D., Kuhn, J. G., Robins, H. I., Mehta, M. P., ... Mischel, P. S. (2009). EGFR Signaling Through an Akt-SREBP-1-Dependent, Rapamycin-Resistant Pathway Sensitizes Glioblastomas to Anti-Lipogenic Therapy. *Science signaling*, 2(101), ra82. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000446>
- Guo, H., Ha, C., Dong, H., Yang, Z., Ma, Y., & Ding, Y. (2019). Cancer-associated fibroblast-derived

- exosomal microRNA-98-5p promotes cisplatin resistance in ovarian cancer by targeting CDKN1A. *Cancer Cell International*, 19, 347. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1051-3>
- Guo, J. Y., Chen, H.-Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A. M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J. J., Chen, G., Lemons, J. M. S., Karantza, V., Collier, H. A., DiPaola, R. S., Gelinas, C., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & Development*, 25(5), 460-470. <https://doi.org/10.1101/gad.2016311>
- Guo, X., Loibl, S., Untch, M., Möbus, V., Schwedler, K., Fasching, P. A., Barinoff, J., Holms, F., Thomssen, C., Zahm, D. M., Kreienberg, R., Hauschild, M., Eidtmann, H., Tauchert, S., Mehta, K., & von Minckwitz, G. (2011). Re-Challenging Taxanes in Recurrent Breast Cancer in Patients Treated with (Neo-)Adjuvant Taxane-Based Therapy. *Breast Care (Basel, Switzerland)*, 6(4), 279-283. <https://doi.org/10.1159/000330946>
- Guo, Z., Zhang, H., Fu, Y., Kuang, J., Zhao, B., Zhang, L., Lin, J., Lin, S., Wu, D., & Xie, G. (2023). Cancer-associated fibroblasts induce growth and radioresistance of breast cancer cells through paracrine IL-6. *Cell Death Discovery*, 9(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01306-3>
- Guppy, M., Leedman, P., Zu, X., & Russell, V. (2002). Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *The Biochemical Journal*, 364(Pt 1), 309-315. <https://doi.org/10.1042/bj3640309>
- Gupta, S. C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., & Aggarwal, B. B. (2012). Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer: The Roles of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis, Prevention, and Therapy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(11), 1295-1322. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4414>
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell*, 30(2), 214-226. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>
- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y.-H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C. L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M. S., Sartor, M. A., & Kaufman, R. J. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature Cell Biology*, 15(5), 481-490. <https://doi.org/10.1038/ncb2738>
- Han, J., Goldstein, L. A., Gastman, B. R., Froelich, C. J., Yin, X.-M., & Rabinowich, H. (2004). Degradation of Mcl-1 by granzyme B: Implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(21), Article 21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313234200>
- Han, J., Hou, W., Goldstein, L. A., Lu, C., Stolz, D. B., Yin, X.-M., & Rabinowich, H. (2008). Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(28), 19665-19677. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710169200>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Haniffa, M. A., Wang, X.-N., Holtick, U., Rae, M., Isaacs, J. D., Dickinson, A. M., Hilkens, C. M. U., & Collin, M. P. (2007). Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(3), 1595-1604. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1595>
- Hann, C. L., Daniel, V. C., Sugar, E. A., Dobromilskaya, I., Murphy, S. C., Cope, L., Lin, X., Hierman, J. S., Wilburn, D. L., Watkins, D. N., & Rudin, C. M. (2008). Therapeutic Efficacy of ABT-737, a Selective Inhibitor of BCL-2, in Small Cell Lung Cancer. *Cancer research*, 68(7), 2321-2328. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5031>
- Hannun, Y. A. (1997). Apoptosis and the Dilemma of Cancer Chemotherapy. *Blood*, 89(6), 1845-1853. <https://doi.org/10.1182/blood.V89.6.1845>
- Harami-Papp, H., Pongor, L. S., Munkácsy, G., Horváth, G., Nagy, Á. M., Ambrus, A., Hauser, P., Szabó, A., Tretter, L., & Gyórfy, B. (2016). TP53 mutation hits energy metabolism and increases glycolysis in breast cancer. *Oncotarget*, 7(41), 67183-67195. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11594>
- Harbeck, N., Thomssen, C., & Gnant, M. (2013). St. Gallen 2013: Brief Preliminary Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care*, 8(2),

- 102-109.
<https://doi.org/10.1159/000351193>
- Hardie, D. G., Schaffer, B. E., & Brunet, A. (2016). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends in Cell Biology*, 26(3), 190-201.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.013>
- Hardwick, J. M., & Soane, L. (2013). Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008722>
- Harris, I. S., Treloar, A. E., Inoue, S., Sasaki, M., Gorrini, C., Lee, K. C., Yung, K. Y., Brenner, D., Knobbe-Thomsen, C. B., Cox, M. A., Elia, A., Berger, T., Cescon, D. W., Adeoye, A., Brüstle, A., Molyneux, S. D., Mason, J. M., Li, W. Y., Yamamoto, K., ... Mak, T. W. (2015). Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell*, 27(2), 211-222.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.019>
- Harrison, D. J., Geller, D. S., Gill, J. D., Lewis, V. O., & Gorlick, R. (2018). Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 18(1), 39-50.
<https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1413939>
- Hassan, M. S. U., Ansari, J., Spooner, D., & Hussain, S. A. (2010). Chemotherapy for breast cancer (Review). *Oncology Reports*, 24(5), 1121-1131.
https://doi.org/10.3892/or_00000963
- Hassan, S., & Adari, G. (2004). Primary breast sarcoma: Case report. *East African Medical Journal*, 81(7), 375-377.
<https://doi.org/10.4314/eamj.v81i7.9194>
- Haubeiss, S., Schmid, J. O., Mürdter, T. E., Sonnenberg, M., Friedel, G., van der Kuip, H., & Aulitzky, W. E. (2010). Dasatinib reverses cancer-associated fibroblasts (CAFs) from primary lung carcinomas to a phenotype comparable to that of normal fibroblasts. *Molecular Cancer*, 9, 168.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-168>
- Hayward, R. L., Macpherson, J. S., Cummings, J., Monia, B. P., Smyth, J. F., & Jodrell, D. I. (2004). Enhanced oxaliplatin-induced apoptosis following antisense Bcl-xl down-regulation is p53 and Bax dependent: Genetic evidence for specificity of the antisense effect. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(2), 169-178.
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual review of genetics*, 43, 67-93.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
- He, M., Jin, Q., Chen, C., Liu, Y., Ye, X., Jiang, Y., Ji, F., Qian, H., Gan, D., Yue, S., Zhu, W., & Chen, T. (2019). The miR-186-3p/EREG axis orchestrates tamoxifen resistance and aerobic glycolysis in breast cancer cells. *Oncogene*, 38(28), 5551-5565.
<https://doi.org/10.1038/s41388-019-0817-3>
- He, Y., Zhang, X., Chang, J., Kim, H.-N., Zhang, P., Wang, Y., Khan, S., Liu, X., Zhang, X., Lv, D., Song, L., Li, W., Thummuri, D., Yuan, Y., Wiegand, J. S., Ortiz, Y. T., Budamagunta, V., Elisseeff, J. H., Campisi, J., ... Zhou, D. (2020). Using proteolysis-targeting chimera technology to reduce navitoclax platelet toxicity and improve its senolytic activity. *Nature Communications*, 11(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15838-0>
- Heacock, C. S., & Sutherland, R. M. (1990). Enhanced synthesis of stress proteins caused by hypoxia and relation to altered cell growth and metabolism. *British Journal of Cancer*, 62(2), 217-225.
- Heiden, M. G. V., & DeBerardinis, R. J. (2017). Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. *Cell*, 168(4), 657-669.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.039>
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical Journal*, 374(Pt 1), Article Pt 1.
<https://doi.org/10.1042/BJ20030407>
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M. A. S., Werb, Z., & Rafii, S. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, 109(5), Article 5.
- Hennighausen, L., & Robinson, G. W. (2005). Information networks in the mammary gland. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(9), Article 9.
<https://doi.org/10.1038/nrm1714>
- Hensley, C. T., Faubert, B., Yuan, Q., Lev-Cohain, N., Jin, E., Kim, J., Jiang, L., Ko, B., Skelton, R., Loudat, L., Wodzak, M., Klimko, C., McMillan, E., Butt, Y., Ni, M., Oliver, D., Torrealba, J., Malloy, C. R., Kernstine, K., ... DeBerardinis, R. J. (2016). Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. *Cell*,

- 164(4), Article 4.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.034>
- Hernandez-Davies, J. E., Tran, T. Q., Reid, M. A., Rosales, K. R., Lowman, X. H., Pan, M., Moriceau, G., Yang, Y., Wu, J., Lo, R. S., & Kong, M. (2015). Vemurafenib resistance reprograms melanoma cells towards glutamine dependence. *Journal of Translational Medicine*, 13, 210. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0581-2>
- Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.-H., Bassik, M. C., Antonsson, B., Brandt, G. S., Iwakoshi, N. N., Schinzel, A., Glimcher, L. H., & Korsmeyer, S. J. (2006). Proapoptotic BAX and BAK Modulate the Unfolded Protein Response by a Direct Interaction with IRE1 α . *Science*, 312(5773), 572-576. <https://doi.org/10.1126/science.1123480>
- Hey, S. P., Gyawali, B., D'Andrea, E., Kanagaraj, M., Franklin, J. M., & Kesselheim, A. S. (2020). A Systematic Review and Meta-Analysis of Bevacizumab in First-Line Metastatic Breast Cancer: Lessons for Research and Regulatory Enterprises. *Journal of the National Cancer Institute*, 112(4), 335-342. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz211>
- Hickey, B. E., & Lehman, M. (2021). Partial breast irradiation versus whole breast radiotherapy for early breast cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2021(8), CD007077. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007077.pub4>
- Higashiyama, R., Nakao, S., Shibusawa, Y., Ishikawa, O., Moro, T., Mikami, K., Fukumitsu, H., Ueda, Y., Minakawa, K., Tabata, Y., Bou-Gharios, G., & Inagaki, Y. (2011). Differential contribution of dermal resident and bone marrow-derived cells to collagen production during wound healing and fibrogenesis in mice. *The Journal of Investigative Dermatology*, 131(2), 529-536. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.314>
- Hiltbrunner, S., Britschgi, C., Schuberth, P., Bankel, L., Nguyen-Kim, T. D. L., Gulati, P., Weder, W., Opitz, I., Lauk, O., Caviezel, C., Bachmann, H., Tabor, A., Schröder, P., Knuth, A., Münz, C., Stahel, R., Boyman, O., Renner, C., Petrusch, U., & Curioni-Fontecedro, A. (2021). Local delivery of CAR T cells targeting fibroblast activation protein is safe in patients with pleural mesothelioma: First report of FAPME, a phase I clinical trial. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 32(1), 120-121. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.10.474>
- Hirayama, A., Kami, K., Sugimoto, M., Sugawara, M., Toki, N., Onozuka, H., Kinoshita, T., Saito, N., Ochiai, A., Tomita, M., Esumi, H., & Soga, T. (2009). Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Research*, 69(11), 4918-4925. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4806>
- Hirpara, J., Eu, J. Q., Tan, J. K. M., Wong, A. L., Clement, M.-V., Kong, L. R., Ohi, N., Tsunoda, T., Qu, J., Goh, B. C., & Pervaiz, S. (2019). Metabolic reprogramming of oncogene-addicted cancer cells to OXPHOS as a mechanism of drug resistance. *Redox Biology*, 25, 101076. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.10.1076>
- Hitomi, J., Christofferson, D. E., Ng, A., Yao, J., Degtarev, A., Xavier, R. J., & Yuan, J. (2008). Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*, 135(7), 1311-1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.044>
- Hlatky, L., Tsiou, C., Hahnfeldt, P., & Coleman, C. N. (1994). Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. *Cancer Research*, 54(23), Article 23.
- Ho, P.-C., Bihuniak, J. D., Macintyre, A. N., Staron, M., Liu, X., Amezcua, R., Tsui, Y.-C., Cui, G., Micevic, G., Perales, J. C., Kleinstein, S. H., Abel, E. D., Insogna, K. L., Feske, S., Locasale, J. W., Bosenberg, M. W., Rathmell, J. C., & Kaech, S. M. (2015). Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses. *Cell*, 162(6), 1217-1228. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.012>
- Hofheinz, R.-D., al-Batran, S.-E., Hartmann, F., Hartung, G., Jäger, D., Renner, C., Tanswell, P., Kunz, U., Amelsberg, A., Kuthan, H., & Stehle, G. (2003). Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: An early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Onkologie*, 26(1), Article 1. <https://doi.org/10.1159/000069863>
- Hollestelle, A., Nagel, J. H. A., Smid, M., Lam, S., Elstrodt, F., Wasielewski, M., Ng, S. S., French, P. J., Peeters, J. K., Rozendaal, M. J., Riaz, M., Koopman, D. G., ten Hagen, T. L. M., de Leeuw, B. H. C. G. M., Zwarthoff, E. C., Teunisse, A., van der Spek, P. J., Klijn, J. G.

- M., Dinjens, W. N. M., ... Schutte, M. (2010). Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, 121(1), 53-64. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0460-8>
- Honma, N., Horii, R., Ito, Y., Saji, S., Younes, M., Iwase, T., & Akiyama, F. (2015). Differences in clinical importance of Bcl-2 in breast cancer according to hormone receptors status or adjuvant endocrine therapy. *BMC Cancer*, 15, 698. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1686-y>
- Hosaka, K., Yang, Y., Seki, T., Fischer, C., Dubey, O., Fredlund, E., Hartman, J., Religa, P., Morikawa, H., Ishii, Y., Sasahara, M., Larsson, O., Cossu, G., Cao, R., Lim, S., & Cao, Y. (2016). Pericyte-fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(38), E5618-5627. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608384113>
- Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell Death in Disease : Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *The New England journal of medicine*, 361(16), 1570-1583. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0901217>
- Howlader, N., Cronin, K. A., Kurian, A. W., & Andridge, R. (2018). Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 27(6), 619-626. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0627>
- Hsu, C.-C., Peng, D., Cai, Z., & Lin, H.-K. (2022). AMPK signaling and its targeting in cancer progression and treatment. *Seminars in Cancer Biology*, 85, 52-68. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.04.006>
- Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., & Hsueh, A. J. W. (1997). Bcl-2 is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23), 12401-12406. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12401>
- Hu, M., Yao, J., Cai, L., Bachman, K. E., van den Brûle, F., Velculescu, V., & Polyak, K. (2005). Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nature Genetics*, 37(8), 899-905. <https://doi.org/10.1038/ng1596>
- Hu, S., Balakrishnan, A., Bok, R. A., Anderton, B., Larson, P. E. Z., Nelson, S. J., Kurhanewicz, J., Vigneron, D. B., & Goga, A. (2011). 13C-pyruvate imaging reveals alterations in glycolysis that precede c-Myc-induced tumor formation and regression. *Cell Metabolism*, 14(1), 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.012>
- Hu, Y.-L., Yin, Y., Liu, H.-Y., Feng, Y.-Y., Bian, Z.-H., Zhou, L.-Y., Zhang, J.-W., Fei, B.-J., Wang, Y.-G., & Huang, Z.-H. (2016). Glucose deprivation induces chemoresistance in colorectal cancer cells by increasing ATF4 expression. *World Journal of Gastroenterology*, 22(27), 6235-6245. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i27.6235>
- Hua, Y., Zheng, Y., Yao, Y., Jia, R., Ge, S., & Zhuang, A. (2023). Metformin and cancer hallmarks : Shedding new lights on therapeutic repurposing. *Journal of Translational Medicine*, 21(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04263-8>
- Huang, C.-Y., Chung, C.-L., Hu, T.-H., Chen, J.-J., Liu, P.-F., & Chen, C.-L. (2021). Recent progress in TGF- β inhibitors for cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 134, 111046. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111046>
- Huang, H., Shah, K., Bradbury, N. A., Li, C., & White, C. (2014). Mcl-1 promotes lung cancer cell migration by directly interacting with VDAC to increase mitochondrial Ca²⁺ uptake and reactive oxygen species generation. *Cell Death & Disease*, 5, e1482. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.419>
- Huang, J.-Y., Cheng, Y.-J., Lin, Y.-P., Lin, H.-C., Su, C.-C., Juliano, R., & Yang, B.-C. (2010). Extracellular Matrix of Glioblastoma Inhibits Polarization and Transmigration of T Cells : The Role of Tenascin-C in Immune Suppression. *The Journal of Immunology*, 185(3), 1450-1459. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901352>
- Huang, S. C.-C., Everts, B., Ivanova, Y., O'Sullivan, D., Nascimento, M., Smith, A. M., Beatty, W., Love-Gregory, L., Lam, W. Y., O'Neill, C. M., Yan, C., Du, H., Abumrad, N. A., Urban, J. F., Artyomov, M. N., Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2014). Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of

- macrophages. *Nature Immunology*, *15*(9), 846-855. <https://doi.org/10.1038/ni.2956>
- Huanwen, W., Zhiyong, L., Xiaohua, S., Xinyu, R., Kai, W., & Tonghua, L. (2009). Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. *Molecular Cancer*, *8*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-125>
- Huber, A.-L., Lebeau, J., Guillaumot, P., Pétrilli, V., Malek, M., Chilloux, J., Fauvet, F., Payen, L., Kfoury, A., Renno, T., Chevet, E., & Manié, S. N. (2013). p58IPK-Mediated Attenuation of the Proapoptotic PERK-CHOP Pathway Allows Malignant Progression upon Low Glucose. *Molecular Cell*, *49*(6), 1049-1059. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.009>
- Hung, C.-M., Garcia-Haro, L., Sparks, C. A., & Guertin, D. A. (2012). mTOR-Dependent Cell Survival Mechanisms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(12), a008771. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008771>
- Hurwitz, H. I., Uppal, N., Wagner, S. A., Bendell, J. C., Beck, J. T., Wade, S. M., Nemunaitis, J. J., Stella, P. J., Pipas, J. M., Wainberg, Z. A., Manges, R., Garrett, W. M., Hunter, D. S., Clark, J., Leopold, L., Sandor, V., & Levy, R. S. (2015). Randomized, Double-Blind, Phase II Study of Ruxolitinib or Placebo in Combination With Capecitabine in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer for Whom Therapy With Gemcitabine Has Failed. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *33*(34), 4039-4047. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.4578>
- Ichim, G., Lopez, J., Ahmed, S. U., Muthalagu, N., Giampazolias, E., Delgado, M. E., Haller, M., Riley, J. S., Mason, S. M., Athineos, D., Parsons, M. J., van de Kooij, B., Bouchier-Hayes, L., Chalmers, A. J., Rooswinkel, R. W., Oberst, A., Blyth, K., Rehm, M., Murphy, D. J., & Tait, S. W. G. (2015). Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Molecular Cell*, *57*(5), 860-872. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.018>
- Ichim, T. E., O'Heeron, P., & Kesari, S. (2018). Fibroblasts as a practical alternative to mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine*, *16*(1), 212. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1536-1>
- Ikegaki, N., Katsumata, M., Minna, J., & Tsujimoto, Y. (1994). Expression of bcl-2 in small cell lung carcinoma cells. *Cancer Research*, *54*(1), 6-8.
- Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, *115*(5), 577-590. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00929-2)
- Ippolito, L., Marini, A., Cavallini, L., Morandi, A., Pietrovito, L., Pintus, G., Giannoni, E., Schrader, T., Pühr, M., Chiarugi, P., & Taddei, M. L. (2016). Metabolic shift toward oxidative phosphorylation in docetaxel resistant prostate cancer cells. *Oncotarget*, *7*(38), 61890-61904. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11301>
- Ippolito, L., Morandi, A., Taddei, M. L., Parri, M., Comito, G., Iscaro, A., Raspollini, M. R., Magherini, F., Rapizzi, E., Masquelier, J., Muccioli, G. G., Sonveaux, P., Chiarugi, P., & Giannoni, E. (2019). Cancer-associated fibroblasts promote prostate cancer malignancy via metabolic rewiring and mitochondrial transfer. *Oncogene*, *38*(27), Article 27. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0805-7>
- Iqbal, S., Zhang, S., Driss, A., Liu, Z.-R., Kim, H.-R. C., Wang, Y., Ritenour, C., Zhou, H. E., Kucuk, O., Chung, L. W. K., & Wu, D. (2012). PDGF upregulates Mcl-1 through activation of β -catenin and HIF-1 α -dependent signaling in human prostate cancer cells. *PLoS One*, *7*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030764>
- Isaacs, J. S., Jung, Y. J., Mole, D. R., Lee, S., Torres-Cabala, C., Chung, Y.-L., Merino, M., Trepel, J., Zbar, B., Toro, J., Ratcliffe, P. J., Linehan, W. M., & Neckers, L. (2005). HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: Novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell*, *8*(2), 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.06.017>
- Ishikawa, T., & Ali-Osman, F. (1993). Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(27), 20116-20125.
- Ito, K., & Suda, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*,

- 15(4), 243-256.
<https://doi.org/10.1038/nrm3772>
- Jachetti, E., Caputo, S., Mazzoleni, S., Brambillasca, C. S., Parigi, S. M., Grioni, M., Piras, I. S., Restuccia, U., Calcinotto, A., Freschi, M., Bachi, A., Galli, R., & Bellone, M. (2015). Tenascin-C Protects Cancer Stem-like Cells from Immune Surveillance by Arresting T-cell Activation. *Cancer Research*, 75(10), 2095-2108. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2346>
- Jacobs, S. R., Herman, C. E., MacIver, N. J., Wofford, J. A., Wieman, H. L., Hammen, J. J., & Rathmell, J. C. (2008). Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(7), 4476-4486.
- Jamil, S., Sobouti, R., Hojabrpour, P., Raj, M., Kast, J., & Duronio, V. (2005). A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochemical Journal*, 387(Pt 3), 659-667.
<https://doi.org/10.1042/BJ20041596>
- Jang, C., Hui, S., Zeng, X., Cowan, A. J., Wang, L., Chen, L., Morscher, R. J., Reyes, J., Frezza, C., Hwang, H. Y., Imai, A., Saito, Y., Okamoto, K., Vaspoli, C., Kasprinski, L., Zsido, G. A., Gorman, J. H., Gorman, R. C., & Rabinowitz, J. D. (2019). Metabolite Exchange between Mammalian Organs Quantified in Pigs. *Cell Metabolism*, 30(3), 594-606.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.06.002>
- Jeong, S.-Y., Gaume, B., Lee, Y.-J., Hsu, Y.-T., Ryu, S.-W., Yoon, S.-H., & Youle, R. J. (2004). Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers. *The EMBO Journal*, 23(10), 2146-2155.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600225>
- Jézéquel, P., Loussouarn, D., Guérin-Charbonnel, C., Champion, L., Vanier, A., Gouraud, W., Lasla, H., Guette, C., Valo, I., Verrière, V., & Campone, M. (2015). Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: Importance of immune response. *Breast Cancer Research : BCR*, 17, 43.
<https://doi.org/10.1186/s13058-015-0550-y>
- Jia, C., Wang, G., Wang, T., Fu, B., Zhang, Y., Huang, L., Deng, Y., Chen, G., Wu, X., Chen, J., Pan, Y., Tai, Y., Liang, J., Li, X., Hu, K., Xie, B., Li, S., Yang, Y., Chen, G., ... Liu, W. (2020). Cancer-associated Fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition via the Transglutaminase 2-dependent IL-6/IL6R/STAT3 axis in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Biological Sciences*, 16(14), 2542-2558.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.45446>
- Jiang, Y., Zhang, H., Wang, J., Liu, Y., Luo, T., & Hua, H. (2022). Targeting extracellular matrix stiffness and mechanotransducers to improve cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 15, 34.
<https://doi.org/10.1186/s13045-022-01252-0>
- Joshi, S., Tolkunov, D., Aviv, H., Hakimi, A. A., Yao, M., Hsieh, J. J., Ganesan, S., Chan, C. S., & White, E. (2015). The Genomic Landscape of Renal Oncocytoma Identifies a Metabolic Barrier to Tumorigenesis. *Cell Reports*, 13(9), 1895-1908.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.059>
- Jotzu, C., Alt, E., Welte, G., Li, J., Hennessy, B. T., Devarajan, E., Krishnappa, S., Pinilla, S., Droll, L., & Song, Y.-H. (2010). Adipose tissue-derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor-derived factors. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)*, 33(2), 61-79.
<https://doi.org/10.3233/ACP-CLO-2010-0535>
- Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., & Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nature Reviews. Cancer*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrc3538>
- Jung, Y., Kim, J. K., Shiozawa, Y., Wang, J., Mishra, A., Joseph, J., Berry, J. E., McGee, S., Lee, E., Sun, H., Wang, J., Jin, T., Zhang, H., Dai, J., Krebsbach, P. H., Keller, E. T., Pienta, K. J., & Taichman, R. S. (2013). Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nature Communications*, 4, 1795.
<https://doi.org/10.1038/ncomms2766>
- Kakarla, S., Chow, K. K. H., Mata, M., Shaffer, D. R., Song, X.-T., Wu, M.-F., Liu, H., Wang, L. L., Rowley, D. R., Pfizenmaier, K., & Gottschalk, S. (2013). Antitumor effects of chimeric receptor engineered human T cells directed to tumor stroma. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(8), 1611-1620.
<https://doi.org/10.1038/mt.2013.110>
- Kalkavan, H., Chen, M. J., Crawford, J. C., Quarato, G., Fitzgerald, P., Tait, S. W. G., Goding, C. R., & Green, D. R. (2022). Sublethal cytochrome c release generates drug-tolerant persister

- cells. *Cell*, 185(18), 3356-3374.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.07.025>
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6(5), 392-401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
- Kamiński, M. M., Sauer, S. W., Kamiński, M., Opp, S., Ruppert, T., Grigaravičius, P., Grudnik, P., Gröne, H.-J., Krammer, P. H., & Gülow, K. (2012). T cell activation is driven by an ADP-dependent glucokinase linking enhanced glycolysis with mitochondrial reactive oxygen species generation. *Cell Reports*, 2(5), 1300-1315. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.009>
- Kaminski, M. M., Sauer, S. W., Klemke, C.-D., Süß, D., Okun, J. G., Krammer, P. H., & Gülow, K. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species control T cell activation by regulating IL-2 and IL-4 expression: Mechanism of ciprofloxacin-mediated immunosuppression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(9), 4827-4841. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901662>
- Kamphorst, J. J., Cross, J. R., Fan, J., de Stanchina, E., Mathew, R., White, E. P., Thompson, C. B., & Rabinowitz, J. D. (2013). Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 8882-8887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307237110>
- Kamphorst, J. J., Nofal, M., Comisso, C., Hackett, S. R., Lu, W., Grabocka, E., Vander Heiden, M. G., Miller, G., Drebin, J. A., Bar-Sagi, D., Thompson, C. B., & Rabinowitz, J. D. (2015). Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. *Cancer Research*, 75(3), 544-553. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2211>
- Karagiannis, G. S., Poutahidis, T., Erdman, S. E., Kirsch, R., Riddell, R. H., & Diamandis, E. P. (2012). Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Molecular Cancer Research: MCR*, 10(11), 1403-1418. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0307>
- Karbowski, M., Norris, K. L., Cleland, M. M., Jeong, S.-Y., & Youle, R. J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature*, 443(7112), Article 7112. <https://doi.org/10.1038/nature05111>
- Kato, M., & Manabe, A. (2018). Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 60(1), 4-12. <https://doi.org/10.1111/ped.13457>
- Kato, Y., Nakayama, Y., Umeda, M., & Miyazaki, K. (1992). Induction of 103-kDa gelatinase/type IV collagenase by acidic culture conditions in mouse metastatic melanoma cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(16), 11424-11430.
- Kauer-Dorner, D., & Berger, D. (2018). The Role of Brachytherapy in the Treatment of Breast Cancer. *Breast Care*, 13(3), 157-161. <https://doi.org/10.1159/000489638>
- Kay, E. J., & Zanivan, S. (2021). Metabolic pathways fuelling protumorigenic cancer-associated fibroblast functions. *Current Opinion in Systems Biology*, 28, 100377. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2021.100377>
- Kaye, S. B. (1998). New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *British Journal of Cancer*, 78(Suppl 3), 1-7.
- Kazyken, D., Magnuson, B., Bodur, C., Acosta-Jaquez, H. A., Zhang, D., Tong, X., Barnes, T. M., Steinl, G. K., Patterson, N. E., Altheim, C. H., Sharma, N., Inoki, K., Cartee, G. D., Bridges, D., Yin, L., Riddle, S. M., & Fingar, D. C. (2019). AMPK directly activates mTORC2 to promote cell survival during acute energetic stress. *Science Signaling*, 12(585), eaav3249. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aav3249>
- Ke, N., Godzik, A., & Reed, J. C. (2001). Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(16), Article 16. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000871200>
- Kehr, S., & Vogler, M. (2021). It's time to die: BH3 mimetics in solid tumors. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1868(5), 118987. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.118987>
- Keitel, U., Scheel, A., Thomale, J., Halpape, R., Kaulfuß, S., Scheel, C., & Döbelstein, M. (2014). Bcl-xL mediates therapeutic resistance of a mesenchymal breast cancer cell subpopulation. *Oncotarget*, 5(23), Article 23. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2634>

- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kerr, J. F., Winterford, C. M., & Harmon, B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73(8), 2013-2026. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19940415\)73:8<2013::aid-cncr2820730802>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19940415)73:8<2013::aid-cncr2820730802>3.0.co;2-j)
- Khan, S., Kellish, P., Connis, N., Thummuri, D., Wiegand, J., Zhang, P., Zhang, X., Budamagunta, V., Hua, N., Yang, Y., De, U., Jin, L., Zhang, W., Zheng, G., Hromas, R., Hann, C., Zajac-Kaye, M., Kaye, F. J., & Zhou, D. (2023). Co-targeting BCL-XL and MCL-1 with DT2216 and AZD8055 synergistically inhibit small-cell lung cancer growth without causing on-target toxicities in mice. *Cell Death Discovery*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01296-8>
- Khan, S., Zhang, X., Lv, D., Zhang, Q., He, Y., Zhang, P., Liu, X., Thummuri, D., Yuan, Y., Wiegand, J. S., Pei, J., Zhang, W., Sharma, A., McCurdy, C. R., Kuruvilla, V. M., Baran, N., Ferrando, A. A., Kim, Y.-M., Rogojina, A., ... Zhou, D. (2019). A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity. *Nature Medicine*, 25(12), 1938-1947. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0668-z>
- Kieffer, Y., Hocine, H. R., Gentric, G., Pelon, F., Bernard, C., Bourachot, B., Lameiras, S., Albergante, L., Bonneau, C., Guyard, A., Tarte, K., Zinovyev, A., Baulande, S., Zalcman, G., Vincent-Salomon, A., & Mechta-Grigoriou, F. (2020). Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Clusters Linked to Immunotherapy Resistance in Cancer. *Cancer Discovery*, 10(9), 1330-1351. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1384>
- Kiesel, V. A., Sheeley, M. P., Coleman, M. F., Cotul, E. K., Donkin, S. S., Hursting, S. D., Wendt, M. K., & Teegarden, D. (2021). Pyruvate carboxylase and cancer progression. *Cancer & Metabolism*, 9(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40170-021-00256-7>
- Kikuchi, Y., Kunita, A., Iwata, C., Komura, D., Nishiyama, T., Shimazu, K., Takeshita, K., Shibahara, J., Kii, I., Morishita, Y., Yashiro, M., Hirakawa, K., Miyazono, K., Kudo, A., Fukayama, M., & Kashima, T. G. (2014). The niche component periostin is produced by cancer-associated fibroblasts, supporting growth of gastric cancer through ERK activation. *The American Journal of Pathology*, 184(3), 859-870. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.11.012>
- Kim, E. Y., Jung, J. Y., Kim, A., Chang, Y. S., & Kim, S. K. (2017). ABT-737 Synergizes with Cisplatin Bypassing Aberration of Apoptotic Pathway in Non-small Cell Lung Cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 19(4), 354-363. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.02.008>
- Kim, J. K., Kang, K. A., Piao, M. J., Ryu, Y. S., Han, X., Fernando, P. M. D. J., Oh, M. C., Park, J. E., Shilnikova, K., Boo, S. J., Na, S.-Y., Jeong, Y. J., Jeong, S. U., & Hyun, J. W. (2016). Endoplasmic reticulum stress induces 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 44, 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.005>
- Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, 3(3), 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>
- Kim, J., Yu, L., Chen, W., Xu, Y., Wu, M., Todorova, D., Tang, Q., Feng, B., Jiang, L., He, J., Chen, G., Fu, X., & Xu, Y. (2019). Wild-Type p53 Promotes Cancer Metabolic Switch by Inducing PUMA-Dependent Suppression of Oxidative Phosphorylation. *Cancer Cell*, 35(2), 191-203.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.12.012>
- Kim, J.-H., Sim, S.-H., Ha, H.-J., Ko, J.-J., Lee, K., & Bae, J. (2009). MCL-1ES, a novel variant of MCL-1, associates with MCL-1L and induces mitochondrial cell death. *FEBS Letters*, 583(17), Article 17. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.08.006>
- Kim, S., & An, S. S. A. (2016). Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine*, 95(26), e3993. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003993>
- Kirsh, E. J., Baunoch, D. A., & Stadler, W. M. (1998). Expression of bcl-2 and bcl-X in bladder cancer. *The Journal of Urology*, 159(4), 1348-1353.
- Klysz, D., Tai, X., Robert, P. A., Craveiro, M., Cretenet, G., Oburoglu, L., Mongellaz, C., Floess, S., Fritz, V., Matias, M. I., Yong, C., Surh, N., Marie, J. C., Huehn, J., Zimmermann, V., Kinet, S., Dardalhon, V., & Taylor, N. (2015).

- Glutamine-dependent α -ketoglutarate production regulates the balance between T helper 1 cell and regulatory T cell generation. *Science Signaling*, 8(396), ra97. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aab2610>
- Knudsen, E. S., Balaji, U., Freinkman, E., McCue, P., & Witkiewicz, A. K. (2016). Unique metabolic features of pancreatic cancer stroma: Relevance to the tumor compartment, prognosis, and invasive potential. *Oncotarget*, 7(48), 78396-78411. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11893>
- Kobayashi, N., Miyoshi, S., Mikami, T., Koyama, H., Kitazawa, M., Takeoka, M., Sano, K., Amano, J., Isogai, Z., Niida, S., Oguri, K., Okayama, M., McDonald, J. A., Kimata, K., Taniguchi, S., & Itano, N. (2010). Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Research*, 70(18), 7073-7083. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4687>
- Kobayashi, S., Lee, S.-H., Meng, X. W., Mott, J. L., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Craig, R. W., Kaufmann, S. H., & Gores, G. J. (2007). Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(25), Article 25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610010200>
- Kojima, Y., Acar, A., Eaton, E. N., Mellody, K. T., Scheel, C., Ben-Porath, I., Onder, T. T., Wang, Z. C., Richardson, A. L., Weinberg, R. A., & Orimo, A. (2010). Autocrine TGF- β and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(46), 20009-20014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013805107>
- Komurov, K., Tseng, J.-T., Muller, M., Seviour, E. G., Moss, T. J., Yang, L., Nagrath, D., & Ram, P. T. (2012). The glucose-deprivation network counteracts lapatinib-induced toxicity in resistant ErbB2-positive breast cancer cells. *Molecular Systems Biology*, 8, 596. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.25>
- Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P. P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y.-X., Sneed, T., Verhaegen, M., Soengas, M., Ruvolo, V. R., McQueen, T., Schober, W. D., Watt, J. C., Jiffar, T., Ling, X., Marini, F. C., ... Andreeff, M. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 10(5), 375-388. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.006>
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L., & Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews. Cancer*, 11(5), 325-337. <https://doi.org/10.1038/nrc3038>
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A. L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G. L., Gong, J.-N., Moujalled, D. M., Bruno, A., Csekei, M., Paczal, A., Szabo, Z. B., Sipos, S., Radics, G., Prosenyak, A., Balint, B., Ondi, L., ... Geneste, O. (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature*, 538(7626), Article 7626. <https://doi.org/10.1038/nature19830>
- Kovacic, J. C., Mercader, N., Torres, M., Boehm, M., & Fuster, V. (2012). Epithelial-to-Mesenchymal and Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Circulation*, 125(14), 1795-1808. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040352>
- Kozopas, K. M., Yang, T., Buchan, H. L., Zhou, P., & Craig, R. W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), Article 8.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W., & Reed, J. C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Research*, 53(19), 4701-4714.
- Krall, A. S., Mullen, P. J., Surjono, F., Momcilovic, M., Schmid, E. W., Halbrook, C. J., Thambundit, A., Mittelman, S. D., Lysiotis, C. A., Shackelford, D. B., Knott, S. R. V., & Christofk, H. R. (2021). Asparagine couples mitochondrial respiration to ATF4 activity and tumor growth. *Cell metabolism*, 33(5), 1013-1026.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.02.001>
- Kraman, M., Bambrough, P. J., Arnold, J. N., Roberts, E. W., Magiera, L., Jones, J. O., Gopinathan, A., Tuveson, D. A., & Fearon, D. T. (2010). Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- α . *Science (New York, N.Y.)*, 330(6005), 827-830. <https://doi.org/10.1126/science.1195300>
- Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell*, 14(3), 275-291. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>

- Kreutzfeldt, J., Rozeboom, B., Dey, N., & De, P. (2020). The trastuzumab era: Current and upcoming targeted HER2+ breast cancer therapies. *American Journal of Cancer Research*, *10*(4), 1045-1067.
- Krishna, R., & Mayer, L. D. (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, *11*(4), 265-283. [https://doi.org/10.1016/s0928-0987\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/s0928-0987(00)00114-7)
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., & Vousden, K. H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: A lifeguard with a licence to kill. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *16*(7), 393-405. <https://doi.org/10.1038/nrm4007>
- Kulkoyluoglu-Cotul, E., Arca, A., & Madak-Erdogan, Z. (2019). Crosstalk between Estrogen Signaling and Breast Cancer Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *30*(1), 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.10.006>
- Kumar, D., New, J., Vishwakarma, V., Joshi, R., Enders, J., Lin, F., Dasari, S., Gutierrez, W. R., Leef, G., Ponnurangam, S., Chavan, H., Ganaden, L., Thornton, M. M., Dai, H., Tawfik, O., Straub, J., Shnyder, Y., Kakarala, K., Tsue, T. T., ... Thomas, S. M. (2018). Cancer-Associated Fibroblasts Drive Glycolysis in a Targetable Signaling Loop Implicated in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression. *Cancer Research*, *78*(14), Article 14. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1076>
- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, J. C. (2014). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Kung, H.-N., Marks, J. R., & Chi, J.-T. (2011). Glutamine Synthetase Is a Genetic Determinant of Cell Type-Specific Glutamine Independence in Breast Epithelia. *PLoS Genetics*, *7*(8), e1002229. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002229>
- Lagares, D., Santos, A., Grasberger, P. E., Liu, F., Probst, C. K., Rahimi, R. A., Sakai, N., Kuehl, T., Ryan, J., Bholra, P., Montero, J., Kapoor, M., Baron, M., Varelas, X., Tschumperlin, D. J., Letai, A., & Tager, A. M. (2017). Targeted apoptosis of myofibroblasts with the BH3 mimetic ABT-263 reverses established fibrosis. *Science Translational Medicine*, *9*(420), Article 420. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal3765>
- Lanning, N. J., Castle, J. P., Singh, S. J., Leon, A. N., Tovar, E. A., Sanghera, A., MacKeigan, J. P., Filipp, F. V., & Graveel, C. R. (2017). Metabolic profiling of triple-negative breast cancer cells reveals metabolic vulnerabilities. *Cancer & Metabolism*, *5*, 6. <https://doi.org/10.1186/s40170-017-0168-x>
- Larionova, I., Cherdyntseva, N., Liu, T., Patysheva, M., Rakina, M., & Kzhyshkowska, J. (2019). Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*, *8*(7), 1596004. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1596004>
- Lau, E. Y. T., Lo, J., Cheng, B. Y. L., Ma, M. K. F., Lee, J. M. F., Ng, J. K. Y., Chai, S., Lin, C. H., Tsang, S. Y., Ma, S., Ng, I. O. L., & Lee, T. K. W. (2016). Cancer-Associated Fibroblasts Regulate Tumor-Initiating Cell Plasticity in Hepatocellular Carcinoma through c-Met/FRA1/HEY1 Signaling. *Cell Reports*, *15*(6), 1175-1189. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.019>
- Laussel, C., & Léon, S. (2020). Cellular toxicity of the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose and associated resistance mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, *182*, 114213. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114213>
- Lazarides, E., & Baizer, D. R. (1978). Specificity of desmin to avian and mammalian muscle cells. *Cell*, *14*(2), 429-438. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90128-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90128-9)
- Le Guen, L., Marchal, S., Faure, S., & De Santa Barbara, P. (2015). Mesenchymal-epithelial interactions during digestive tract development and epithelial stem cell regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(20), 3883-3896. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1975-2>
- LeBleu, V. S., & Neilson, E. G. (2020). Origin and functional heterogeneity of fibroblasts. *The FASEB Journal*, *34*(3), 3519-3536. <https://doi.org/10.1096/fj.201903188R>
- LeBleu, V. S., O'Connell, J. T., Gonzalez Herrera, K. N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M. C., de Carvalho, F. M., Damascena, A., Domingos Chinen, L. T., Rocha, R. M., Asara, J. M., & Kalluri, R. (2014). PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative

- phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nature Cell Biology*, 16(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/ncb3039>
- Lecavalier-Barsoum, M., Chaudary, N., Han, K., Koritzinsky, M., Hill, R., & Milosevic, M. (2018). Targeting the CXCL12/CXCR4 pathway and myeloid cells to improve radiation treatment of locally advanced cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 143(5), 1017-1028. <https://doi.org/10.1002/ijc.31297>
- Ledoux, S., Yang, R., Friedlander, G., & Laouari, D. (2003). Glucose Depletion Enhances P-Glycoprotein Expression in Hepatoma Cells : Role of Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Cancer research*, 63, 7284-7290.
- Lee, C.-K., Jeong, S.-H., Jang, C., Bae, H., Kim, Y. H., Park, I., Kim, S. K., & Koh, G. Y. (2019). Tumor metastasis to lymph nodes requires YAP-dependent metabolic adaptation. *Science (New York, N.Y.)*, 363(6427), 644-649. <https://doi.org/10.1126/science.aav0173>
- Lee, J. S., Roberts, A., Juarez, D., Vo, T.-T. T., Bhatt, S., Herzog, L.-O., Mallya, S., Bellin, R. J., Agarwal, S. K., Salem, A. H., Xu, T., Jia, J., Li, L., Hanna, J. R., Davids, M. S., Fleischman, A. G., O'Brien, S., Lam, L. T., Levenson, J. D., ... Fruman, D. A. (2018). Statins enhance efficacy of venetoclax in blood cancers. *Science Translational Medicine*, 10(445), eaaq1240. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaq1240>
- Lee, K., Giltneane, J. M., Balko, J. M., Schwarz, L. J., Guerrero-Zotano, A. L., Hutchinson, K. E., Nixon, M. J., Estrada, M. V., Sánchez, V., Sanders, M. E., Lee, T., Gómez, H., Lluch, A., Pérez-Fidalgo, J. A., Wolf, M. M., Andrejeva, G., Rathmell, J. C., Fesik, S. W., & Arteaga, C. L. (2017). MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Cell Metabolism*, 26(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.009>
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750-2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
- Lei, K., & Davis, R. J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2432-2437. <https://doi.org/10.1073/pnas.0438011100>
- Lemons, J. M. S., Feng, X.-J., Bennett, B. D., Legesse-Miller, A., Johnson, E. L., Raitman, I., Pollina, E. A., Rabitz, H. A., Rabinowitz, J. D., & Collier, H. A. (2010). Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity. *PLoS Biology*, 8(10), e1000514. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000514>
- Leprivier, G., & Rotblat, B. (2020). How does mTOR sense glucose starvation? AMPK is the usual suspect. *Cell Death Discovery*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0260-9>
- Lester, S. C., Bose, S., Chen, Y.-Y., Connolly, J. L., de Baca, M. E., Fitzgibbons, P. L., Hayes, D. F., Kleer, C., O'Malley, F. P., Page, D. L., Smith, B. L., Tan, L. K., Weaver, D. L., Winer, E., & Members of the Cancer Committee, College of American Pathologists. (2009). Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133(10), 1515-1538. <https://doi.org/10.5858/133.10.1515>
- Letai, A. (2016). S63845, an MCL-1 Selective BH3 Mimetic : Another Arrow in Our Quiver. *Cancer Cell*, 30(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.016>
- Letai, A. G. (2008). Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature Reviews. Cancer*, 8(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nrc2297>
- Levenson, J. D., Phillips, D. C., Mitten, M. J., Boghaert, E. R., Diaz, D., Tahir, S. K., Belmont, L. D., Nimmer, P., Xiao, Y., Ma, X. M., Lowes, K. N., Kovar, P., Chen, J., Jin, S., Smith, M., Xue, J., Zhang, H., Oleksijew, A., Magoc, T. J., ... Souers, A. J. (2015). Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Science Translational Medicine*, 7(279), 279ra40. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4642>
- Li, F., Wang, Y., Zeller, K. I., Potter, J. J., Wonsey, D. R., O'Donnell, K. A., Kim, J., Yustein, J. T., Lee, L. A., & Dang, C. V. (2005). Myc Stimulates Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes and Mitochondrial Biogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), 6225-6234. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.6225-6234.2005>

- Li, H., Ning, S., Ghandi, M., Kryukov, G. V., Gopal, S., Deik, A., Souza, A., Pierce, K., Keskula, P., Hernandez, D., Ann, J., Shkoza, D., Apfel, V., Zou, Y., Vazquez, F., Barretina, J., Pagliarini, R. A., Galli, G. G., Root, D. E., ... Sellers, W. R. (2019). The Landscape of Cancer Cell Line Metabolism. *Nature medicine*, 25(5), 850-860. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0404-8>
- Li, H., Zhang, Q., Wu, Q., Cui, Y., Zhu, H., Fang, M., Zhou, X., Sun, Z., & Yu, J. (2019). Interleukin-22 secreted by cancer-associated fibroblasts regulates the proliferation and metastasis of lung cancer cells via the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway. *American Journal of Translational Research*, 11(7), 4077-4088.
- Li, P., Shan, J.-X., Chen, X.-H., Zhang, D., Su, L.-P., Huang, X.-Y., Yu, B.-Q., Zhi, Q.-M., Li, C.-L., Wang, Y.-Q., Tomei, S., Cai, Q., Ji, J., Li, J.-F., Chouchane, L., Yu, Y.-Y., Sun, F.-Z., Xu, Z.-H., Liu, B.-Y., & Zhu, Z.-G. (2015). Epigenetic silencing of microRNA-149 in cancer-associated fibroblasts mediates prostaglandin E2/interleukin-6 signaling in the tumor microenvironment. *Cell Research*, 25(5), 588-603. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.51>
- Li, T., Yang, Y., Hua, X., Wang, G., Liu, W., Jia, C., Tai, Y., Zhang, Q., & Chen, G. (2012). Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO. *Cancer Letters*, 318(2), 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.020>
- Li, T., Yi, S., Liu, W., Jia, C., Wang, G., Hua, X., Tai, Y., Zhang, Q., & Chen, G. (2013). Colorectal carcinoma-derived fibroblasts modulate natural killer cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 30(3), 663. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0663-z>
- Li, Y., Zhang, Q., Yang, J., He, W., Jiang, Y., Chen, Y., & Wang, Y. (2023a). Metformin combined with glucose starvation synergistically suppress triple-negative breast cancer by enhanced unfolded protein response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 675, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.07.029>
- Li, Y., Zhang, Q., Yang, J., He, W., Jiang, Y., Chen, Y., & Wang, Y. (2023b). Metformin combined with glucose starvation synergistically suppress triple-negative breast cancer by enhanced unfolded protein response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 675, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.07.029>
- Li, Z., He, S., & Look, A. T. (2018). The MCL1-specific inhibitor S63845 acts synergistically with venetoclax/ABT-199 to induce apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0201-2>
- Liao, D., Luo, Y., Markowitz, D., Xiang, R., & Reisfeld, R. A. (2009). Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One*, 4(11), Article 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007965>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect : How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N. C., Pal, B., Hart, A. H., Asselin-Labat, M.-L., Gyorki, D. E., Ward, T., Partanen, A., Feleppa, F., Huschtscha, L. I., Thorne, H. J., Fox, S. B., Yan, M., French, J. D., Brown, M. A., Smyth, G. K., Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature Medicine*, 15(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nm.2000>
- Lin, K. H., Xie, A., Rutter, J. C., Ahn, Y.-R., Lloyd-Cowden, J. M., Nichols, A. G., Soderquist, R. S., Koves, T. R., Muoio, D. M., MacIver, N. J., Lamba, J. K., Pardee, T. S., McCall, C. M., Rizzieri, D. A., & Wood, K. C. (2019). Systematic Dissection of the Metabolic-Apoptotic Interface in AML Reveals Heme Biosynthesis to Be a Regulator of Drug Sensitivity. *Cell Metabolism*, 29(5), 1217-1231.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.01.011>
- Lin, X., Morgan-Lappe, S., Huang, X., Li, L., Zakula, D. M., Vernetti, L. A., Fesik, S. W., & Shen, Y. (2007). « Seed » analysis of off-target siRNAs reveals an essential role of Mcl-1 in resistance to the small-molecule Bcl-2/Bcl-XL inhibitor ABT-737. *Oncogene*, 26(27), 3972-3979. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210166>
- Listenberger, L. L., Ory, D. S., & Schaffer, J. E. (2001). Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(18),

- 14890-14895.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M010286200>
- LIU, F., LIU, D., YANG, Y., & ZHAO, S. (2013). Effect of autophagy inhibition on chemotherapy-induced apoptosis in A549 lung cancer cells. *Oncology Letters*, 5(4), 1261-1265. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1154>
- Liu, L., Chen, J., Zhang, J., Ji, C., Zhang, X., Gu, S., Xie, Y., & Mao, Y. (2007). Overexpression of BimSs3, the novel isoform of Bim, can trigger cell apoptosis by inducing cytochrome c release from mitochondria. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 603-610.
- Liu, L., Zhang, Z., Zhou, L., Hu, L., Yin, C., Qing, D., Huang, S., Cai, X., & Chen, Y. (2020). Cancer associated fibroblasts-derived exosomes contribute to radioresistance through promoting colorectal cancer stem cells phenotype. *Experimental Cell Research*, 391(2), 111956. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111956>
- Liu, X.-H., Yu, E. Z., Li, Y.-Y., & Kagan, E. (2006). HIF-1 α has an anti-apoptotic effect in human airway epithelium that is mediated via Mcl-1 gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(4), 755-765. <https://doi.org/10.1002/jcb.20683>
- Liu, Y.-R., Jiang, Y.-Z., Xu, X.-E., Yu, K.-D., Jin, X., Hu, X., Zuo, W.-J., Hao, S., Wu, J., Liu, G.-Y., Di, G.-H., Li, D.-Q., He, X.-H., Hu, W.-G., & Shao, Z.-M. (2016). Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 18, 33. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0690-8>
- Lo, A., Wang, L.-C. S., Scholler, J., Monslow, J., Avery, D., Newick, K., O'Brien, S., Evans, R. A., Bajor, D. J., Clendenin, C., Durham, A. C., Buza, E. L., Vonderheide, R. H., June, C. H., Albelda, S. M., & Puré, E. (2015). Tumor-Promoting Desmoplasia Is Disrupted by Depleting FAP-Expressing Stromal Cells. *Cancer Research*, 75(14), 2800-2810. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3041>
- Locasale, J. W., Grassian, A. R., Melman, T., Lyssiotis, C. A., Mattaini, K. R., Bass, A. J., Heffron, G., Metallo, C. M., Muranen, T., Sharfi, H., Sasaki, A. T., Anastasiou, D., Mullarky, E., Vokes, N. I., Sasaki, M., Beroukhim, R., Stephanopoulos, G., Ligon, A. H., Meyerson, M., ... Vander Heiden, M. G. (2011). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nature Genetics*, 43(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/ng.890>
- Lockshin, R. A. (1969). Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein. *Journal of Insect Physiology*, 15(9), 1505-1516. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(69\)90172-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(69)90172-3)
- Loeffler, M., Krüger, J. A., Niethammer, A. G., & Reisfeld, R. A. (2006). Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1955-1962. <https://doi.org/10.1172/JCI26532>
- Logozzi, M., Mizzoni, D., Angelini, D. F., Di Raimo, R., Falchi, M., Battistini, L., & Fais, S. (2018). Microenvironmental pH and Exosome Levels Interplay in Human Cancer Cell Lines of Different Histotypes. *Cancers*, 10(10), 370. <https://doi.org/10.3390/cancers10100370>
- Logue, S. E., Cleary, P., Saveljeva, S., & Samali, A. (2013). New directions in ER stress-induced cell death. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 18(5), 537-546. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0818-6>
- Lok, S. W., Whittle, J. R., Vaillant, F., Teh, C. E., Lo, L. L., Policheni, A. N., Bergin, A. R. T., Desai, J., Ftouni, S., Gandolfo, L. C., Liew, D., Liu, H. K., Mann, G. B., Moodie, K., Murugasu, A., Pal, B., Roberts, A. W., Rosenthal, M. A., Shackleton, K., ... Lindeman, G. J. (2019). A Phase Ib Dose-Escalation and Expansion Study of the BCL2 Inhibitor Venetoclax Combined with Tamoxifen in ER and BCL2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Cancer Discovery*, 9(3), 354-369. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1151>
- Long, X., Xiong, W., Zeng, X., Qi, L., Cai, Y., Mo, M., Jiang, H., Zhu, B., Chen, Z., & Li, Y. (2019). Cancer-associated fibroblasts promote cisplatin resistance in bladder cancer cells by increasing IGF-1/ER β /Bcl-2 signalling. *Cell Death & Disease*, 10(5), 375. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1581-6>
- Lord, S. R., & Harris, A. L. (2023). Is it still worth pursuing the repurposing of metformin as a cancer therapeutic? *British Journal of Cancer*, 128(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02204-2>
- Lossi, L. (2022). The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. *Biochemical Journal*,

- 479(3), 357-384.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20210854>
- Lotti, F., Jarrar, A. M., Pai, R. K., Hitomi, M., Lathia, J., Mace, A., Gantt, G. A., Sukhdeo, K., DeVecchio, J., Vasanji, A., Leahy, P., Hjelmeland, A. B., Kalady, M. F., & Rich, J. N. (2013). Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(13), Article 13. <https://doi.org/10.1084/jem.20131195>
- Louault, K., Bonneaud, T. L., Séveno, C., Gomez-Bougie, P., Nguyen, F., Gautier, F., Bourgeois, N., Loussouarn, D., Kerdraon, O., Barillé-Nion, S., Jézéquel, P., Campone, M., Amiot, M., Juin, P. P., & Souazé, F. (2019). Interactions between cancer-associated fibroblasts and tumor cells promote MCL-1 dependency in estrogen receptor-positive breast cancers. *Oncogene*, 38(17), Article 17. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0635-z>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lowman, X. H., McDonnell, M. A., Kosloske, A., Odumade, O. A., Jenness, C., Karim, C. B., Jemmerson, R., & Kelekar, A. (2010). The Proapoptotic Function of Noxa in Human Leukemia Cells Is Regulated by the Kinase Cdk5 and by Glucose. *Molecular Cell*, 40(5), 823-833. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.035>
- Lucantoni, F., Salvucci, M., Düssmann, H., Lindner, A. U., Lambrechts, D., & Prehn, J. H. M. (2021). BCL(X)L and BCL2 increase the metabolic fitness of breast cancer cells : A single-cell imaging study. *Cell Death & Differentiation*, 28(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00683-x>
- Lucantoni, F., Salvucci, M., Dussmann, H., & Prehn, J. H. M. (2021). BCL(X)L and BCL2 increase mitochondrial dynamics in breast cancer cell : Evidence from functional and genetic studies. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1868(10), 119095. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119095>
- Luedde, T., Kaplowitz, N., & Schwabe, R. F. (2014). Cell Death and Cell Death Responses in Liver Disease : Mechanisms and Clinical Relevance. *Gastroenterology*, 147(4), 765-783.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.07.018>
- Lukashev, D., Klebanov, B., Kojima, H., Grinberg, A., Ohta, A., Berenfeld, L., Wenger, R. H., Ohta, A., & Sitkovsky, M. (2006). Cutting edge : Hypoxia-inducible factor 1alpha and its activation-inducible short isoform I.1 negatively regulate functions of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(8), 4962-4965. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.4962>
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T., & Thompson, C. B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120(2), 237-248. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.046>
- Lunt, S. Y., & Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic glycolysis : Meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 441-464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
- Luo, L., Zhang, T., Liu, H., Lv, T., Yuan, D., Yao, Y., Lv, Y., & Song, Y. (2012). MiR-101 and Mcl-1 in non-small-cell lung cancer : Expression profile and clinical significance. *Medical Oncology*, 29(3), 1681-1686. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-0085-8>
- Luque-Bolivar, A., Pérez-Mora, E., Villegas, V. E., & Rondón-Lagos, M. (2020). Resistance and Overcoming Resistance in Breast Cancer. *Breast Cancer : Targets and Therapy*, 12, 211-229. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S270799>
- Ma, C., Zheng, K., Jiang, K., Zhao, Q., Sha, N., Wang, W., Yan, M., Chen, T., Zhao, Y., & Jiang, Y. (2021). The alternative activity of nuclear PHGDH contributes to tumour growth under nutrient stress. *Nature Metabolism*, 3(10), 1357-1371. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00456-x>
- Ma, E. H., Bantug, G., Griss, T., Condotta, S., Johnson, R. M., Samborska, B., Mainolfi, N., Suri, V., Guak, H., Balmer, M. L., Verway, M. J., Raissi, T. C., Tsui, H., Boukhaled, G., Henriques da Costa, S., Frezza, C., Krawczyk, C. M., Friedman, A., Manfredi, M., ... Jones, R. G. (2017). Serine Is an Essential Metabolite for Effector T Cell Expansion. *Cell Metabolism*, 25(2), 345-357. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.011>

- Ma, Z., Vocadlo, D. J., & Vosseller, K. (2013). Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-κB activity in pancreatic cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(21), 15121-15130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.470047>
- Madden, E., Logue, S. E., Healy, S. J., Manie, S., & Samali, A. (2019). The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biology of the Cell*, *111*(1), 1-17. <https://doi.org/10.1111/boc.201800050>
- Mahalingaiah, P. K. S., & Singh, K. P. (2014). Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*, *9*(1), e87371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087371>
- Mahendralingam, M. J., Kim, H., McCloskey, C. W., Aliar, K., Casey, A. E., Tharmapalan, P., Pellacani, D., Ignatchenko, V., Garcia-Valero, M., Palomero, L., Sinha, A., Cruickshank, J., Shetty, R., Vellanki, R. N., Koritzinsky, M., Stambolic, V., Alam, M., Schimmer, A. D., Berman, H. K., ... Khokha, R. (2021). Mammary epithelial cells have lineage-rooted metabolic identities. *Nature Metabolism*, *3*(5), 665-681. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00388-6>
- Maiuri, M. C., Criollo, A., Tasmemir, E., Vicencio, J. M., Tajeddine, N., Hickman, J. A., Geneste, O., & Kroemer, G. (2007). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy*, *3*(4), 374-376. <https://doi.org/10.4161/auto.4237>
- Majno, G., Gabbiani, G., Hirschel, B. J., Ryan, G. B., & Statkov, P. R. (1971). Contraction of Granulation Tissue in vitro: Similarity to Smooth Muscle. *Science*, *173*(3996), 548-550. <https://doi.org/10.1126/science.173.3996.548>
- Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, *10*(10), 955-960. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879>
- Malyukova, A., Ujvari, D., Yektaei-Karin, E., Zovko, A., Madapura, H. S., Keszei, M., Nagy, N., Lotfi, K., Björn, N., Wallvik, J., Tamai, M., Nguyen, T. T. T., Akahane, K., Inukai, T., Stenke, L., & Salamon, D. (2021). Combination of tyrosine kinase inhibitors and the MCL1 inhibitor S63845 exerts synergistic antitumorigenic effects on CML cells. *Cell Death & Disease*, *12*(10), 875. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04154-0>
- Marcel, V., Dichtel-Danjoy, M.-L., Sagne, C., Hafsi, H., Ma, D., Ortiz-Cuaran, S., Olivier, M., Hall, J., Mollereau, B., Hainaut, P., & Bourdon, J.-C. (2011). Biological functions of p53 isoforms through evolution: Lessons from animal and cellular models. *Cell Death and Differentiation*, *18*(12), 1815-1824. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.120>
- Marcucci, F., & Rumio, C. (2021). Glycolysis-induced drug resistance in tumors-A response to danger signals? *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *23*(2), 234-245. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.12.009>
- Mardis, E. R., Ding, L., Dooling, D. J., Larson, D. E., McLellan, M. D., Chen, K., Koboldt, D. C., Fulton, R. S., Delehaunty, K. D., McGrath, S. D., Fulton, L. A., Locke, D. P., Magrini, V. J., Abbott, R. M., Vickery, T. L., Reed, J. S., Robinson, J. S., Wylie, T., Smith, S. M., ... Ley, T. J. (2009). Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *The New England Journal of Medicine*, *361*(11), 1058-1066. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0903840>
- Martinez-Outschoorn, U. E., Lin, Z., Trimmer, C., Flomenberg, N., Wang, C., Pavlides, S., Pestell, R. G., Howell, A., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2011). Cancer cells metabolically « fertilize » the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: Implications for PET imaging of human tumors. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *10*(15), Article 15. <https://doi.org/10.4161/cc.10.15.16585>
- Martínez-Reyes, I., Diebold, L. P., Kong, H., Schieber, M., Huang, H., Hensley, C. T., Mehta, M. M., Wang, T., Santos, J. H., Woychik, R., Dufour, E., Spelbrink, J. N., Weinberg, S. E., Zhao, Y., DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions. *Molecular Cell*, *61*(2), 199-209. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.002>
- Martínez-Zaguilán, R., Seftor, E. A., Seftor, R. E., Chu, Y. W., Gillies, R. J., & Hendrix, M. J. (1996). Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, *14*(2), 176-186. <https://doi.org/10.1007/BF00121214>
- Marusyk, A., Tabassum, D. P., Janiszewska, M., Place, A. E., Trinh, A., Rozhok, A. I., Pyne, S.,

- Guerriero, J. L., Shu, S., Ekram, M., Ishkin, A., Cahill, D. P., Nikolsky, Y., Chan, T. A., Rimawi, M. F., Hilsenbeck, S., Schiff, R., Osborne, K. C., Letai, A., & Polyak, K. (2016). Spatial Proximity to Fibroblasts Impacts Molecular Features and Therapeutic Sensitivity of Breast Cancer Cells Influencing Clinical Outcomes. *Cancer Research*, *76*(22), Article 22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1457>
- Mason, K. D., Carpinelli, M. R., Fletcher, J. I., Collinge, J. E., Hilton, A. A., Ellis, S., Kelly, P. N., Ekert, P. G., Metcalf, D., Roberts, A. W., Huang, D. C. S., & Kile, B. T. (2007). Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*, *128*(6), 1173-1186. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.037>
- Matsumoto, H., Miyazaki, S., Matsuyama, S., Takeda, M., Kawano, M., Nakagawa, H., Nishimura, K., & Matsuo, S. (2013). Selection of autophagy or apoptosis in cells exposed to ER-stress depends on ATF4 expression pattern with or without CHOP expression. *Biology Open*, *2*(10), 1084-1090. <https://doi.org/10.1242/bio.20135033>
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A. S., DeJardin, E., & Green, D. R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Molecular Cell*, *21*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.02.009>
- Maximchik, P., Abdrakhmanov, A., Inozemtseva, E., Tyurin-Kuzmin, P. A., Zhivotovsky, B., & Gogvadze, V. (2018). 2-Deoxy-D-glucose has distinct and cell line-specific effects on the survival of different cancer cells upon antitumor drug treatment. *The FEBS Journal*, *285*(24), 4590-4601. <https://doi.org/10.1111/febs.14687>
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., & Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, *399*(6733), 271-275. <https://doi.org/10.1038/20459>
- Mayers, J. R., & Vander Heiden, M. G. (2017). Nature and Nurture: What Determines Tumor Metabolic Phenotypes? *Cancer Research*, *77*(12), 3131-3134. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0165>
- Mazumder, S., Choudhary, G. S., Al-harbi, S., & Almasan, A. (2012). Mcl-1 Phosphorylation Defines ABT-737 Resistance That Can Be Overcome by Increased NOXA Expression in Leukemic B cells. *Cancer Research*, *72*(12), 3069-3079. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4106>
- McAndrews, K. M., Chen, Y., Darpolor, J. K., Zheng, X., Yang, S., Carstens, J. L., Li, B., Wang, H., Miyake, T., de Sampaio, P. C., Kirtley, M. L., Natale, M., Wu, C.-C., Sugimoto, H., LeBleu, V. S., & Kalluri, R. (2022). Identification of Functional Heterogeneity of Carcinoma-Associated Fibroblasts with Distinct IL-6 Mediated Therapy Resistance in Pancreatic Cancer. *Cancer discovery*, *12*(6), 1580-1597. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1484>
- McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y., & Holbrook, N. J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(4), 1249-1259. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001>
- McDonald, L. T., Mehrotra, M., & LaRue, A. C. (2015). Hematopoietic Origin of Murine Lung Fibroblasts. *Stem Cells International*, *2015*, 159713. <https://doi.org/10.1155/2015/159713>
- McGuirk, S., Audet-Delage, Y., Annis, M. G., Xue, Y., Vernier, M., Zhao, K., St-Louis, C., Minarrieta, L., Patten, D. A., Morin, G., Greenwood, C. M., Giguère, V., Huang, S., Siegel, P. M., & St-Pierre, J. (s. d.). Resistance to different anthracycline chemotherapeutics elicits distinct and actionable primary metabolic dependencies in breast cancer. *eLife*, *10*, e65150. <https://doi.org/10.7554/eLife.65150>
- Mcllwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(4), a008656-a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
- Mei, Y., Du, W., Yang, Y., & Wu, M. (2005). Puma(*)Mcl-1 interaction is not sufficient to prevent rapid degradation of Mcl-1. *Oncogene*, *24*(48), 7224-7237. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208873>
- Meijer, C., Mulder, N. H., Timmer-Bosscha, H., Sluiter, W. J., Meersma, G. J., & de Vries, E. G. (1992). Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Research*, *52*(24), 6885-6889.

- Meijerink, J. P., Mensink, E. J., Wang, K., Sedlak, T. W., Slöetjes, A. W., de Witte, T., Waksman, G., & Korsmeyer, S. J. (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood*, *91*(8), 2991-2997.
- Menendez, J. A., Oliveras-Ferraros, C., Cufí, S., Corominas-Faja, B., Joven, J., Martín-Castillo, B., & Vazquez-Martin, A. (2012). Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells. *Cell Cycle*, *11*(15), 2782-2792. <https://doi.org/10.4161/cc.20948>
- Merino, D., Lok, S. W., Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2016). Targeting BCL-2 to enhance vulnerability to therapy in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*, *35*(15), Article 15. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.287>
- Merino, D., Whittle, J. R., Vaillant, F., Serrano, A., Gong, J.-N., Giner, G., Maragno, A. L., Chanrion, M., Schneider, E., Pal, B., Li, X., Dewson, G., Gräsel, J., Liu, K., Lalaoui, N., Segal, D., Herold, M. J., Huang, D. C. S., Smyth, G. K., ... Lindeman, G. J. (2017). Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer. *Science Translational Medicine*, *9*(401), Article 401. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam7049>
- Mertens, J. C., Fingas, C. D., Christensen, J. D., Smoot, R. L., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Gustafson, M. P., Dietz, A. B., Roberts, L. R., Sirica, A. E., & Gores, G. J. (2013). Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Cancer Research*, *73*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2130>
- Meynet, O., Bénétteau, M., Jacquin, M. A., Pradelli, L. A., Cornille, A., Carles, M., & Ricci, J.-E. (2012). Glycolysis inhibition targets Mcl-1 to restore sensitivity of lymphoma cells to ABT-737-induced apoptosis. *Leukemia*, *26*(5), 1145-1147. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.327>
- Michalek, R. D., Gerriets, V. A., Jacobs, S. R., Macintyre, A. N., MacIver, N. J., Mason, E. F., Sullivan, S. A., Nichols, A. G., & Rathmell, J. C. (2011). Cutting edge : Distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *186*(6), 3299-3303. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003613>
- Miller, D. K. (1999). Activation of Apoptosis and Its Inhibition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *886*(1 ANTICANCER MO), 132-157. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09408.x>
- Miller, T. W. (2012). Initiating breast cancer by PIK3CA mutation. *Breast Cancer Research*, *14*(1), 301. <https://doi.org/10.1186/bcr3103>
- Mills, K. R., Reginato, M., Debnath, J., Queenan, B., & Brugge, J. S. (2004). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(10), 3438-3443. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400443101>
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., & Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, *9*(6), 1799-1805.
- Moasser, M. M. (2007). The oncogene HER2 : Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, *26*(45), 6469-6487. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477>
- Moatassim-Billah, S., Duluc, C., Samain, R., Jean, C., Perraud, A., Decaup, E., Cassant-Sourdy, S., Bakri, Y., Selves, J., Schmid, H., Martineau, Y., Mathonnet, M., Pyronnet, S., & Bousquet, C. (2016). Anti-metastatic potential of somatostatin analog SOM230 : Indirect pharmacological targeting of pancreatic cancer-associated fibroblasts. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9296>
- Moloughney, J. G., Vega-Cotto, N. M., Liu, S., Patel, C., Kim, P. K., Wu, C.-C., Albaciete, D., Magaway, C., Chang, A., Rajput, S., Su, X., Werlen, G., & Jacinto, E. (2018). mTORC2 modulates the amplitude and duration of GFAT1 Ser-243 phosphorylation to maintain flux through the hexosamine pathway during starvation. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(42), 16464-16478. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003991>
- Monni, O., Joensuu, H., Franssila, K., Klefstrom, J., Alitalo, K., & Knuutila, S. (1997). BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, *90*(3), 1168-1174.
- Montero, J., Gstalder, C., Kim, D. J., Sadowicz, D., Miles, W., Manos, M., Cidado, J. R., Paul Secrist, J., Tron, A. E., Flaherty, K., Stephen Hodi, F., Yoon, C. H., Letai, A., Fisher, D. E., & Haq, R. (2019). Destabilization of NOXA mRNA as a common resistance mechanism

- to targeted therapies. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12477-y>
- Montrose, D. C., Saha, S., Foronda, M., McNally, E. M., Chen, J., Zhou, X. K., Ha, T., Krumsiek, J., Buyukozkan, M., Verma, A., Elemento, O., Yantiss, R. K., Chen, Q., Gross, S. S., Galluzzi, L., Dow, L. E., & Dannenberg, A. J. (2021). Exogenous and Endogenous Sources of Serine Contribute to Colon Cancer Metabolism, Growth, and Resistance to 5-Fluorouracil. *Cancer Research*, 81(9), 2275-2288. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-1541>
- Morita, M., Gravel, S.-P., Chénard, V., Sikström, K., Zheng, L., Alain, T., Gandin, V., Avizonis, D., Arguello, M., Zakaria, C., McLaughlan, S., Nouet, Y., Pause, A., Pollak, M., Gottlieb, E., Larsson, O., St-Pierre, J., Topisirovic, I., & Sonenberg, N. (2013). mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metabolism*, 18(5), 698-711. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.001>
- Mott, J. L., Kobayashi, S., Bronk, S. F., & Gores, G. J. (2007). Mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*, 26(42), Article 42. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210436>
- Mou, S., Wang, Q., Shi, B., Gu, L., & Ni, Z. (2009). Hepatocyte growth factor suppresses transforming growth factor-beta-1 and type III collagen in human primary renal fibroblasts. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 25(11), 577-587. [https://doi.org/10.1016/S1607-551X\(09\)70560-1](https://doi.org/10.1016/S1607-551X(09)70560-1)
- Moumen, M., Chiche, A., Cagnet, S., Petit, V., Raymond, K., Faraldo, M. M., Deugnier, M.-A., & Glukhova, M. A. (2011). The mammary myoepithelial cell. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(7-9), 763-771. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113385mm>
- Mrazek, A. A., Carmical, J. R., Wood, T. G., Hellmich, M. R., Eltorky, M., Bohanon, F. J., & Chao, C. (2014). Colorectal Cancer-Associated Fibroblasts are Genotypically Distinct. *Current Cancer Therapy Reviews*, 10(2), 97-218. <https://doi.org/10.2174/15733947100214124123103>
- Mu, X., Shi, W., Xu, Y., Xu, C., Zhao, T., Geng, B., Yang, J., Pan, J., Hu, S., Zhang, C., Zhang, J., Wang, C., Shen, J., Che, Y., Liu, Z., Lv, Y., Wen, H., & You, Q. (2018). Tumor-derived lactate induces M2 macrophage polarization via the activation of the ERK/STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 17(4), 428-438. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1444305>
- Muhl, L., Genové, G., Leptidis, S., Liu, J., He, L., Mocci, G., Sun, Y., Gustafsson, S., Buyandelger, B., Chivukula, I. V., Segerstolpe, Å., Raschperger, E., Hansson, E. M., Björkegren, J. L. M., Peng, X.-R., Vanlandewijck, M., Lendahl, U., & Betsholtz, C. (2020). Single-cell analysis uncovers fibroblast heterogeneity and criteria for fibroblast and mural cell identification and discrimination. *Nature Communications*, 11(1), 3953. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17740-1>
- Mukherjee, N., Skees, J., Todd, K. J., West, D. A., Lambert, K. A., Robinson, W. A., Amato, C. M., Coutts, K. L., Van Gulick, R., MacBeth, M., Nassar, K., Tan, A.-C., Zhai, Z., Fujita, M., Bagby, S. M., Dart, C. R., Lambert, J. R., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. (2020). MCL1 inhibitors S63845/MIK665 plus Navitoclax synergistically kill difficult-to-treat melanoma cells. *Cell Death & Disease*, 11(6), 443. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2646-2>
- Mukhopadhyay, S., Goswami, D., Adishesaiah, P. P., Burgan, W., Yi, M., Guerin, T. M., Kozlov, S. V., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2020). Undermining Glutaminolysis Bolsters Chemotherapy While NRF2 Promotes Chemoresistance in KRAS-Driven Pancreatic Cancers. *Cancer Research*, 80(8), 1630-1643. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1363>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1), 1-13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Musgrove, E. A., & Sutherland, R. L. (2009). Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 9(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrc2713>
- Myers, M. P., Pass, I., Batty, I. H., Van der Kaay, J., Stolarov, J. P., Hemmings, B. A., Wigler, M. H., Downes, C. P., & Tonks, N. K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13513-13518. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13513>
- Nakajima, Y., & Kuranaga, E. (2017). Caspase-dependent non-apoptotic processes in

- development. *Cell Death & Differentiation*, 24(8), 1422-1430. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.36>
- Nedeljković, M., & Damjanović, A. (2019). Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells*, 8(9), 957. <https://doi.org/10.3390/cells8090957>
- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Ragulan, C., Cros, J., Patil, Y., Martinet, M., Erkan, M., Kleeff, J., Wilson, J., Apte, M., Tosolini, M., Wilson, A. S., Delvecchio, F. R., Bousquet, C., Paradis, V., Hammel, P., Sadanandam, A., & Kocher, H. M. (2019). Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *The Journal of Pathology*, 248(1), 51-65. <https://doi.org/10.1002/path.5224>
- Ngoi, N. Y. L., Eu, J. Q., Hirpara, J., Wang, L., Lim, J. S. J., Lee, S.-C., Lim, Y.-C., Pervaiz, S., Goh, B. C., & Wong, A. L. A. (2020). Targeting Cell Metabolism as Cancer Therapy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(5), 285-308. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7947>
- Nicholson, D. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 6(11), 1028-1042. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400598>
- Nielsen, S. R., Quaranta, V., Linford, A., Emeagi, P., Rainer, C., Santos, A., Ireland, L., Sakai, T., Sakai, K., Kim, Y.-S., Engle, D., Campbell, F., Palmer, D., Ko, J. H., Tuveson, D. A., Hirsch, E., Mielgo, A., & Schmid, M. C. (2016). Macrophage-secreted granulins supports pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis. *Nature Cell Biology*, 18(5), 549-560. <https://doi.org/10.1038/ncb3340>
- Nii, T., Prabhu, V. V., Ruvolo, V., Madhukar, N., Zhao, R., Mu, H., Heese, L., Nishida, Y., Kojima, K., Garnett, M. J., McDermott, U., Benes, C. H., Charter, N., Deacon, S., Elemento, O., Allen, J. E., Oster, W., Stogniew, M., Ishizawa, J., & Andreeff, M. (2019). Imipridone ONC212 activates orphan G protein-coupled receptor GPR132 and integrated stress response in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 33(12), 2805-2816. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0491-z>
- Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F., & Wang, X. (2003). Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes & Development*, 17(12), Article 12. <https://doi.org/10.1101/gad.1093903>
- Nita, M., & Grzybowski, A. (2016). The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, e3164734. <https://doi.org/10.1155/2016/3164734>
- Nocquet, L., Juin, P. P., & Souazé, F. (2020). Mitochondria at Center of Exchanges between Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts during Tumor Progression. *Cancers*, 12(10), 3017. <https://doi.org/10.3390/cancers12103017>
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)*, 194(4260), 23-28. <https://doi.org/10.1126/science.959840>
- Oakes, S. R., Vaillant, F., Lim, E., Lee, L., Breslin, K., Feleppa, F., Deb, S., Ritchie, M. E., Takano, E., Ward, T., Fox, S. B., Generali, D., Smyth, G. K., Strasser, A., Huang, D. C. S., Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2012). Sensitization of BCL-2-expressing breast tumors to chemotherapy by the BH3 mimetic ABT-737. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), Article 8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104778108>
- Obrist, F., Michels, J., Durand, S., Chery, A., Pol, J., Levesque, S., Joseph, A., Astesana, V., Pietrocola, F., Wu, G. S., Castedo, M., & Kroemer, G. (2018). Metabolic vulnerability of cisplatin-resistant cancers. *The EMBO Journal*, 37(14), e98597. <https://doi.org/10.15252/emboj.201798597>
- Ocana, A., Nieto-Jiménez, C., Pandiella, A., & Templeton, A. J. (2017). Neutrophils in cancer: Prognostic role and therapeutic strategies. *Molecular Cancer*, 16(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0707-7>
- Öhlund, D., Handly-Santana, A., Biffi, G., Elyada, E., Almeida, A. S., Ponz-Sarvisé, M., Corbo, V., Oni, T. E., Hearn, S. A., Lee, E. J., Chio, I. I. C., Hwang, C.-I., Tiriaci, H., Baker, L. A., Engle, D. D., Feig, C., Kultti, A., Egeblad, M., Fearon, D. T., ... Tuveson, D. A. (2017). Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(3), 579-596. <https://doi.org/10.1084/jem.20162024>
- Olopade, O. I., Adeyanju, M. O., Safa, A. R., Hagos, F., Mick, R., Thompson, C. B., & Recant, W. M. (1997). Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high

- tumor grade and nodal metastases. *The Cancer Journal from Scientific American*, 3(4), 230-237.
- Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., Bruncko, M., Deckwerth, T. L., Dinges, J., Hajduk, P. J., Joseph, M. K., Kitada, S., Korsmeyer, S. J., Kunzer, A. R., Letai, A., Li, C., Mitten, M. J., Nettekheim, D. G., Ng, S., ... Rosenberg, S. H. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 435(7042), 677-681. <https://doi.org/10.1038/nature03579>
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74(4), 609-619. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90509-o](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90509-o)
- O'Mahony, F., Razandi, M., Pedram, A., Harvey, B. J., & Levin, E. R. (2012). Estrogen Modulates Metabolic Pathway Adaptation to Available Glucose in Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, 26(12), 2058-2070. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1191>
- Ooi, A., Wong, J.-C., Petillo, D., Roossien, D., Perrier-Trudova, V., Whitten, D., Min, B. W. H., Tan, M.-H., Zhang, Z., Yang, X. J., Zhou, M., Gardie, B., Molinié, V., Richard, S., Tan, P. H., Teh, B. T., & Furge, K. A. (2011). An antioxidant response phenotype shared between hereditary and sporadic type 2 papillary renal cell carcinoma. *Cancer Cell*, 20(4), 511-523. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.024>
- Opferman, J. T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M. D., Ong, C. C., & Korsmeyer, S. J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*, 426(6967), Article 6967. <https://doi.org/10.1038/nature02067>
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., & Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121(3), 335-348. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.034>
- Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., & Ramírez-Valdespino, C. A. (2022). Subtypes of Breast Cancer. In H. N. Mayrovitz (Ed.), *Breast Cancer*. Exon Publications. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583808/>
- Oshima, N., Ishida, R., Kishimoto, S., Beebe, K., Brender, J. R., Yamamoto, K., Urban, D., Rai, G., Johnson, M. S., Benavides, G., Squadrito, G. L., Crooks, D., Jackson, J., Joshi, A., Mott, B. T., Shrimp, J. H., Moses, M. A., Lee, M.-J., Yuno, A., ... Neckers, L. M. (2020). Dynamic Imaging of LDH Inhibition in Tumors Reveals Rapid In Vivo Metabolic Rewiring and Vulnerability to Combination Therapy. *Cell Reports*, 30(6), 1798-1810.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.039>
- Osuala, K. O., Sameni, M., Shah, S., Aggarwal, N., Simonait, M. L., Franco, O. E., Hong, Y., Hayward, S. W., Behbod, F., Mattingly, R. R., & Sloane, B. F. (2015). Il-6 signaling between ductal carcinoma in situ cells and carcinoma-associated fibroblasts mediates tumor cell growth and migration. *BMC Cancer*, 15, 584. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1576-3>
- Owen, O. E., Kalhan, S. C., & Hanson, R. W. (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30409-30412. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200006200>
- Özdemir, B. C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J. L., Zheng, X., Wu, C.-C., Simpson, T., Laklai, H., Sugimoto, H., Kahlert, C., Novitskiy, S. V., Acosta, A. D., Sharma, P., Heidari, P., Mahmood, U., Chin, L., Moses, H., Weaver, V., Maitra, A., Allison, J. P., ... Kalluri, R. (2014). Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Diminished Survival. *Cancer cell*, 25(6), 719-734. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.005>
- Özören, N., & El-Deiry, W. S. (2002). Defining Characteristics of Types I and II Apoptotic Cells in Response to TRAIL. *Neoplasia*, 4(6), 551-557. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900270>
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Lujic, M., Samali, A., & Gorman, A. M. (2016). The integrated stress response. *EMBO reports*, 17(10), Article 10. <https://doi.org/10.15252/embr.201642195>
- Pang, T., Yin, X., Luo, T., Lu, Z., Nie, M., Yin, K., & Xue, X. (2020). Cancer-associated fibroblasts promote malignancy of gastric cancer cells via Nodal signalling. *Cell Biochemistry and Function*, 38(1), 4-11. <https://doi.org/10.1002/cbf.3446>
- Panopoulos, A. D., Yanes, O., Ruiz, S., Kida, Y. S., Diep, D., Tautenhahn, R., Herrerías, A., Batchelder, E. M., Plongthongkum, N., Lutz, M.,

- Berggren, W. T., Zhang, K., Evans, R. M., Siuzdak, G., & Izpisua Belmonte, J. C. (2012). The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Research*, 22(1), 168-177. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.177>
- Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L., & Denko, N. C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism*, 3(3), 187-197. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.012>
- Park, J. H., Vithayathil, S., Kumar, S., Sung, P.-L., Dobrolecki, L. E., Putluri, V., Bhat, V. B., Bhowmik, S. K., Gupta, V., Arora, K., Wu, D., Tsouko, E., Zhang, Y., Maity, S., Donti, T. R., Graham, B. H., Frigo, D. E., Coarfa, C., Yotnda, P., ... Kaiparettu, B. A. (2016). Fatty Acid Oxidation-Driven Src Links Mitochondrial Energy Reprogramming and Oncogenic Properties in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Reports*, 14(9), Article 9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.004>
- Park, Y. P., Choi, S.-C., Kiesler, P., Gil-Krzewska, A., Borrego, F., Weck, J., Krzewski, K., & Coligan, J. E. (2011). Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: Opposing roles of the γ c cytokines and TGF- β 1. *Blood*, 118(11), 3019-3027. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-346825>
- Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C. U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J. F., Stijleman, I. J., Palazzo, J., Marron, J. S., Nobel, A. B., Mardis, E., Nielsen, T. O., Ellis, M. J., Perou, C. M., & Bernard, P. S. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(8), 1160-1167. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.1370>
- Pastò, A., Bellio, C., Pilotto, G., Ciminale, V., Silic-Benussi, M., Guzzo, G., Rasola, A., Frasson, C., Nardo, G., Zulato, E., Nicoletto, M. O., Manicone, M., Indraccolo, S., & Amadori, A. (2014). Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation. *Oncotarget*, 5(12), Article 12. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2010>
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., & Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), 927-939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002>
- Pavlidis, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Frank, P. G., Casimiro, M. C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., Pestell, R. G., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2009a). The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(23), Article 23. <https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10238>
- Pavlidis, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Frank, P. G., Casimiro, M. C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., Pestell, R. G., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2009b). The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(23), Article 23. <https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10238>
- Peairs, K. S., Barone, B. B., Snyder, C. F., Yeh, H.-C., Stein, K. B., Derr, R. L., Brancati, F. L., & Wolff, A. C. (2011). Diabetes mellitus and breast cancer outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(1), 40-46. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.3011>
- Pécot, J., Maillet, L., Le Pen, J., Vuillier, C., Trécesson, S. de C., Fétiveau, A., Sarosiek, K. A., Bock, F. J., Braun, F., Letai, A., Tait, S. W. G., Gautier, F., & Juin, P. P. (2016). Tight Sequestration of BH3 Proteins by BCL-xL at Subcellular Membranes Contributes to Apoptotic Resistance. *Cell Reports*, 17(12), 3347-3358. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.064>
- Pelicano, H., Carney, D., & Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2004.01.004>
- Pelicano, H., Zhang, W., Liu, J., Hammoudi, N., Dai, J., Xu, R.-H., Pusztai, L., & Huang, P. (2014). Mitochondrial dysfunction in some triple-negative breast cancer cell lines: Role of mTOR pathway and therapeutic potential. *Breast Cancer Research: BCR*, 16(5), 434. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0434-6>
- Pelon, F., Bourachot, B., Kieffer, Y., Magagna, I., Mermet-Meillon, F., Bonnet, I., Costa, A., Givel, A.-M., Attieh, Y., Barbazan, J.,

- Bonneau, C., Fuhrmann, L., Descroix, S., Vignjevic, D., Silberzan, P., Parrini, M. C., Vincent-Salomon, A., & Mechta-Grigoriou, F. (2020). Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms. *Nature Communications*, 11(1), 404. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14134-w>
- Perciavalle, R. M., Stewart, D. P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M. M., Pelletier, S., Schuetz, J. D., Youle, R. J., Green, D. R., & Opferman, J. T. (2012). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nature Cell Biology*, 14(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/ncb2488>
- Peterson, T. R., Sengupta, S. S., Harris, T. E., Carmack, A. E., Kang, S. A., Balderas, E., Guertin, D. A., Madden, K. L., Carpenter, A. E., Finck, B. N., & Sabatini, D. M. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*, 146(3), 408-420. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.034>
- Petrocca, F., Altschuler, G., Tan, S. M., Mendillo, M. L., Yan, H., Jerry, D. J., Kung, A. L., Hide, W., Ince, T. A., & Lieberman, J. (2013). A genome-wide siRNA screen identifies proteasome addiction as a vulnerability of basal-like triple-negative breast cancer cells. *Cancer Cell*, 24(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.07.008>
- Pettus, B. J., Chalfant, C. E., & Hannun, Y. A. (2002). Ceramide in apoptosis: An overview and current perspectives. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1585(2-3), 114-125. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(02\)00331-1](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(02)00331-1)
- Pezzella, F., Turley, H., Kuzu, I., Tungekar, M. F., Dunnill, M. S., Pierce, C. B., Harris, A., Gatter, K. C., & Mason, D. Y. (1993). Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 329(10), Article 10. <https://doi.org/10.1056/NEJM199309023291003>
- Pfeffer, C., & Singh, A. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 448. <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>
- Philippeos, C., Telerman, S. B., Oulès, B., Pisco, A. O., Shaw, T. J., Elgueta, R., Lombardi, G., Driskell, R. R., Soldin, M., Lynch, M. D., & Watt, F. M. (2018). Spatial and Single-Cell Transcriptional Profiling Identifies Functionally Distinct Human Dermal Fibroblast Subpopulations. *The Journal of Investigative Dermatology*, 138(4), 811-825. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.01.016>
- Piersma, B., Hayward, M.-K., & Weaver, V. M. (2020). Fibrosis and cancer: A strained relationship. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1873(2), 188356. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188356>
- Pilotto Heming, C., Muriithi, W., Wanjiku Macharia, L., Niemeyer Filho, P., Moura-Neto, V., & Aran, V. (2022). P-glycoprotein and cancer: What do we currently know? *Heliyon*, 8(10), e11171. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11171>
- Pinton, P., & Rizzuto, R. (2006). Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death & Differentiation*, 13(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401960>
- Poillet-Perez, L., & White, E. (2019). Role of tumor and host autophagy in cancer metabolism. *Genes & Development*, 33(11-12), 610-619. <https://doi.org/10.1101/gad.325514.119>
- Polyak, K. (2007). Breast cancer: Origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(11), 3155. <https://doi.org/10.1172/JCI33295>
- Polyak, K. (2011). Heterogeneity in breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3786. <https://doi.org/10.1172/JCI60534>
- Polyak, K., & Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: Acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 265-273. <https://doi.org/10.1038/nrc2620>
- Popgeorgiev, N., Jabbour, L., & Gillet, G. (2018). Subcellular Localization and Dynamics of the Bcl-2 Family of Proteins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00013>
- Porporato, P. E., Payen, V. L., Pérez-Escuredo, J., De Saedeleer, C. J., Danhier, P., Copetti, T., Dhup, S., Tardy, M., Vazeille, T., Bouzin, C., Feron, O., Michiels, C., Gallez, B., & Sonveaux, P. (2014). A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Reports*, 8(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.043>
- Possemato, R., Marks, K. M., Shaul, Y. D., Pacold, M. E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.-K., Jang, H. G., Jha, A. K., Chen, W. W., Barrett, F. G., Stransky, N., Tsun, Z.-Y., Cowley, G. S., Barretina, J., Kalaany, N. Y., Hsu, P. P., Ottina, K., ... Sabatini, D. M.

- (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*, 476(7360), 346-350. <https://doi.org/10.1038/nature10350>
- Pradelli, L. A., Bénétteau, M., Chauvin, C., Jacquin, M. A., Marchetti, S., Muñoz-Pinedo, C., Auberger, P., Pende, M., & Ricci, J.-E. (2010). Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation. *Oncogene*, 29(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.448>
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X., & Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 12(5), R68. <https://doi.org/10.1186/bcr2635>
- Prew, M. S., Adhikary, U., Choi, D. W., Portero, E. P., Paulo, J. A., Gowda, P., Budhraj, A., Opferman, J. T., Gygi, S. P., Danial, N. N., & Walensky, L. D. (2022). MCL-1 is a master regulator of cancer dependency on fatty acid oxidation. *Cell Reports*, 41(1), 111445. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111445>
- Prihantono, & Faruk, M. (2021). Breast cancer resistance to chemotherapy : When should we suspect it and how can we prevent it? *Annals of Medicine and Surgery*, 70, 102793. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102793>
- Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., Hughes, P. D., Michalak, E. M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P., & Strasser, A. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 129(7), 1337-1349. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.027>
- Puthier, D., Bataille, R., & Amiot, M. (1999). IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *European Journal of Immunology*, 29(12), 3945-3950. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199912\)29:12<3945::AID-IMMU3945>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199912)29:12<3945::AID-IMMU3945>3.0.CO;2-O)
- Qian, X., Li, X., Shi, Z., Xia, Y., Cai, Q., Xu, D., Tan, L., Du, L., Zheng, Y., Zhao, D., Zhang, C., Lorenzi, P. L., You, Y., Jiang, B.-H., Jiang, T., Li, H., & Lu, Z. (2019). PTEN Suppresses Glycolysis by Dephosphorylating and Inhibiting Autophosphorylated PGK1. *Molecular Cell*, 76(3), 516-527.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.006>
- Qiao, A., Gu, F., Guo, X., Zhang, X., & Fu, L. (2016). Breast cancer-associated fibroblasts : Their roles in tumor initiation, progression and clinical applications. *Frontiers of Medicine*, 10(1), 33-40. <https://doi.org/10.1007/s11684-016-0431-5>
- Qie, S., Yoshida, A., Parnham, S., Oleinik, N., Beeson, G. C., Beeson, C. C., Ogretmen, B., Bass, A. J., Wong, K.-K., Rustgi, A. K., & Diehl, J. A. (2019). Targeting glutamine-addiction and overcoming CDK4/6 inhibitor resistance in human esophageal squamous cell carcinoma. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09179-w>
- Qin, X., Yan, M., Wang, X., Xu, Q., Wang, X., Zhu, X., Shi, J., Li, Z., Zhang, J., & Chen, W. (2018). Cancer-associated Fibroblast-derived IL-6 Promotes Head and Neck Cancer Progression via the Osteopontin-NF-kappa B Signaling Pathway. *Theranostics*, 8(4), 921-940. <https://doi.org/10.7150/thno.22182>
- Qing, G., Li, B., Vu, A., Skuli, N., Walton, Z. E., Liu, X., Mayes, P. A., Wise, D. R., Thompson, C. B., Maris, J. M., Hogarty, M. D., & Simon, M. C. (2012). ATF4 Regulates MYC-mediated Neuroblastoma Cell Death upon Glutamine Deprivation. *Cancer cell*, 22(5), 631-644. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.021>
- Quante, M., Tu, S. P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S. S. W., Takashi, S., Baik, G. H., Shibata, W., Diprete, B., Betz, K. S., Friedman, R., Varro, A., Tycko, B., & Wang, T. C. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*, 19(2), 257-272. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.020>
- Quek, L.-E., van Geldermalsen, M., Guan, Y. F., Wahi, K., Mayoh, C., Balaban, S., Pang, A., Wang, Q., Cowley, M. J., Brown, K. K., Turner, N., Hoy, A. J., & Holst, J. (2022). Glutamine addiction promotes glucose oxidation in triple-negative breast cancer. *Oncogene*, 41(34), 4066-4078. <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02408-5>
- R Core Team. (2021). *R: The R Project for Statistical Computing*. <https://www.r-project.org/>
- Rajan, A. M., & Kumar, S. (2016). New investigational drugs with single-agent activity in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, 6(7), e451. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.53>

- Rajkumar, V. S., Howell, K., Csiszar, K., Denton, C. P., Black, C. M., & Abraham, D. J. (2005). Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Research & Therapy*, 7(5), R1113-1123. <https://doi.org/10.1186/ar1790>
- Rajkumar, V. S., Shiwen, X., Bostrom, M., Leoni, P., Muddle, J., Ivarsson, M., Gerdin, B., Denton, C. P., Bou-Gharios, G., Black, C. M., & Abraham, D. J. (2006). Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing. *The American Journal of Pathology*, 169(6), 2254-2265. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060196>
- Ralph, A. C. L., Valadão, I. C., Cardoso, E. C., Martins, V. R., Oliveira, L. M. S., Bevilacqua, E. M. A. F., Geraldo, M. V., Jaeger, R. G., Goldberg, G. S., & Freitas, V. M. (2020). Environmental control of mammary carcinoma cell expansion by acidification and spheroid formation in vitro. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78989-6>
- Ramírez-Peinado, S., Alcázar-Limones, F., Lagares-Tena, L., El Mjiyad, N., Caro-Maldonado, A., Tirado, O. M., & Muñoz-Pinedo, C. (2011). 2-deoxyglucose induces Noxa-dependent apoptosis in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Research*, 71(21), 6796-6806. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0759>
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., & Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5302), Article 5302.
- Rampioni Vinciguerra, G. L., Sonogo, M., Segatto, I., Dall'Acqua, A., Vecchione, A., Baldassarre, G., & Belletti, B. (2022). CDK4/6 Inhibitors in Combination Therapies : Better in Company Than Alone: A Mini Review. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.891580>
- Raphael, J., Lefebvre, C., Allan, A., Helou, J., Boldt, G., Vandenberg, T., & Blanchette, P. S. (2020). Everolimus in Advanced Breast Cancer : A Systematic Review and Meta-analysis. *Targeted Oncology*, 15(6), 723-732. <https://doi.org/10.1007/s11523-020-00770-6>
- Rasmussen, M. L., Taneja, N., Neiningner, A. C., Wang, L., Robertson, G. L., Riffle, S. N., Shi, L., Knollmann, B. C., Burnette, D. T., & Gama, V. (2020). MCL-1 Inhibition by Selective BH3 Mimetics Disrupts Mitochondrial Dynamics Causing Loss of Viability and Functionality of Human Cardiomyocytes. *iScience*, 23(4), 101015. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101015>
- Ravikumar, B., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C. J., & Rubinsztein, D. C. (2006). Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Human Molecular Genetics*, 15(7), 1209-1216. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl036>
- Ricci, M. S., Kim, S. H., Ogi, K., Plastaras, J. P., Ling, J., Wang, W., Jin, Z., Liu, Y. Y., Dicker, D. T., Chiao, P. J., Flaherty, K. T., Smith, C. D., & El-Deiry, W. S. (2007). Reduction of TRAIL-Induced Mcl-1 and cIAP2 by c-Myc or Sorafenib Sensitizes Resistant Human Cancer Cells to TRAIL-Induced Death. *Cancer Cell*, 12(1), 66-80. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.05.006>
- Ricci, M. S., & Zong, W.-X. (2006). Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. *The oncologist*, 11(4), 342-357. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-4-342>
- Riedl, S. J., & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(11), 897-907. <https://doi.org/10.1038/nrm1496>
- Ripoll, C., Roldan, M., Ruedas-Rama, M. J., Orte, A., & Martin, M. (2021). Breast Cancer Cell Subtypes Display Different Metabolic Phenotypes That Correlate with Their Clinical Classification. *Biology*, 10(12), 1267. <https://doi.org/10.3390/biology10121267>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rizvi, S., Mertens, J. C., Bronk, S. F., Hirsova, P., Dai, H., Roberts, L. R., Kaufmann, S. H., & Gores, G. J. (2014). Platelet-derived Growth Factor Primes Cancer-associated Fibroblasts for Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(33), Article 33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.563064>
- Roberts, A. W., Seymour, J. F., Brown, J. R., Wierda, W. G., Kipps, T. J., Khaw, S. L., Carney, D. A., He, S. Z., Huang, D. C. S., Xiong, H., Cui, Y., Busman, T. A., McKeegan, E. M., Krivoshik, A. P., Enschede, S. H., & Humerickhouse, R.

- (2012). Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: Results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(5), Article 5. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.7898>
- Roberts, A. W., Stilgenbauer, S., Seymour, J. F., & Huang, D. C. S. (2017). Venetoclax in Patients with Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(16), 4527-4533. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0955>
- Rockey, D. C., Weymouth, N., & Shi, Z. (2013). Smooth muscle α actin (Acta2) and myofibroblast function during hepatic wound healing. *PLoS One*, 8(10), e77166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077166>
- Rodríguez, D. A., Zamorano, S., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Urra, H., Cubillos-Ruiz, J. R., Armisen, R., Henriquez, D. R., H Cheng, E., Letek, M., Vaisar, T., Irrazabal, T., Gonzalez-Billault, C., Letai, A., Pimentel-Muñoz, F. X., Kroemer, G., & Hetz, C. (2012). BH3-only proteins are part of a regulatory network that control the sustained signalling of the unfolded protein response sensor IRE1 α . *The EMBO Journal*, 31(10), 2322-2335. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.84>
- Rodríguez-Prados, J.-C., Través, P. G., Cuenca, J., Rico, D., Aragonés, J., Martín-Sanz, P., Cascante, M., & Boscá, L. (2010). Substrate fate in activated macrophages: A comparison between innate, classic, and alternative activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(1), 605-614. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901698>
- Rooswinkel, R. W., van de Kooij, B., Verheij, M., & Borst, J. (2012). Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B. *Cell Death & Disease*, 3(8), e366. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.109>
- Roosendaal, R., Mebius, R. E., & Kraal, G. (2008). The conduit system of the lymph node. *International Immunology*, 20(12), 1483-1487. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxn110>
- Rosenfeldt, M. T., & Ryan, K. M. (2011). The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis*, 32(7), 955-963. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr031>
- Ross, K. C., Andrews, A. J., Marion, C. D., Yen, T. J., & Bhattacharjee, V. (2017). Identification of the Serine Biosynthesis Pathway as a Critical Component of BRAF Inhibitor Resistance of Melanoma, Pancreatic, and Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(8), 1596-1609. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0798>
- Rossi, D. J., Jamieson, C. H. M., & Weissman, I. L. (2008). Stems Cells and the Pathways to Aging and Cancer. *Cell*, 132(4), 681-696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.036>
- Rudin, C. M., Hann, C. L., Garon, E. B., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P. D., Camidge, D. R., Chu, Q., Giaccone, G., Khaira, D., Ramalingam, S. S., Ranson, M. R., Dive, C., McKeegan, E. M., Chyla, B. J., Dowell, B. L., Chakravarty, A., Nolan, C. E., Rudersdorf, N., Busman, T. A., ... Gandhi, L. (2012). Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(11), Article 11. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3090>
- Ryan, G. B., Cliff, W. J., Gabbiani, G., Irle, C., Statkov, P. R., & Majno, G. (1973). Myofibroblasts in an avascular fibrous tissue. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 29(2), 197-206.
- Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., Fearon, D., Greten, F. R., Hingorani, S. R., Hunter, T., Hynes, R. O., Jain, R. K., Janowitz, T., Jorgensen, C., Kimmelman, A. C., Kolonin, M. G., Maki, R. G., Powers, R. S., Puré, E., ... Werb, Z. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nature Reviews. Cancer*, 20(3), 174-186. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>
- Sakamoto, A., Kunou, S., Shimada, K., Tsunoda, M., Aoki, T., Iriyama, C., Tomita, A., Nakamura, S., Hayakawa, F., & Kiyoi, H. (2019). Pyruvate secreted from patient-derived cancer-associated fibroblasts supports survival of primary lymphoma cells. *Cancer Science*, 110(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/cas.13873>
- Sakamuri, S. S. V. P., Sure, V. N., Kolli, L., Liu, N., Evans, W. R., Sperling, J. A., Busija, D. W., Wang, X., Lindsey, S. H., Murfee, W. L., Mostany, R., & Katakam, P. V. G. (2022). Glycolytic and Oxidative Phosphorylation Defects Precede

- the Development of Senescence in Primary Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *GeroScience*, 44(4), 1975-1994. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00550-2>
- Salaroglio, I. C., Panada, E., Moiso, E., Buondonno, I., Provero, P., Rubinstein, M., Kopecka, J., & Riganti, C. (2017). PERK induces resistance to cell death elicited by endoplasmic reticulum stress and chemotherapy. *Molecular Cancer*, 16(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0657-0>
- Salmon, H., Franciszkiwicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M.-C., Validire, P., Trautmann, A., Mami-Chouaib, F., & Donnadieu, E. (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3), Article 3. <https://doi.org/10.1172/JCI45817>
- Samain, R., Brunel, A., Douché, T., Fanjul, M., Cassant-Sourdy, S., Rochotte, J., Cros, J., Neuzillet, C., Raffenne, J., Duluc, C., Perraud, A., Nigri, J., Gigoux, V., Bieche, I., Ponzio, M., Carpentier, G., Cascone, I., Tomasini, R., Schmid, H. A., ... Bousquet, C. (2021). Pharmacologic Normalization of Pancreatic Cancer-Associated Fibroblast Secretome Impairs Prometastatic Cross-Talk With Macrophages. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 11(5), 1405-1436. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.01.008>
- Sampson, N., Brunner, E., Weber, A., Pühr, M., Schäfer, G., Szyndralewicz, C., & Klocker, H. (2018). Inhibition of Nox4-dependent ROS signaling attenuates prostate fibroblast activation and abrogates stromal-mediated protumorigenic interactions. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.31316>
- Samuel, S. M., Varghese, E., Satheesh, N. J., Triggie, C. R., & Büsselberg, D. (2023). Metabolic heterogeneity in TNBCs: A potential determinant of therapeutic efficacy of 2-deoxyglucose and metformin combinatory therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 164, 114911. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114911>
- Sancho, P., Burgos-Ramos, E., Tavera, A., Bou Kheir, T., Jagust, P., Schoenhals, M., Barneda, D., Sellers, K., Campos-Olivas, R., Graña, O., Viera, C. R., Yuneva, M., Sainz, B., & Heesch, C. (2015). MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metabolism*, 22(4), 590-605. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.015>
- Sanjabi, S., Mosaheb, M. M., & Flavell, R. A. (2009). Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells. *Immunity*, 31(1), 131-144. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.04.020>
- Sansone, P., Berishaj, M., Rajasekhar, V. K., Ceccarelli, C., Chang, Q., Strillacci, A., Savini, C., Shapiro, L., Bowman, R. L., Mastroleo, C., De Carolis, S., Daly, L., Benito-Martin, A., Perna, F., Fabbri, N., Healey, J. H., Spisni, E., Cricca, M., Lyden, D., ... Bromberg, J. (2017). Evolution of Cancer Stem-like Cells in Endocrine-Resistant Metastatic Breast Cancers Is Mediated by Stromal Microvesicles. *Cancer Research*, 77(8), Article 8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2129>
- Sansone, P., Savini, C., Kurelac, I., Chang, Q., Amato, L. B., Strillacci, A., Stepanova, A., Iommarini, L., Mastroleo, C., Daly, L., Galkin, A., Thakur, B. K., Soplop, N., Uryu, K., Hoshino, A., Norton, L., Bonafé, M., Cricca, M., Gasparre, G., ... Bromberg, J. (2017). Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(43), Article 43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704862114>
- Sarcinelli, C., Dragic, H., Piecyk, M., Barbet, V., Duret, C., Barthelaix, A., Ferraro-Peyret, C., Favre, J., Renno, T., Chaveroux, C., & Manié, S. N. (2020). ATF4-Dependent NRF2 Transcriptional Regulation Promotes Antioxidant Protection during Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancers*, 12(3), 569. <https://doi.org/10.3390/cancers12030569>
- Sarmiento-Ribeiro, A. B., Proença, M. T., Sousa, I., Pereira, A., Guedes, F., Teixeira, A., & Oliveira, C. R. (2012). A possible role for oxidation stress in lymphoid leukaemias and therapeutic failure. *Leukemia Research*, 36(8), 1041-1048. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.03.015>
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B., & Fesik, S. W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex :

- Recognition between regulators of apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5302), Article 5302.
- Saunders, J. W. (1966). Death in embryonic systems. *Science (New York, N.Y.)*, 154(3749), 604-612.
<https://doi.org/10.1126/science.154.3749.604>
- Sauvant, C., Nowak, M., Wirth, C., Schneider, B., Riemann, A., Gekle, M., & Thews, O. (2008). Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38. *International Journal of Cancer*, 123(11), 2532-2542.
<https://doi.org/10.1002/ijc.23818>
- Sayin, V. I., LeBoeuf, S. E., & Papagiannakopoulos, T. (2019). Targeting Metabolic Bottlenecks in Lung Cancer. *Trends in Cancer*, 5(8), 457-459.
<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.06.001>
- Sayols, S. (2023). rrvgo : A Bioconductor package for interpreting lists of Gene Ontology terms. *microPublication Biology*, 2023.
<https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000811>
- Scalcon, V., Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2018). Significance of the mitochondrial thioredoxin reductase in cancer cells: An update on role, targets and inhibitors. *Free Radical Biology and Medicine*, 127, 62-79.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.043>
- Schlaepfer, I. R., Hitz, C. A., Gijón, M. A., Bergman, B. C., Eckel, R. H., & Jacobsen, B. M. (2012). Progesterin modulates the lipid profile and sensitivity of breast cancer cells to docetaxel. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 363(1-2), 111-121.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.08.005>
- Schlappack, O., Zimmermann, A., & Hill, R. (1991). Glucose starvation and acidosis: Effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumour cells. *British Journal of Cancer*, 64(4), 663-670.
<https://doi.org/10.1038/bjc.1991.378>
- Schmitt, E., Beauchemin, M., & Bertrand, R. (2007). Nuclear colocalization and interaction between bcl-xL and cdk1(cdc2) during G2/M cell-cycle checkpoint. *Oncogene*, 26(40), 5851-5865.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210396>
- Schor, S. L., Schor, A. M., Grey, A. M., & Rushton, G. (1988). Foetal and cancer patient fibroblasts produce an autocrine migrationstimulating factor not made by normal adult cells. *Journal of Cell Science*, 90(3), 391-399.
<https://doi.org/10.1242/jcs.90.3.391>
- Schroeder, B., Vander Steen, T., Espinoza, I., Venkatapoorna, C. M. K., Hu, Z., Silva, F. M., Regan, K., Cuyàs, E., Meng, X. W., Verdura, S., Arbusà, A., Schneider, P. A., Flatten, K. S., Kemble, G., Montero, J., Kaufmann, S. H., Menendez, J. A., & Lupu, R. (2021). Fatty acid synthase (FASN) regulates the mitochondrial priming of cancer cells. *Cell Death & Disease*, 12(11), Article 11.
<https://doi.org/10.1038/s41419-021-04262-x>
- Schwartz, P. M., Moir, R. D., Hyde, C. M., Turek, P. J., & Handschumacher, R. E. (1985). Role of uridine phosphorylase in the anabolism of 5-fluorouracil. *Biochemical Pharmacology*, 34(19), 3585-3589.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(85\)90737-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(85)90737-3)
- Schwickart, M., Huang, X., Lill, J. R., Liu, J., Ferrando, R., French, D. M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., Yue, P., Dornan, D., Huang, D. C. S., & Dixit, V. M. (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature*, 463(7277), Article 7277.
<https://doi.org/10.1038/nature08646>
- Sciacovelli, M., & Frezza, C. (2016). Oncometabolites: Unconventional triggers of oncogenic signalling cascades. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 175-181.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.025>
- Sciacovelli, M., Gonçalves, E., Johnson, T. I., Zecchini, V. R., da Costa, A. S. H., Gaude, E., Drubbel, A. V., Theobald, S. J., Abbo, S. R., Tran, M. G. B., Rajeev, V., Cardaci, S., Foster, S., Yun, H., Cutillas, P., Warren, A., Gnanapragasam, V., Gottlieb, E., Franze, K., ... Frezza, C. (2016). Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature*, 537(7621), Article 7621.
<https://doi.org/10.1038/nature19353>
- Selak, M. A., Armour, S. M., MacKenzie, E. D., Boulahbel, H., Watson, D. G., Mansfield, K. D., Pan, Y., Simon, M. C., Thompson, C. B., & Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 7(1), 77-85.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.11.022>
- Sena, L. A., Li, S., Jairaman, A., Prakriya, M., Ezponda, T., Hildeman, D. A., Wang, C.-R., Schumacker, P. T., Licht, J. D., Perlman, H.,

- Bryce, P. J., & Chandel, N. S. (2013). Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity*, 38(2), 225-236. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.020>
- Shah, R., & Chen, S. (2020). Metabolic Signaling Cascades Prompted by Glutaminolysis in Cancer. *Cancers*, 12(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/cancers12092624>
- Shao, S., Gill, A. A., Zahm, S. H., Jatoi, I., Shriver, C. D., McGlynn, K. A., & Zhu, K. (2018). Diabetes and overall survival among breast cancer patients in the US military health system. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 27(1), 50-57. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0439>
- Shao, S., Zhao, L., An, G., Zhang, L., Jing, X., Luo, M., Li, W., Meng, D., Ning, Q., Zhao, X., & Lei, J. (2020). Metformin suppresses HIF-1 α expression in cancer-associated fibroblasts to prevent tumor-stromal cross talk in breast cancer. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1096/fj.202000951RR>
- Shao, Z. M., Nguyen, M., & Barsky, S. H. (2000). Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene*, 19(38), 4337-4345. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203785>
- Sharifi, S., Barar, J., Hejazi, M. S., & Samadi, N. (2015). Doxorubicin Changes Bax /Bcl-xL Ratio, Caspase-8 and 9 in Breast Cancer Cells. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(3), 351-359. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.049>
- Sharma, S., Yang, S.-C., Zhu, L., Reckamp, K., Gardner, B., Baratelli, F., Huang, M., Batra, R. K., & Dubinett, S. M. (2005). Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Research*, 65(12), 5211-5220. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0141>
- Sheng, Z., Li, L., Zhu, L. J., Smith, T. W., Demers, A., Ross, A. H., Moser, R. P., & Green, M. R. (2010). A genome-wide RNA interference screen reveals an essential CREB3L2-ATF5-MCL1 survival pathway in malignant glioma with therapeutic implications. *Nature Medicine*, 16(6), 671-677. <https://doi.org/10.1038/nm.2158>
- Sherman, M. H., Yu, R. T., Engle, D. D., Ding, N., Atkins, A. R., Tiriach, H., Collisson, E. A., Connor, F., Van Dyke, T., Kozlov, S., Martin, P., Tseng, T. W., Dawson, D. W., Donahue, T. R., Masamune, A., Shimosegawa, T., Apte, M. V., Wilson, J. S., Ng, B., ... Evans, R. M. (2014). Vitamin D Receptor-Mediated Stromal Reprogramming Suppresses Pancreatitis and Enhances Pancreatic Cancer Therapy. *Cell*, 159(1), 80-93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.007>
- Shiga, K., Hara, M., Nagasaki, T., Sato, T., Takahashi, H., & Takeyama, H. (2015). Cancer-Associated Fibroblasts : Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers*, 7(4), 2443-2458. <https://doi.org/10.3390/cancers7040902>
- Shin, S., Buel, G. R., Wolgamott, L., Plas, D. R., Asara, J. M., Blenis, J., & Yoon, S.-O. (2015). ERK2 mediates metabolic stress response to regulate cell fate. *Molecular cell*, 59(3), 382-398. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.020>
- Shintani, Y., Fujiwara, A., Kimura, T., Kawamura, T., Funaki, S., Minami, M., & Okumura, M. (2016). IL-6 Secreted from Cancer-Associated Fibroblasts Mediates Chemoresistance in NSCLC by Increasing Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(9), 1482-1492. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.025>
- Shiovitz, S., & Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer : A topic in evolution. *Annals of Oncology*, 26(7), 1291-1299. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv022>
- Shlomovitz, I., Speir, M., & Gerlic, M. (2019). Flipping the dogma – phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0437-0>
- Siddiqui, W. A., Ahad, A., & Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family : Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology*, 89(3), Article 3. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1448-7>
- Silzle, T., Kreutz, M., Dobler, M. A., Brockhoff, G., Knuechel, R., & Kunz-Schughart, L. A. (2003). Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *European*

- Journal of Immunology*, 33(5), 1311-1320.
<https://doi.org/10.1002/eji.200323057>
- Singh, A. K., & Yu, X. (2020). Tissue-Specific Carcinogens as Soil to Seed BRCA1/2-Mutant Hereditary Cancers. *Trends in Cancer*, 6(7), 559-568.
<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.03.004>
- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: The balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175-193.
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- Singleton, D. C., Dechaume, A.-L., Murray, P. M., Katt, W. P., Baguley, B. C., & Leung, E. Y. (2020). Pyruvate anaplerosis is a mechanism of resistance to pharmacological glutaminase inhibition in triple-receptor negative breast cancer. *BMC Cancer*, 20(1), 470.
<https://doi.org/10.1186/s12885-020-06885-3>
- Sinn, H.-P., & Kreipe, H. (2013). A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel, Switzerland)*, 8(2), 149-154.
<https://doi.org/10.1159/000350774>
- Sirois, I., Aguilar-Mahecha, A., Lafleur, J., Fowler, E., Vu, V., Scriver, M., Buchanan, M., Chabot, C., Ramanathan, A., Balachandran, B., Légaré, S., Przybytkowski, E., Lan, C., Krzemien, U., Cavallone, L., Aleynikova, O., Ferrario, C., Guilbert, M.-C., Benlimame, N., ... Basik, M. (2019). A Unique Morphological Phenotype in Chemoresistant Triple-Negative Breast Cancer Reveals Metabolic Reprogramming and PLIN4 Expression as a Molecular Vulnerability. *Molecular Cancer Research: MCR*, 17(12), 2492-2507.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0264>
- Skibinski, A., & Kuperwasser, C. (2015). The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene*, 34(42), 5309-5316.
<https://doi.org/10.1038/onc.2014.475>
- Song, M. S., Salmena, L., & Pandolfi, P. P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(5), 283-296.
<https://doi.org/10.1038/nrm3330>
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P. E., Brown, P. O., Børresen-Dale, A.-L., & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8418-8423.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>
- Sorokin, L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 10(10), Article 10.
<https://doi.org/10.1038/nri2852>
- Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., Dayton, B. D., Ding, H., Enschede, S. H., Fairbrother, W. J., Huang, D. C. S., Hymowitz, S. G., Jin, S., Khaw, S. L., Kovar, P. J., Lam, L. T., Lee, J., Maecker, H. L., Marsh, K. C., ... Elmore, S. W. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, 19(2), 202-208. <https://doi.org/10.1038/nm.3048>
- Sousa, C. M., Biancur, D. E., Wang, X., Halbrook, C. J., Sherman, M. H., Zhang, L., Kremer, D., Hwang, R. F., Witkiewicz, A. K., Ying, H., Asara, J. M., Evans, R. M., Cantley, L. C., Lyssiotis, C. A., & Kimmelman, A. C. (2016). Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature*, 536(7617), 479-483.
<https://doi.org/10.1038/nature19084>
- Steed, D. L. (1997). THE ROLE OF GROWTH FACTORS IN WOUND HEALING. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 575-586.
[https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(05\)70569-7](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70569-7)
- Stefanon, B., Colitti, M., Gabai, G., Knight, C. H., & Wilde, C. J. (2002). Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. *The Journal of Dairy Research*, 69(1), 37-52.
<https://doi.org/10.1017/s0022029901005246>
- Stein, E. M., DiNardo, C. D., Fathi, A. T., Pollyea, D. A., Stone, R. M., Altman, J. K., Roboz, G. J., Patel, M. R., Collins, R., Flinn, I. W., Sekeres, M. A., Stein, A. S., Kantarjian, H. M., Levine, R. L., Vyas, P., MacBeth, K. J., Tosolini, A., VanOostendorp, J., Xu, Q., ... de Botton, S. (2019). Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. *Blood*, 133(7), 676-687.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-869008>
- Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altman, B. J., Hsieh, A. L., & Dang, C. V. (2015). MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discovery*, 5(10), 1024-1039.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0507>

- Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 5(3), 189-200. <https://doi.org/10.1038/nri1568>
- Strasser, A., Cory, S., & Adams, J. M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *The EMBO Journal*, 30(18), Article 18. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.307>
- Strohecker, A. M., Guo, J. Y., Karsli-Uzunbas, G., Price, S. M., Chen, G. J., Mathew, R., McMahon, M., & White, E. (2013). Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors. *Cancer Discovery*, 3(11), 1272-1285. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0397>
- Strutz, F., Okada, H., Lo, C. W., Danoff, T., Carone, R. L., Tomaszewski, J. E., & Neilson, E. G. (1995). Identification and characterization of a fibroblast marker : FSP1. *The Journal of Cell Biology*, 130(2), 393-405. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.2.393>
- Su, S., Chen, J., Yao, H., Liu, J., Yu, S., Lao, L., Wang, M., Luo, M., Xing, Y., Chen, F., Huang, D., Zhao, J., Yang, L., Liao, D., Su, F., Li, M., Liu, Q., & Song, E. (2018). CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell*, 172(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.009>
- Sugimoto, H., Mundel, T. M., Kieran, M. W., & Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biology & Therapy*, 5(12), 1640-1646. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.12.3354>
- Suhaili, S. H., Karimian, H., Stellato, M., Lee, T.-H., & Aguilar, M.-I. (2017). Mitochondrial outer membrane permeabilization : A focus on the role of mitochondrial membrane structural organization. *Biophysical Reviews*, 9(4), 443-457. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0308-0>
- Sullivan, M. R., Danai, L. V., Lewis, C. A., Chan, S. H., Gui, D. Y., Kunchok, T., Dennstedt, E. A., Vander Heiden, M. G., & Muir, A. (2019). Quantification of microenvironmental metabolites in murine cancers reveals determinants of tumor nutrient availability. *eLife*, 8, e44235. <https://doi.org/10.7554/eLife.44235>
- Sullivan, M. R., Mattaini, K. R., Dennstedt, E. A., Nguyen, A. A., Sivanand, S., Reilly, M. F., Meeth, K., Muir, A., Darnell, A. M., Bosenberg, M. W., Lewis, C. A., & Vander Heiden, M. G. (2019). Increased Serine Synthesis Provides an Advantage for Tumors Arising in Tissues Where Serine Levels Are Limiting. *Cell Metabolism*, 29(6), 1410-1421.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.015>
- Sun, G., Guzman, E., Balasanyan, V., Conner, C. M., Wong, K., Zhou, H. R., Kosik, K. S., & Montell, D. J. (2017). A molecular signature for anastasis, recovery from the brink of apoptotic cell death. *Journal of Cell Biology*, 216(10), 3355-3368. <https://doi.org/10.1083/jcb.201706134>
- Sun, J., Nagel, R., Zaal, E. A., Ugalde, A. P., Han, R., Proost, N., Song, J.-Y., Pataskar, A., Burylo, A., Fu, H., Poelarends, G. J., van de Ven, M., van Tellingen, O., Berkers, C. R., & Agami, R. (2019). SLC1A3 contributes to L-asparaginase resistance in solid tumors. *The EMBO Journal*, 38(21), e102147. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102147>
- Sun, K., Tang, S., Hou, Y., Xi, L., Chen, Y., Yin, J., Peng, M., Zhao, M., Cui, X., & Liu, M. (2019a). Oxidized ATM-mediated glycolysis enhancement in breast cancer-associated fibroblasts contributes to tumor invasion through lactate as metabolic coupling. *EBioMedicine*, 41, 370-383. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.025>
- Sun, K., Tang, S., Hou, Y., Xi, L., Chen, Y., Yin, J., Peng, M., Zhao, M., Cui, X., & Liu, M. (2019b). Oxidized ATM-mediated glycolysis enhancement in breast cancer-associated fibroblasts contributes to tumor invasion through lactate as metabolic coupling. *EBioMedicine*, 41, 370-383. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.025>
- Sun, Y., Fan, X., Zhang, Q., Shi, X., Xu, G., & Zou, C. (2017). Cancer-associated fibroblasts secrete FGF-1 to promote ovarian proliferation, migration, and invasion through the activation of FGF-1/FGFR4 signaling. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(7), 1010428317712592. <https://doi.org/10.1177/1010428317712592>
- Sunami, Y., Böker, V., & Kleeff, J. (2021). Targeting and Reprogramming Cancer-Associated Fibroblasts and the Tumor Microenvironment in Pancreatic Cancer.

- Cancers*, 13(4), 697. <https://doi.org/10.3390/cancers13040697>
- Sung, J. S., Kang, C. W., Kang, S., Jang, Y., Chae, Y. C., Kim, B. G., & Cho, N. H. (2020). ITGB4-mediated metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts. *Oncogene*, 39(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1014-0>
- Suzuki, M., Youle, R. J., & Tjandra, N. (2000). Structure of Bax : Coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, 103(4), 645-654. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00167-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00167-7)
- Swain, S. M., Shastry, M., & Hamilton, E. (2023). Targeting HER2-positive breast cancer : Advances and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00579-0>
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports*, 7(9), 880-885. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400779>
- Tadros, S. B., Shukla, S. K., King, R. J., Gunda, V., Vernucci, E., Abrego, J., Chaika, N. V., Yu, F., Lazenby, A. J., Berim, L., Grem, J., Sasson, A. R., & Singh, P. K. (2017). De Novo Lipid Synthesis Facilitates Gemcitabine Resistance Through Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cancer. *Cancer research*, 77(20), 5503-5517. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3062>
- Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., & Seto, M. (2005). Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma : Identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene*, 24(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208300>
- Tagoug, I., Jordheim, L. P., Herveau, S., Matera, E.-L., Huber, A.-L., Chettab, K., Manié, S., & Dumontet, C. (2013). Therapeutic enhancement of ER stress by insulin-like growth factor I sensitizes myeloma cells to proteasomal inhibitors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(13), 3556-3566. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3134>
- Takahashi, H., Sakakura, K., Kudo, T., Toyoda, M., Kaira, K., Oyama, T., & Chikamatsu, K. (2017). Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages. *Oncotarget*, 8(5), 8633-8647. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14374>
- Takaoka, Y., Konno, M., Koseki, J., Colvin, H., Asai, A., Tamari, K., Satoh, T., Mori, M., Doki, Y., Ogawa, K., & Ishii, H. (2019). Mitochondrial pyruvate carrier 1 expression controls cancer epithelial-mesenchymal transition and radioresistance. *Cancer Science*, 110(4), 1331-1339. <https://doi.org/10.1111/cas.13980>
- Tam, C. S., Anderson, M. A., Pott, C., Agarwal, R., Handunnetti, S., Hicks, R. J., Burbury, K., Turner, G., Di Iulio, J., Bressel, M., Westerman, D., Lade, S., Dreyling, M., Dawson, S.-J., Dawson, M. A., Seymour, J. F., & Roberts, A. W. (2018). Ibrutinib plus Venetoclax for the Treatment of Mantle-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 378(13), 1211-1223. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1715519>
- Tan, A. S., Baty, J. W., Dong, L.-F., Bezawork-Geleta, A., Endaya, B., Goodwin, J., Bajzikova, M., Kovarova, J., Peterka, M., Yan, B., Pesdar, E. A., Sobol, M., Filimonenko, A., Stuart, S., Vondrusova, M., Kluckova, K., Sachaphibulkij, K., Rohlena, J., Hozak, P., ... Berridge, M. V. (2015). Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells without Mitochondrial DNA. *Cell Metabolism*, 21(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.003>
- Tan, C., Hu, W., He, Y., Zhang, Y., Zhang, G., Xu, Y., & Tang, J. (2018). Cytokine-mediated therapeutic resistance in breast cancer. *Cytokine*, 108, 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.03.020>
- Tang, H. M., Talbot Jr, C. C., Fung, M. C., & Tang, H. L. (2017). Molecular signature of anastasis for reversal of apoptosis. *F1000Research*, 6, 43. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10568.2>
- Tang, X., Lin, C.-C., Spasojevic, I., Iversen, E. S., Chi, J.-T., & Marks, J. R. (2014). A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 16, 415. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0415-9>
- Tang, Y., Zhang, Z., Chen, Y., Qin, S., Zhou, L., Gao, W., & Shen, Z. (2022). Metabolic Adaptation-Mediated Cancer Survival and Progression in Oxidative Stress. *Antioxidants*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/antiox11071324>
- Tao, L., Huang, G., Wang, R., Pan, Y., He, Z., Chu, X., Song, H., & Chen, L. (2016). Cancer-

- associated fibroblasts treated with cisplatin facilitates chemoresistance of lung adenocarcinoma through IL-11/IL-11R/STAT3 signaling pathway. *Scientific Reports*, 6, 38408. <https://doi.org/10.1038/srep38408>
- Taylor, C., McGale, P., Probert, J., Broggio, J., Charman, J., Darby, S. C., Kerr, A. J., Whelan, T., Cutter, D. J., Mannu, G., & Dodwell, D. (2023). Breast cancer mortality in 500 000 women with early invasive breast cancer diagnosed in England, 1993-2015 : Population based observational cohort study. *BMJ*, 381, e074684. <https://doi.org/10.1136/bmj-2022-074684>
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis : Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(3), 231-241. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
- Tchou, J., Kossenkov, A. V., Chang, L., Satija, C., Herlyn, M., Showe, L. C., & Puré, E. (2012). Human breast cancer associated fibroblasts exhibit subtype specific gene expression profiles. *BMC Medical Genomics*, 5, 39. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-5-39>
- Teixeira, C., Reed, J. C., & Pratt, M. A. (1995). Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 55(17), 3902-3907.
- Tejada, M., Yu, L., Dong, J., Jung, K., Meng, Y.-J., Peale, F., Frantz, G., Hall, L., Liang, X., Gerber, H.-P., & Ferrara, N. (2006). Tumor-Driven Paracrine Platelet-Derived Growth Factor Receptor Signaling Is a Key Determinant of Stromal Cell Recruitment in a Model of Human Lung Carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12, 2676-2688. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1770>
- Teng, F., Tian, W.-Y., Wang, Y.-M., Zhang, Y.-F., Guo, F., Zhao, J., Gao, C., & Xue, F.-X. (2016). Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. *Journal of Hematology & Oncology*, 9, 8. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0231-4>
- Terunuma, A., Putluri, N., Mishra, P., Mathé, E. A., Dorsey, T. H., Yi, M., Wallace, T. A., Issaq, H. J., Zhou, M., Killian, J. K., Stevenson, H. S., Karoly, E. D., Chan, K., Samanta, S., Prieto, D., Hsu, T. Y. T., Kurley, S. J., Putluri, V., Sonavane, R., ... Ambs, S. (2014). MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(1), 398-412. <https://doi.org/10.1172/JCI71180>
- Teske, B. F., Fusakio, M. E., Zhou, D., Shan, J., McClintick, J. N., Kilberg, M. S., & Wek, R. C. (2013). CHOP induces activating transcription factor 5 (ATF5) to trigger apoptosis in response to perturbations in protein homeostasis. *Molecular Biology of the Cell*, 24(15), 2477-2490. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-01-0067>
- Thomas, D. A., & Massagué, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 8(5), 369-380. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.012>
- Thomas, H., & Coley, H. M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer : An update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, 10(2), 159-165. <https://doi.org/10.1177/107327480301000207>
- Thomas, L. W., Lam, C., & Edwards, S. W. (2010). Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Letters*, 584(14), Article 14. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.061>
- Thomas, R. L., Roberts, D. J., Kubli, D. A., Lee, Y., Quinsay, M. N., Owens, J. B., Fischer, K. M., Sussman, M. A., Miyamoto, S., & Gustafsson, Å. B. (2013). Loss of MCL-1 leads to impaired autophagy and rapid development of heart failure. *Genes & Development*, 27(12), 1365-1377. <https://doi.org/10.1101/gad.215871.113>
- Tian, B., Chen, X., Zhang, H., Li, X., Wang, J., Han, W., Zhang, L.-Y., Fu, L., Li, Y., Nie, C., Zhao, Y., Tan, X., Wang, H., Guan, X.-Y., & Hong, A. (2017). Urokinase plasminogen activator secreted by cancer-associated fibroblasts induces tumor progression via PI3K/AKT and ERK signaling in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(26), 42300-42313. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15857>
- Timmerman, L. A., Holton, T., Yuneva, M., Louie, R. J., Padró, M., Daemen, A., Hu, M., Chan, D. A., Ethier, S. P., van 't Veer, L. J., Polyak, K., McCormick, F., & Gray, J. W. (2013). Glutamine sensitivity analysis identifies the xCT antiporter as a common triple-negative breast tumor therapeutic target. *Cancer Cell*, 24(4), 450-465. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.020>
- Togo, S., Polanska, U. M., Horimoto, Y., & Orimo, A. (2013). Carcinoma-Associated Fibroblasts

- Are a Promising Therapeutic Target. *Cancers*, 5(1), 149-169. <https://doi.org/10.3390/cancers5010149>
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(5), 349-363. <https://doi.org/10.1038/nrm809>
- Toullec, A., Gerald, D., Despouy, G., Bourachot, B., Cardon, M., Lefort, S., Richardson, M., Rigail, G., Parrini, M.-C., Lucchesi, C., Bellanger, D., Stern, M.-H., Dubois, T., Sastre-Garau, X., Delattre, O., Vincent-Salomon, A., & Mechta-Grigoriou, F. (2010). Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Molecular Medicine*, 2(6), 211-230. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000073>
- Trédan, O., Galmarini, C. M., Patel, K., & Tannock, I. F. (2007). Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 99(19), 1441-1454. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm135>
- Truman, L. A., Ford, C. A., Pasikowska, M., Pound, J. D., Wilkinson, S. J., Dumitriu, I. E., Melville, L., Melrose, L. A., Ogden, C. A., Nibbs, R., Graham, G., Combadiere, C., & Gregory, C. D. (2008). CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*, 112(13), 5026-5036. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162404>
- Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E. F., Marsh, K. C., Mitten, M. J., Nimmer, P., Roberts, L., Tahir, S. K., Xiao, Y., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S., Rosenberg, S. H., & Elmore, S. W. (2008). ABT-263 : A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Research*, 68(9), 3421-3428. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5836>
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., & Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4706), Article 4706.
- Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P. C., & Croce, C. M. (1984). Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science (New York, N.Y.)*, 224(4656), Article 4656.
- Tsukada, T., McNutt, M. A., Ross, R., & Gown, A. M. (1987). HHF35, a muscle actin-specific monoclonal antibody. II. Reactivity in normal, reactive, and neoplastic human tissues. *The American Journal of Pathology*, 127(2), 389-402.
- Tsuyada, A., Chow, A., Wu, J., Somlo, G., Chu, P., Loera, S., Luu, T., Li, A. X., Wu, X., Ye, W., Chen, S., Zhou, W., Yu, Y., Wang, Y.-Z., Ren, X., Li, H., Scherle, P., Kuroki, Y., & Wang, S. E. (2012). CCL2 mediates cross-talk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells. *Cancer Research*, 72(11), 2768-2779. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3567>
- Tu, Y., Renner, S., Xu, F., Fleishman, A., Taylor, J., Weisz, J., Vescio, R., Rettig, M., Berenson, J., Krajewski, S., Reed, J. C., & Lichtenstein, A. (1998). BCL-X expression in multiple myeloma : Possible indicator of chemoresistance. *Cancer Research*, 58(2), Article 2.
- Vaillant, F., Merino, D., Lee, L., Breslin, K., Pal, B., Ritchie, M. E., Smyth, G. K., Christie, M., Phillipson, L. J., Burns, C. J., Mann, G. B., Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2013). Targeting BCL-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Cell*, 24(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.06.002>
- Valvezan, A. J., & Manning, B. D. (2019). Molecular logic of mTORC1 signalling as a metabolic rheostat. *Nature Metabolism*, 1(3), 321-333. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0038-7>
- Van Cutsem, E., Tempero, M. A., Sigal, D., Oh, D.-Y., Fazio, N., Macarulla, T., Hitre, E., Hammel, P., Hendifar, A. E., Bates, S. E., Li, C.-P., Hingorani, S. R., de la Fouchardiere, C., Kasi, A., Heinemann, V., Maraveyas, A., Bahary, N., Layos, L., Sahai, V., ... Bullock, A. J. (2020). Randomized Phase III Trial of Pegvorhialuronidase Alfa With Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine for Patients With Hyaluronan-High Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 38(27), 3185-3194. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00590>
- Vande Voorde, J., Ackermann, T., Pfotzer, N., Sumpton, D., Mackay, G., Kalna, G., Nixon, C., Blyth, K., Gottlieb, E., & Tardito, S. (2019). Improving the metabolic fidelity of cancer models with a physiological cell culture medium. *Science Advances*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau7314>
- Vandenberg, C. J., & Cory, S. (2013). ABT-199, a new Bcl-2-specific BH3 mimetic, has in vivo efficacy against aggressive Myc-driven

- mouse lymphomas without provoking thrombocytopenia. *Blood*, 121(12), 2285-2288. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-475855>
- Vandenbroucke, R. E., & Libert, C. (2014). Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(12), 904-927. <https://doi.org/10.1038/nrd4390>
- Vander Heiden, M. G., Li, X. X., Gottlieb, E., Hill, R. B., Thompson, C. B., & Colombini, M. (2001). Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(22), Article 22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101590200>
- van Gastel, N., Spinelli, J. B., Sharda, A., Schajnovitz, A., Baryawno, N., Rhee, C., Oki, T., Grace, E., Soled, H. J., Milosevic, J., Sykes, D. B., Hsu, P. P., Vander Heiden, M. G., Vidoudez, C., Trauger, S. A., Haigis, M. C., & Scadden, D. T. (2020). Induction of a Timed Metabolic Collapse to Overcome Cancer Chemoresistance. *Cell Metabolism*, 32(3), 391-403.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.009>
- Vaseva, A. V., & Moll, U. M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1787(5), 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.10.005>
- Vats, D., Mukundan, L., Odegaard, J. I., Zhang, L., Smith, K. L., Morel, C. R., Wagner, R. A., Greaves, D. R., Murray, P. J., & Chawla, A. (2006). Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metabolism*, 4(1), 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.011>
- Vaux, D. L., Cory, S., & Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189), Article 6189. <https://doi.org/10.1038/335440a0>
- Vaziri-Gohar, A., Hue, J. J., Abbas, A., Graor, H. J., Hajihassani, O., Zarei, M., Titomihelakis, G., Feczko, J., Rathore, M., Chelstowska, S., Loftus, A. W., Wang, R., Zarei, M., Goudarzi, M., Zhang, R., Willard, B., Zhang, L., Kresak, A., Willis, J. E., ... Winter, J. M. (2023). Increased glucose availability sensitizes pancreatic cancer to chemotherapy. *Nature Communications*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38921-8>
- Vazquez, F., Lim, J.-H., Chim, H., Bhalla, K., Girnun, G., Pierce, K., Clish, C. B., Granter, S. R., Widlund, H. R., Spiegelman, B. M., & Puigserver, P. (2013). PGC1α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell*, 23(3), 287-301. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.020>
- Vazquez-Martin, A., Ortega-Delgado, F. J., Fernandez-Real, J. M., & Menendez, J. A. (2008). The tyrosine kinase receptor HER2 (erbB-2): From oncogenesis to adipogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(5), 1147-1152. <https://doi.org/10.1002/jcb.21917>
- Verlato, G., Zoppini, G., Bonora, E., & Muggeo, M. (2003). Mortality from site-specific malignancies in type 2 diabetic patients from Verona. *Diabetes Care*, 26(4), 1047-1051. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.4.1047>
- Viale, A., Pettazoni, P., Lyssiotis, C. A., Ying, H., Sánchez, N., Marchesini, M., Carugo, A., Green, T., Seth, S., Giuliani, V., Kost-Alimova, M., Muller, F., Colla, S., Nezi, L., Genovese, G., Deem, A. K., Kapoor, A., Yao, W., Brunetto, E., ... Draetta, G. F. (2014). Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*, 514(7524), Article 7524. <https://doi.org/10.1038/nature13611>
- Viale, G., Slaets, L., Bogaerts, J., Rutgers, E., Van't Veer, L., Piccart-Gebhart, M. J., de Snoo, F. A., Stork-Sloots, L., Russo, L., Dell'Orto, P., van den Akker, J., Glas, A., Cardoso, F., & TRANSBIG Consortium & the MINDACT Investigators. (2014). High concordance of protein (by IHC), gene (by FISH; HER2 only), and microarray readout (by TargetPrint) of ER, PgR, and HER2: Results from the EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(4), 816-823. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu026>
- Visvader, J. E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & Development*, 23(22), 2563-2577. <https://doi.org/10.1101/gad.1849509>
- Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2012). Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell*, 10(6), 717-728. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007>
- Vlahovic, G., Karantza, V., Wang, D., Cosgrove, D., Rudersdorf, N., Yang, J., Xiong, H., Busman, T., & Mabry, M. (2014). A phase I safety and pharmacokinetic study of ABT-263 in

- combination with carboplatin/paclitaxel in the treatment of patients with solid tumors. *Investigational New Drugs*, 32(5), Article 5. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0116-3>
- Vogler, M. (2012). BCL2A1 : The underdog in the BCL2 family. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 67-74. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.158>
- Vogler, M. (2014). Targeting BCL2-Proteins for the Treatment of Solid Tumours. *Advances in Medicine*, 2014, 943648. <https://doi.org/10.1155/2014/943648>
- Voskoboinik, I., Dunstone, M. A., Baran, K., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2010). Perforin : Structure, function, and role in human immunopathology. *Immunological Reviews*, 235(1), 35-54. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00896.x>
- Voss, A. K., & Strasser, A. (2020). The essentials of developmental apoptosis. *F1000Research*, 9, 148. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21571.1>
- Wahdan-Alaswad, R., Fan, Z., Edgerton, S. M., Liu, B., Deng, X.-S., Arnadottir, S. S., Richer, J. K., Anderson, S. M., & Thor, A. D. (2013). Glucose promotes breast cancer aggression and reduces metformin efficacy. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(24), 3759-3769. <https://doi.org/10.4161/cc.26641>
- Wallace, C., & Keast, D. (1992). Glutamine and macrophage function. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 41(9), 1016-1020. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(92\)90130-3](https://doi.org/10.1016/0026-0495(92)90130-3)
- Wang, H., Wu, Q., Liu, Z., Luo, X., Fan, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Hua, S., Fu, Q., Zhao, M., Chen, Y., Fang, W., & Lv, X. (2014). Downregulation of FAP suppresses cell proliferation and metastasis through PTEN/PI3K/AKT and Ras-ERK signaling in oral squamous cell carcinoma. *Cell Death & Disease*, 5, e1155. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.122>
- Wang, J., Yin, Y., Hua, H., Li, M., Luo, T., Xu, L., Wang, R., Liu, D., Zhang, Y., & Jiang, Y. (2009). Blockade of GRP78 sensitizes breast cancer cells to microtubules-interfering agents that induce the unfolded protein response. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9B), 3888-3897. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00873.x>
- Wang, J.-M., Lai, M.-Z., & Yang-Yen, H.-F. (2003). Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 23(6), Article 6.
- Wang, L., Doherty, G. A., Judd, A. S., Tao, Z.-F., Hansen, T. M., Frey, R. R., Song, X., Bruncko, M., Kunzer, A. R., Wang, X., Wendt, M. D., Flygare, J. A., Catron, N. D., Judge, R. A., Park, C. H., Shekhar, S., Phillips, D. C., Nimmer, P., Smith, M. L., ... Souers, A. J. (2020). Discovery of A-1331852, a First-in-Class, Potent, and Orally-Bioavailable BCL-X_L Inhibitor. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11(10), 1829-1836. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00568>
- Wang, L., Li, X., Ren, Y., Geng, H., Zhang, Q., Cao, L., Meng, Z., Wu, X., Xu, M., & Xu, K. (2019). Cancer-associated fibroblasts contribute to cisplatin resistance by modulating ANXA3 in lung cancer cells. *Cancer Science*, 110(5), 1609-1620. <https://doi.org/10.1111/cas.13998>
- Wang, X., Bathina, M., Lynch, J., Koss, B., Calabrese, C., Frase, S., Schuetz, J. D., Rehg, J. E., & Opferman, J. T. (2013). Deletion of MCL-1 causes lethal cardiac failure and mitochondrial dysfunction. *Genes & Development*, 27(12), 1351-1364. <https://doi.org/10.1101/gad.215855.113>
- Wang, Y., Xu, W., Yan, Z., Zhao, W., Mi, J., Li, J., & Yan, H. (2018). Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0731-5>
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309-314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Waterhouse, N. J., Sedelies, K. A., & Trapani, J. A. (2006). Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis. *Immunology & Cell Biology*, 84(1), 72-78. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01416.x>
- Watkins, G., Douglas-Jones, A., Mansel, R. E., & Jiang, W. G. (2004). The localisation and reduction of nuclear staining of PPARgamma and PGC-1 in human breast cancer. *Oncology Reports*, 12(2), 483-488.
- Wei, A. H., Strickland, S. A., Hou, J.-Z., Fiedler, W., Lin, T. L., Walter, R. B., Enjeti, A., Tiong, I. S., Savona, M., Lee, S., Chyla, B., Popovic, R.,

- Salem, A. H., Agarwal, S., Xu, T., Fakouhi, K. M., Humerickhouse, R., Hong, W.-J., Hayslip, J., & Roboz, G. J. (2019). Venetoclax Combined With Low-Dose Cytarabine for Previously Untreated Patients With Acute Myeloid Leukemia : Results From a Phase Ib/II Study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(15), 1277-1284. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01600>
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5517), 727-730. <https://doi.org/10.1126/science.1059108>
- Weigel, K. J., Jakimenko, A., Conti, B. A., Chapman, S. E., Kaliney, W. J., Leevy, W. M., Champion, M. M., & Schafer, Z. T. (2014). CAF-Secreted IGFBPs Regulate Breast Cancer Cell Anoikis. *Molecular Cancer Research*, 12(6), Article 6. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0090>
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G. M., Budinger, G. R. S., & Chandel, N. S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8788-8793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003428107>
- Wendling, O., Bornert, J.-M., Chambon, P., & Metzger, D. (2009). Efficient temporally-controlled targeted mutagenesis in smooth muscle cells of the adult mouse. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 47(1), 14-18. <https://doi.org/10.1002/dvg.20448>
- Weng, C., Li, Y., Xu, D., Shi, Y., & Tang, H. (2005). Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(11), Article 11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412819200>
- Wertz, I. E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D. J., Helgason, E., Ernst, J. A., Eby, M., Liu, J., Belmont, L. D., Kaminker, J. S., O'Rourke, K. M., Pujara, K., Kohli, P. B., Johnson, A. R., Chiu, M. L., Lill, J. R., Jackson, P. K., ... Dixit, V. M. (2011). Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature*, 471(7336), 110-114. <https://doi.org/10.1038/nature09779>
- White, C., Li, C., Yang, J., Petrenko, N. B., Madesh, M., Thompson, C. B., & Foskett, J. K. (2005). The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. *Nature Cell Biology*, 7(10), 1021-1028. <https://doi.org/10.1038/ncb1302>
- Wietecha, M. S., Lauenstein, D., Cangkrama, M., Seiler, S., Jin, J., Goppelt, A., Claassen, M., Levesque, M. P., Dummer, R., & Werner, S. (2023). Phase-specific signatures of wound fibroblasts and matrix patterns define cancer-associated fibroblast subtypes. *Matrix Biology*, 119, 19-56. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2023.03.003>
- Williams, M. M., Lee, L., Hicks, D. J., Joly, M. M., Elion, D., Rahman, B., McKernan, C., Sanchez, V., Balko, J. M., Stricker, T., Estrada, M. V., & Cook, R. S. (2017). Key Survival Factor, Mcl-1, Correlates with Sensitivity to Combined Bcl-2/Bcl-xL Blockade. *Molecular Cancer Research: MCR*, 15(3), Article 3. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0280-T>
- Williams, R. T., Guarecuco, R., Gates, L. A., Barrows, D., Passarelli, M. C., Carey, B., Baudrier, L., Jeewajee, S., La, K., Prizer, B., Malik, S., Garcia-Bermudez, J., Zhu, X. G., Cantor, J., Molina, H., Carroll, T., Roeder, R. G., Abdel-Wahab, O., Allis, C. D., & Birsoy, K. (2020). ZBTB1 Regulates Asparagine Synthesis and Leukemia Cell Response to L-Asparaginase. *Cell Metabolism*, 31(4), 852-861.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.03.008>
- Wilson, T. R., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2006). Chemoresistance in solid tumours. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 17 Suppl 10, x315-324. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl280>
- Wortel, I. M. N., van der Meer, L. T., Kilberg, M. S., & van Leeuwen, F. N. (2017). Surviving Stress : Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 28(11), 794-806. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.07.003>
- Wu, F., Yang, J., Liu, J., Wang, Y., Mu, J., Zeng, Q., Deng, S., & Zhou, H. (2021). Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts and targeted therapy for cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1),

- Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00641-0>
- Wu, H.-J., Hao, M., Yeo, S. K., & Guan, J.-L. (2020). FAK signaling in cancer-associated fibroblasts promotes breast cancer cell migration and metastasis by exosomal miRNAs-mediated intercellular communication. *Oncogene*, *39*(12), 2539-2549. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1162-2>
- Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai, Z., Feng, T., Zhou, L., Tang, W., Zhan, L., Fu, X., Liu, S., Bo, X., & Yu, G. (2021). clusterProfiler 4.0 : A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation (Cambridge (Mass.))*, *2*(3), 100141. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141>
- Wu, X., Chen, X., Zhou, Q., Li, P., Yu, B., Li, J., Qu, Y., Yan, J., Yu, Y., Yan, M., Zhu, Z., Liu, B., & Su, L. (2013). Hepatocyte growth factor activates tumor stromal fibroblasts to promote tumorigenesis in gastric cancer. *Cancer Letters*, *335*(1), 128-135. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.002>
- Wu, X., Luo, Q., & Liu, Z. (2020). Ubiquitination and deubiquitination of MCL1 in cancer : Deciphering chemoresistance mechanisms and providing potential therapeutic options. *Cell Death & Disease*, *11*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02760-y>
- Wu, X., Tao, P., Zhou, Q., Li, J., Yu, Z., Wang, X., Li, J., Li, C., Yan, M., Zhu, Z., Liu, B., & Su, L. (2017). IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*, *8*(13), 20741-20750. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15119>
- Wynn, T. A., & Ramalingam, T. R. (2012). Mechanisms of fibrosis : Therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*, *18*(7), 1028-1040. <https://doi.org/10.1038/nm.2807>
- Xiao, Y., Nimmer, P., Sheppard, G. S., Bruncko, M., Hessler, P., Lu, X., Roberts-Rapp, L., Pappano, W. N., Elmore, S. W., Souers, A. J., Levenson, J. D., & Phillips, D. C. (2015). MCL-1 Is a Key Determinant of Breast Cancer Cell Survival : Validation of MCL-1 Dependency Utilizing a Highly Selective Small Molecule Inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*, *14*(8), 1837-1847. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0928>
- Xiao, Z., Dai, Z., & Locasale, J. W. (2019). Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution. *Nature Communications*, *10*(1), 3763. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11738-0>
- Xie, Y., Lei, X., Zhao, G., Guo, R., & Cui, N. (2023). mTOR in programmed cell death and its therapeutic implications. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *71-72*, 66-81. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2023.06.002>
- Xu, S., Yang, Z., Jin, P., Yang, X., Li, X., Wei, X., Wang, Y., Long, S., Zhang, T., Chen, G., Sun, C., Ma, D., & Gao, Q. (2018). Metformin Suppresses Tumor Progression by Inactivating Stromal Fibroblasts in Ovarian Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, *17*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0927>
- Yan, H., Guo, B.-Y., & Zhang, S. (2016). Cancer-associated fibroblasts attenuate Cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells by promoting STAT3 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *470*(4), 947-954. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.131>
- Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., & Bigner, D. D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England Journal of Medicine*, *360*(8), 765-773. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, *80*(2), 285-291. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90411-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90411-5)
- Yang, J., Altahan, A., Jones, D. T., Buffa, F. M., Bridges, E., Interiano, R. B., Qu, C., Vogt, N., Li, J.-L., Baban, D., Ragoussis, J., Nicholson, R., Davidoff, A. M., & Harris, A. L. (2015). Estrogen receptor- α directly regulates the hypoxia-inducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(49), 15172-15177. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422015112>
- Yang, L., Achreja, A., Yeung, T.-L., Mangala, L. S., Jiang, D., Han, C., Baddour, J., Marini, J. C., Ni, J., Nakahara, R., Wahlig, S., Chiba, L., Kim, S. H., Morse, J., Pradeep, S., Nagaraja, A. S.,

- Haemmerle, M., Kyunghee, N., Derichsweiler, M., ... Nagrath, D. (2016). Targeting Stromal Glutamine Synthetase in Tumors Disrupts Tumor Microenvironment-Regulated Cancer Cell Growth. *Cell Metabolism*, 24(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.011>
- Yang, L., Moss, T., Mangala, L. S., Marini, J., Zhao, H., Wahlig, S., Armaiz-Pena, G., Jiang, D., Achreja, A., Win, J., Roopaimoole, R., Rodriguez-Aguayo, C., Mercado-Uribe, I., Lopez-Berestein, G., Liu, J., Tsukamoto, T., Sood, A. K., Ram, P. T., & Nagrath, D. (2014). Metabolic shifts toward glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer. *Molecular Systems Biology*, 10, 728. <https://doi.org/10.1002/msb.20134892>
- Yang, L., Venneti, S., & Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 19(1), 163-194. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>
- Yanovich, G., Agmon, H., Harel, M., Sonnenblick, A., Peretz, T., & Geiger, T. (2018). Clinical Proteomics of Breast Cancer Reveals a Novel Layer of Breast Cancer Classification. *Cancer Research*, 78(20), 6001-6010. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1079>
- Yao, C.-H., Wang, R., Wang, Y., Kung, C.-P., Weber, J. D., & Patti, G. J. (2019). Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation. *eLife*, 8, e41351. <https://doi.org/10.7554/eLife.41351>
- Ye, J., Kumanova, M., Hart, L. S., Sloane, K., Zhang, H., De Panis, D. N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J. A., Ron, D., & Koumenis, C. (2010). The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *The EMBO Journal*, 29(12), 2082-2096. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.81>
- Ye, X.-Q., Li, Q., Wang, G.-H., Sun, F.-F., Huang, G.-J., Bian, X.-W., Yu, S.-C., & Qian, G.-S. (2011). Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *International Journal of Cancer*, 129(4), 820-831. <https://doi.org/10.1002/ijc.25944>
- Yecies, D., Carlson, N. E., Deng, J., & Letai, A. (2010). Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood*, 115(16), 3304-3313. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-233304>
- Yersal, O., & Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 412-424. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.412>
- Yi, C. H., Pan, H., Seebacher, J., Jang, I.-H., Hyberts, S. G., Heffron, G. J., Vander Heiden, M. G., Yang, R., Li, F., Locasale, J. W., Sharfi, H., Zhai, B., Rodriguez-Mias, R., Luithardt, H., Cantley, L. C., Daley, G. Q., Asara, J. M., Gygi, S. P., Wagner, G., ... Yuan, J. (2011). Metabolic regulation of protein N-alpha-acetylation by Bcl-xL promotes cell survival. *Cell*, 146(4), 607-620. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.050>
- Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W., & Yu, S. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research*, 22(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
- Yoo, H. C., Park, S. J., Nam, M., Kang, J., Kim, K., Yeo, J. H., Kim, J.-K., Heo, Y., Lee, H. S., Lee, M. Y., Lee, C. W., Kang, J. S., Kim, Y.-H., Lee, J., Choi, J., Hwang, G.-S., Bang, S., & Han, J. M. (2020). A Variant of SLC1A5 Is a Mitochondrial Glutamine Transporter for Metabolic Reprogramming in Cancer Cells. *Cell Metabolism*, 31(2), 267-283.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.020>
- Yoshimoto, G., Miyamoto, T., Jabbarzadeh-Tabrizi, S., Iino, T., Rocnik, J. L., Kikushige, Y., Mori, Y., Shima, T., Iwasaki, H., Takenaka, K., Nagafuji, K., Mizuno, S., Niino, H., Gilliland, G. D., & Akashi, K. (2009). FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. *Blood*, 114(24), Article 24. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-196055>
- Yu, D., Wu, Y., Shen, H., Lv, M., Chen, W., Zhang, X., Zhong, S., Tang, J., & Zhao, J. (2015). Exosomes in development, metastasis and drug resistance of breast cancer. *Cancer Science*, 106(8), 959-964. <https://doi.org/10.1111/cas.12715>
- Yu, Y., Xiao, C.-H., Tan, L.-D., Wang, Q.-S., Li, X.-Q., & Feng, Y.-M. (2014). Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *British Journal of Cancer*, 110(3), 724-732. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.768>

- Yuan, T., & Cantley, L. (2008). PI3K pathway alterations in cancer : Variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497-5510. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.245>
- Yuan, Y., Gu, Z.-X., Tao, X.-F., & Liu, S.-Y. (2012). Computer tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography or positron emission tomography/computer tomography for detection of metastatic lymph nodes in patients with ovarian cancer : A meta-analysis. *European Journal of Radiology*, 81(5), 1002-1006. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2011.01.112>
- Yuneva, M. O., Fan, T. W. M., Allen, T. D., Higashi, R. M., Ferraris, D. V., Tsukamoto, T., Matés, J. M., Alonso, F. J., Wang, C., Seo, Y., Chen, X., & Bishop, J. M. (2012). The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metabolism*, 15(2), 157-170. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.015>
- Zaal, E. A., & Berkers, C. R. (2018). The Influence of Metabolism on Drug Response in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00500>
- Zaghdoudi, S., Decaup, E., Belhabib, I., Samain, R., Cassant-Sourdy, S., Rochotte, J., Brunel, A., Schlaepfer, D., Cros, J., Neuzillet, C., Strelhaiano, M., Alard, A., Tomasini, R., Rajeeve, V., Perraud, A., Mathonnet, M., Pearce, O. M., Martineau, Y., Pyronnet, S., ... Jean, C. (2020). FAK activity in cancer-associated fibroblasts is a prognostic marker and a druggable key metastatic player in pancreatic cancer. *EMBO Molecular Medicine*, 12(11), e12010. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012010>
- Zagorodna, O., Martin, S. M., Rutkowski, D. T., Kuwana, T., Spitz, D. R., & Knudson, C. M. (2012). 2-deoxyglucose-induced toxicity is regulated by Bcl-2 family members and is enhanced by antagonizing Bcl-2 in lymphoma cell lines. *Oncogene*, 31(22), 2738-2749. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.454>
- Zangari, J., Petrelli, F., Maillot, B., & Martinou, J.-C. (2020). The Multifaceted Pyruvate Metabolism : Role of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *Biomolecules*, 10(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/biom10071068>
- Zangemeister-Wittke, U. (2003). Antisense to apoptosis inhibitors facilitates chemotherapy and TRAIL-induced death signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1002, 90-94. <https://doi.org/10.1196/annals.1281.019>
- Zantl, N., Weirich, G., Zall, H., Seiffert, B. M., Fischer, S. F., Kirschnek, S., Hartmann, C., Fritsch, R. M., Gillissen, B., Daniel, P. T., & Häcker, G. (2007). Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma : Evidence for contribution to apoptosis resistance. *Oncogene*, 26(49), 7038-7048. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210510>
- Zeisberg, E. M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2007). Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts. *Cancer Research*, 67(21), 10123-10128. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3127>
- Zeisberg, E. M., & Zeisberg, M. (2013). The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *The Journal of Pathology*, 229(2), 264-273. <https://doi.org/10.1002/path.4120>
- Zhang, D., Wang, Y., Shi, Z., Liu, J., Sun, P., Hou, X., Zhang, J., Zhao, S., Zhou, B. P., & Mi, J. (2015). Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by IDH3 α downregulation. *Cell Reports*, 10(8), 1335-1348. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.006>
- Zhang, J., Chen, L., Xiao, M., Wang, C., & Qin, Z. (2011). FSP1+ Fibroblasts Promote Skin Carcinogenesis by Maintaining MCP-1-Mediated Macrophage Infiltration and Chronic Inflammation. *The American Journal of Pathology*, 178(1), 382-390. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.017>
- Zhang, J., Li, S., Zhao, Y., Ma, P., Cao, Y., Liu, C., Zhang, X., Wang, W., Chen, L., & Li, Y. (2020). Cancer-associated fibroblasts promote the migration and invasion of gastric cancer cells via activating IL-17a/JAK2/STAT3 signaling. *Annals of Translational Medicine*, 8(14), 877. <https://doi.org/10.21037/atm-20-4843>
- Zhang, M., Lee, A. V., & Rosen, J. M. (2017). The Cellular Origin and Evolution of Breast Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(3), a027128. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027128>
- Zhang, R., Qi, F., Shao, S., Li, G., & Feng, Y. (2019). Human colorectal cancer-derived carcinoma associated fibroblasts promote CD44-mediated adhesion of colorectal cancer cells


- to endothelial cells by secretion of HGF. *Cancer Cell International*, 19, 192. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0914-y>
- Zhang, T., Zhao, C., Luo, L., Zhao, H., Cheng, J., & Xu, F. (2012). The expression of Mcl-1 in human cervical cancer and its clinical significance. *Medical Oncology*, 29(3), 1985-1991. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-0005-y>
- Zhang, Y., Ba, Y., Liu, C., Sun, G., Ding, L., Gao, S., Hao, J., Yu, Z., Zhang, J., Zen, K., Tong, Z., Xiang, Y., & Zhang, C.-Y. (2007). PGC-1alpha induces apoptosis in human epithelial ovarian cancer cells through a PPARgamma-dependent pathway. *Cell Research*, 17(4), 363-373. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.11>
- Zhang, Y., Choksi, S., Chen, K., Pobezienskaya, Y., Linnoila, I., & Liu, Z.-G. (2013). ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. *Cell Research*, 23(7), 898-914. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.75>
- Zhao, H., Yang, L., Baddour, J., Achreja, A., Bernard, V., Moss, T., Marini, J. C., Tudawe, T., Seviour, E. G., San Lucas, F. A., Alvarez, H., Gupta, S., Maiti, S. N., Cooper, L., Peehl, D., Ram, P. T., Maitra, A., & Nagrath, D. (2016). Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *eLife*, 5, e10250. <https://doi.org/10.7554/eLife.10250>
- Zhao, Y., Altman, B. J., Coloff, J. L., Herman, C. E., Jacobs, S. R., Wieman, H. L., Wofford, J. A., Dimascio, L. N., Ilkayeva, O., Kelekar, A., Reya, T., & Rathmell, J. C. (2007). Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. *Molecular and Cellular Biology*, 27(12), Article 12. <https://doi.org/10.1128/MCB.00153-07>
- Zhao, Y., Coloff, J. L., Ferguson, E. C., Jacobs, S. R., Cui, K., & Rathmell, J. C. (2008). Glucose Metabolism Attenuates p53 and Puma-dependent Cell Death upon Growth Factor Deprivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36344-36353. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803580200>
- Zhao, Y. H., Zhou, M., Liu, H., Ding, Y., Khong, H. T., Yu, D., Fodstad, O., & Tan, M. (2009). Upregulation of lactate dehydrogenase A by ErbB2 through heat shock factor 1 promotes breast cancer cell glycolysis and growth. *Oncogene*, 28(42), Article 42. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.229>
- Zhong, Q., Gao, W., Du, F., & Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell*, 121(7), Article 7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.009>
- Zhou, K., Sun, P., Zhang, Y., You, X., Li, P., & Wang, T. (2016). Estrogen stimulated migration and invasion of estrogen receptor-negative breast cancer cells involves an ezrin-dependent crosstalk between G protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor beta signaling. *Steroids*, 111, 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.01.021>
- Zhou, X., Tian, C., Cao, Y., Zhao, M., & Wang, K. (2023). The role of serine metabolism in lung cancer: From oncogenesis to tumor treatment. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2022.1084609>
- Zhou, Y., & Liu, F. (2022). Coordination of the AMPK, Akt, mTOR, and p53 Pathways under Glucose Starvation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14945. <https://doi.org/10.3390/ijms232314945>
- Zhou, Y., Wang, X., Zhang, J., He, A., Wang, Y. L., Han, K., Su, Y., Yin, J., Lv, X., & Hu, H. (2017). Artesunate suppresses the viability and mobility of prostate cancer cells through UCA1, the sponge of miR-184. *Oncotarget*, 8(11), 18260-18270. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15353>
- Zhou, Z., Cui, D., Sun, M.-H., Huang, J.-L., Deng, Z., Han, B.-M., Sun, X.-W., Xia, S.-J., Sun, F., & Shi, F. (2020). CAFs-derived MFAP5 promotes bladder cancer malignant behavior through NOTCH2/HEY1 signaling. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(6), 7970-7988. <https://doi.org/10.1096/fj.201902659R>
- Zhou, Z., Zhou, Q., Wu, X., Xu, S., Hu, X., Tao, X., Li, B., Peng, J., Li, D., Shen, L., Cao, Y., & Yang, L. (2020). VCAM-1 secreted from cancer-associated fibroblasts enhances the growth and invasion of lung cancer cells through AKT and MAPK signaling. *Cancer Letters*, 473, 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.12.039>
- Zhu, H., Yang, W., He, L., Ding, W., Zheng, L., Liao, S., Huang, P., Lu, W., He, Q., & Yang, B. (2012). Upregulating Noxa by ER Stress, Celastrol Exerts Synergistic Anti-Cancer Activity in Combination with ABT-737 in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *PLOS ONE*, 7(12), e52333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052333>

- Zhu, X., Han, S., Wu, S., Bai, Y., Zhang, N., & Wei, L. (2019). Dual role of twist1 in cancer-associated fibroblasts and tumor cells promoted epithelial-mesenchymal transition of esophageal cancer. *Experimental Cell Research*, 375(2), 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.01.002>
- Zhuang, J., Lu, Q., Shen, B., Huang, X., Shen, L., Zheng, X., Huang, R., Yan, J., & Guo, H. (2015). TGF β 1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT. *Scientific Reports*, 5, 11924. <https://doi.org/10.1038/srep11924>
- Ziani, L., Chouaib, S., & Thiery, J. (2018). Alteration of the Antitumor Immune Response by Cancer-Associated Fibroblasts. *Frontiers in Immunology*, 9, 414. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00414>
- Ziani, L., Safta-Saadoun, T. B., Gourbeix, J., Cavalcanti, A., Robert, C., Favre, G., Chouaib, S., & Thiery, J. (2017). Melanoma-associated fibroblasts decrease tumor cell susceptibility to NK cell-mediated killing through matrix-metalloproteinases secretion. *Oncotarget*, 8(12), 19780-19794. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15540>
- Zordoky, B., Bark, D., Soltys, C.-L., Sung, M., & Dyck, J. (2014). The anti-proliferative effect of metformin in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells is highly dependent on glucose concentration: Implications for cancer therapy and prevention. *Biochimica et biophysica acta*, 1840. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.023>
- Zou, Z.-Z., Nie, P.-P., Li, Y.-W., Hou, B.-X., Li, R., Shi, X.-P., Ma, Z.-K., Han, B.-W., & Luo, X.-Y. (2015). Synergistic induction of apoptosis by salinomycin and gefitinib through lysosomal and mitochondrial dependent pathway overcomes gefitinib resistance in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(14), 22414-22432. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5628>
- Zubair, M., Wang, S., & Ali, N. (2020). Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 632079. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.632079>

ANNEXES

Review

Mitochondria at Center of Exchanges between Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts during Tumor Progression

Lisa Nocquet , Philippe P. Juin and Frédérique Souazé *

Inserm, CRCINA, Université de Nantes, F-44000 Nantes, France; lisa.nocquet@univ-nantes.fr (L.N.); philippe.juin@univ-nantes.fr (P.P.J.)

* Correspondence: frederique.souaze@univ-nantes.fr

Received: 10 September 2020; Accepted: 14 October 2020; Published: 17 October 2020



Simple Summary: Malignant cells and their supportive associated fibroblasts (CAFs) exchange various molecules that promote energy production, biosynthesis and therapy resistance by modulating mitochondrial activity and dynamics. We herein review molecular exchanges from CAFs to malignant cells that support tumor growth and therapy resistance, and we highlight the crucial role of CAFs mitochondria in this support. This implies (1) reciprocal mitochondrial control by malignant cells and (2) fibroblast activation. Finally, we discuss therapeutic strategies that could improve current therapies by targeting mitochondrial-mediated dialogue between the two cell types.

Abstract: Resistance of solid cancer cells to chemotherapies and targeted therapies is not only due to the mutational status of cancer cells but also to the concurring of stromal cells of the tumor ecosystem, such as immune cells, vasculature and cancer-associated fibroblasts (CAFs). The reciprocal education of cancer cells and CAFs favors tumor growth, survival and invasion. Mitochondrial function control, including the regulation of mitochondrial metabolism, oxidative stress and apoptotic stress are crucial for these different tumor progression steps. In this review, we focus on how CAFs participate in cancer progression by modulating cancer cells metabolic functions and mitochondrial apoptosis. We emphasize that mitochondria from CAFs influence their activation status and pro-tumoral effects. We thus advocate that understanding mitochondria-mediated tumor–stroma interactions provides the possibility to consider cancer therapies that improve current treatments by targeting these interactions or mitochondria directly in tumor and/or stromal cells.

Keywords: cancer; cancer-associated fibroblast; mitochondria; metabolism; apoptosis; BCL-2 family proteins

1. Introduction

Mitochondria have been implicated in tumoral progression since Otto Warburg described mitochondrial dysfunction associated with glycolytic activity increase even under normoxia as a tumor promoter in 1927 [1]. Since then, it has been shown that mitochondria, even impaired, still provide malignant cells with energy and biosynthetic precursors, and control redox homeostasis and resistance to apoptosis. Indeed, the intrinsic pathway of apoptosis relies on mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) leading to caspases activation and subsequent loss of cell integrity. Thus, the mitochondrial apoptosis resistance process taking place up or downstream of MOMP is crucial to cancer cell survival.

Cancer cell interactions with others cell types, such as cancer-associated fibroblasts (CAFs), immune cells and endothelial cells, actively participate in tumor progression, including tumor growth,

survival and invasion [2]. In particular, CAFs and tumor cells strongly dialogue via soluble factors, exosomes, extracellular matrix components and direct contacts [3]. The two cell types educate each other to adapt to their nutritional and signaling environment. Glycolytic CAFs have been shown to enhance the contribution of mitochondria to energy production and biogenesis in cancer cells, also promoting tumor progression. This process was called the “Reverse Warburg Effect” [4]. Here, we focus on both mitochondrial metabolic activity and the apoptosis resistance of cancer cells under CAFs control. Importantly, the metabolic dialogue between CAFs and cancer cells implies a reciprocal influence of cancer cells on CAFs metabolism, which participates in their pro-tumoral effects. Moreover, cancer cells have been shown to attract and activate fibroblasts via cytokines and growth factors [5]. Here we focus on the implication of mitochondrial regulation in fibroblasts activation signaling pathways. Importantly, we discuss the heterogeneity of mitochondrial activities within tumors and between tumors, highlighting the complexity of targeting the metabolic dialogue and mitochondria directly, by using drugs in combination with current treatments.

2. CAFs Sustain Cancer Cells Mitochondria

2.1. CAFs Reorganize Cancer Cells' Mitochondrial Metabolism

Here, we focus on CAF/cancer cell metabolic interactions that impact malignant cells' mitochondria.

CAFs have been shown to fuel cancer cells with organic and amino acids. Pyruvate is an organic acid at the crossroad between glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS). It fuels the tricarboxylic acid (TCA) cycle and subsequent mitochondrial respiration. CAFs can directly provide cancer cells with pyruvate (as shown in lymphoma [6]), and also indirectly by providing lactate (as shown in prostate cancer [7,8] and breast cancer [4,9]) or alanine (as shown in pancreatic cancer [10]), both latter metabolites being transformed into pyruvate via active lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase, respectively. CAFs also fuel malignant cells with glutamine in glutamine-deprived conditions (as shown in ovarian cancer [11]), which is transformed into glutamate and then alpha-ketoglutarate to enter the TCA cycle and generate biosynthetic precursors. Of note, metabolites are not only exchanged from CAFs to cancer cells via their soluble forms since amino-acids and TCA cycle intermediates can be shuttled via exosomes, upregulating, in this case, glycolysis but reducing OXPHOS (as in prostate and pancreatic cancer cells [12]).

Thus, CAFs provide intermediate metabolites for malignant cells mitochondrial activity. More precisely, these metabolites fuel malignant cells' TCA cycle, which feeds biosynthetic pathways to produce key precursors such as lipids, proteins and nucleic acids, thus promoting primary and metastatic cell growth [7,10,11]. In some of the studies, TCA cycle modulation induced by CAFs even leads to higher malignant cell oxygen consumption, reflecting mitochondrial respiration increase [8,10]. In addition, a CAFs-induced increase in TCA cycle activity is associated with primary patient malignant cell survival [6]. Of note, CAF-induced metabolite consumption is enabled by the concomitant upregulation of metabolic transporters, such as lactate transporter MCT1 (in prostate cancer cells [4,7,13]).

Beside fueling TCA, lactate promotes mitochondrial biogenesis. Indeed, lactate consumption by metastatic prostate cancer cells under CAFs-control, via shifting NAD⁺/NADH cell equilibrium toward NAD⁺ that is a substrate of Sirtuins (SIRT) [14], activates SIRT1/PGC1 α axis that promotes mitochondrial biogenesis and activity [8]. CAFs might also favor cancer stem cell traits as SIRT1 has been shown to regulate cell stemness [15], and as this phenotype mainly relies on oxidative phosphorylation (in ovarian and breast cancer [16,17]). Moreover, SIRT1/PGC1 α axis is amplified by concomitant activation of proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src due to TCA cycle deregulation-induced reactive oxygen species (ROS) production [8]. Interestingly, ROS production, which is elicited by both respiratory chain overload and mild respiration dysfunction, has been shown to induce Src activation, promoting tumor cell migration [18]. Mitochondrial ROS, related to CAF-induced metabolic

reprogramming, could be involved in many other tumor progression mechanisms, since sustained ROS production promotes tumor proliferation, genetic instability and some treatments resistance [19].

Upregulated mitochondrial activity, associated with the downregulation of TCA cycle enzymes, can also lead to the accumulation of mitochondrial metabolites, called oncometabolites, when participating in tumor progression. For instance, CAF-induced mitochondrial fueling of prostate malignant cells leads to succinate and fumarate accumulation [8]. Importantly, succinate accumulation induces HIF1 α stabilization and subsequent oncogenic epithelial–mesenchymal transition (EMT). Fumarate accumulation has also been shown to favor EMT of renal cancer cells via epigenetic modifications [20], thus promoting invasion.

Some CAFs subpopulations have also been shown to reorganize cancer cell metabolism via secreting cytokines that favor glycolysis and TCA cycle intermediates production, resulting in tumor growth and invasion in breast and pancreatic cancers [21]. A similar cytokine-based interaction was shown in ovarian cancer, implying IL-6, CXCL-5 and CXCL-10, which promotes self-stored glycogen utilization by cancer cells to fuel glycolysis and subsequent mitochondrial activity [22]. CAFs' metabolic impact on cancer cells is summarized in Figure 1.

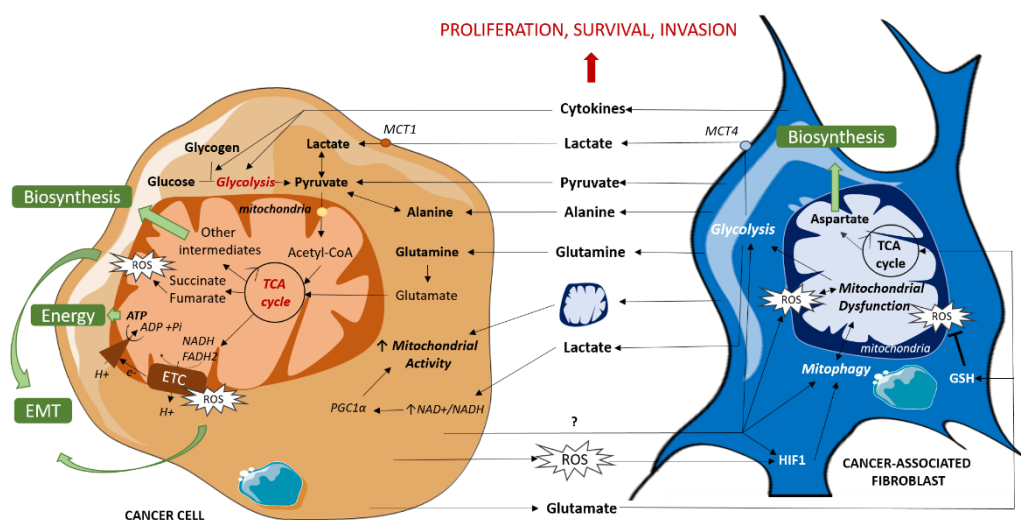


Figure 1. Metabolic dialogue between cancer cells and CAFs. CAFs fuel TCA cycle by directly providing cancer cells with organic (lactate, pyruvate) and amino acids (alanine, glutamine) or indirectly by enhancing glycolysis via cytokine release, resulting in an increase in mitochondrial activity which leads to energy and biosynthetic precursor production and redox state modulation. CAFs also enhance mitochondrial activity via mitochondrial transfers. In turn, cancer cells induce mitochondrial dysfunction in CAFs, mitophagy and ROS production, amplifying their mutual support. EMT: Epithelial Mesenchymal Transition, ETC: Electron Transport Chain, GSH: reduced glutathione, mtDNA: Mitochondrial DNA, MCT: MonoCarboxylate Transporter, ROS: Reactive Oxygen Species, TCA cycle: TriCarboxylic Acid cycle.

2.2. CAFs Provide Intact Mitochondria to Support Cancer Cells Mitochondrial Activity

Mitochondrial transfers occur between cancer cells and different cell types and are thought to happen in many cancers to optimize or repair the malignant cells' metabolic machinery [23], promoting cancer progression. Indeed, mtDNA transfer from in vivo local environment cells to mitochondrial deficient metastatic mammary and melanoma tumor cells in syngenic murine models was shown to restore the respiration of primary and metastatic tumor cells [24]. High relative mtDNA copy number resulting in a high bioenergetic mitochondrial function has been shown to confer an advantage for tumor invasion [25]. Active transfers of mitochondria from human mesenchymal stem cells (MSCs) and skin fibroblasts have also been shown to restore the mitochondrial network of mitochondrial deficient lung adenocarcinoma epithelial cells [26], and mitochondria uptake from MSCs has been

shown to promote breast cancer cells OXPHOS and proliferation as well as invasion [27]. Moreover, mitochondrial transfers from bone-marrow MSCs through the endocytic pathway protect leukemia initiating cells potential from ROS-inducing chemotherapy in acute myeloid leukemia [28]. Similar transfers from endothelial cells protect breast and ovarian tumor cells from doxorubicin-induced cell death in vitro [29].

CAFs also reshape mitochondrial network and genome expression in cancer cells. Indeed, primary CAFs have been shown to transfer mitochondria to cancer cells via cellular bridges, also called tunneling nanotubes, in prostate cancer [8] and acute lymphoblastic leukemia (ALL) [30]. Horizontal transfer of functional mitochondria from CAFs enhances prostate cancer cells mitochondrial mass and activity, thus fostering lactate-fueled respiration and further promoting malignancy [8]. In this study, malignant cells that are pre-incubated with CAFs conditioned media are more prone to receive mitochondria, suggesting that a prior education by CAFs is needed in this kind of interaction. Moreover, the transfer of mitochondrial mass in ALL cells from CAFs generated from primary MSCs under ROS-inducing chemotherapy protects cancer cells against the same ROS-inducing agent and is reversed by microtubule inhibition in vivo [30].

Although their frequency and triggering signals need to be further studied, such mitochondrial transfers from CAFs to cancer cells (Figure 1) support the idea of a strong and multifaceted interaction between the two cell types based on mitochondrial processing that promotes tumor malignancy.

2.3. CAFs Protect Cancer Cells Mitochondrial Integrity by Regulating Pro- and Anti-Apoptotic Proteins

CAFs also protect cancer cells from chemotherapies and specific pro-apoptotic drugs via the modulation of mitochondrial apoptosis-related proteins, favoring tumor escape and proliferation (Figure 2).

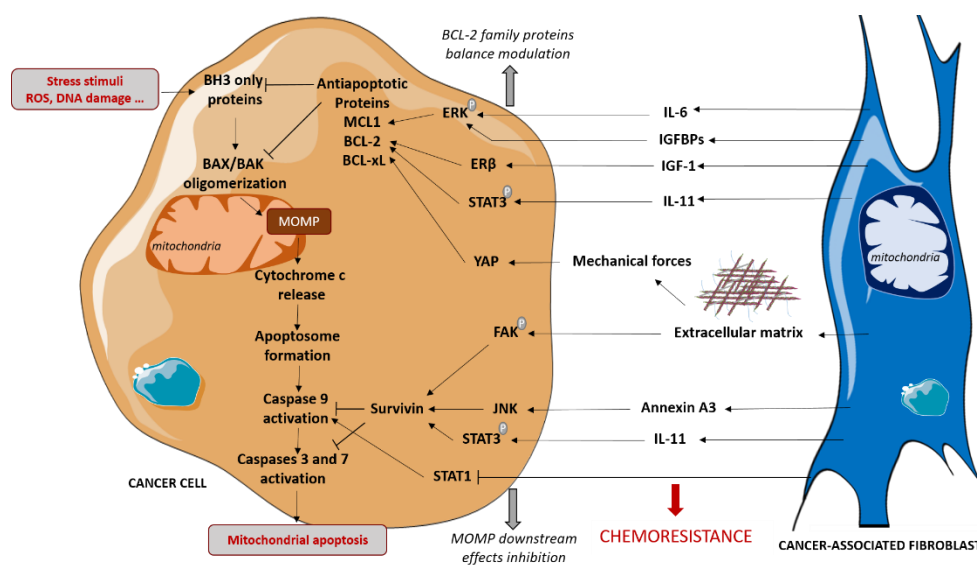


Figure 2. CAFs-mediated protection of cancer cells to mitochondrial apoptosis. CAFs induce chemoresistance in cancer cells by protecting them from mitochondrial apoptosis both by regulating anti-apoptotic proteins level and by limiting caspases activation. These effects are mediated by secretion of cytokines and growth factors and by extracellular matrix production, that is a feature of CAFs. IGF-1: Insulin-like Growth Factor-1, IGFBP: Insulin-like Growth Factor Binding Protein, IL: Interleukin, MOMP: mitochondrial Outer Membrane Permeabilization.

Stress stimuli, such as DNA damage or oxidative stress, can trigger BAX and/or BAK oligomerization at the mitochondrial membrane, resulting in mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP). This leads to the cytosolic release of cytochrome c, which induces caspases activation and consequent apoptosis. Stress stimuli alter the equilibrium between pro-

and anti-apoptotic BCL-2 family proteins involved in the regulation of BAX and BAK oligomerization. The anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and BCL-xL prevent MOMP via direct interactions with the pro-apoptotic proteins and have been shown to protect cancer cells from stress stimuli induced by chemotherapies [31]. CAFs favor chemoresistance by modulating some BCL-2 family anti-apoptotic protein levels in malignant cells. Indeed, under cisplatin treatment, CAFs promote the phosphorylation and activation of STAT3, which upregulates the levels of BCL-2 in ovarian cancer [32] and in lung adenocarcinoma triggered by IL11 paracrine signaling [33], thus resulting in chemoresistance. CAFs have also been shown to enhance BCL-2 protein levels in bladder cancer cells via the activation of IGF1/ER β signaling in cancer cells in vitro and in vivo [34]. Moreover, our team showed that CAFs protect luminal breast cancer cells from apoptosis by upregulating the anti-apoptotic MCL-1 in cancer cells via a paracrine IL-6 signaling, which triggers ERK phosphorylation [35]. CAFs-induced MCL-1 upregulation has also been shown to protect breast cancer cells from apoptosis during cell detachment, also known as anoikis. Indeed, CAFs-secreted IGF-binding proteins trigger the ERK/MAPK pathway in cancer cells and the subsequent inhibition of GSK3 that normally induces MCL-1 degradation [36]. To a larger extent, CAFs have been shown to render HER2+ breast cancer cells less sensitive to apoptosis [37]. In this study, the regulation of apoptotic threshold is implicated in CAFs protective effects to lapatinib, an EGFR/HER2 inhibitor. Notably, the elevation of apoptotic threshold implicates the JAK/STAT signaling pathway in both carcinoma cells and CAFs.

CAFs are a major source of extracellular matrix (ECM) components, such as type I collagen, fibronectin and laminin. MCL1 level has been shown to be upregulated in pancreatic cancer cells cultured on the type I collagen matrix, compared to plastic, conferring resistance to antimetabolite 5-fluorouracil [38]. Moreover, integrins expressed at cancer cells surface trigger survival signals when ligating to ECM components. Indeed, the decrease in BCL-2 protein level induced by paclitaxel treatment is blocked by the integrin-mediated cell attachment of cancer cells to collagen I, fibronectin or laminin, although the induction of signals depends on the cell lines [39]. These results suggest that CAFs could also modulate BCL-2 family proteins in cancer cells via ECM secretion. Interestingly, CAFs conditioned media have been shown to induce the expression of some integrins and BCL-2 in lung carcinoma cells [40]. Notably, integrin B1 and B3 overexpression in malignant cells promotes BCL-2 expression in this study. The mechanical force induced by CAFs-secreted ECM could also be implicated in anti-apoptotic proteins regulation since yes-associated protein (YAP), which can be regulated by mechanical forces [41], has been shown to promote BCL-2 expression in oral squamous carcinoma cells [42].

CAFs also protect cancer cells from chemotherapies by acting downstream of MOMP. Mürköster and colleagues have shown that etoposide resistance of pancreatic cancer cells induced by CAFs in a co-culture model does not rely on pro- nor anti-apoptotic BCL2 family protein regulation [43]. Instead, CAFs epigenetically downregulate caspase expression, inducing transcription factor STAT1, thus limiting caspases 9, 3 and 7 activation. In in vitro and in vivo lung cancer models, CAFs secretion of Annexin A3 has been shown to stimulate cancer cells survivin, known to inhibit caspases activity, thus leading to the decrease in caspases 3 and 8 cleavage under cisplatin treatment [44]. Similarly, CAFs protect lung and ovarian cancer cells from cisplatin via increasing survivin by promoting STAT3 phosphorylation [32,33]. CAFs also protect pancreatic cancer cells from gemcitabine by inducing survivin expression [45]. ECM also acts downstream of MOMP since laminin upregulates survivin by inducing focal adhesion kinase phosphorylation in pancreatic cancer cells, thus promoting chemoresistance [46].

Thus, CAFs have been shown to modulate the expression and activity of anti-apoptotic proteins of the BCL-2 family in cancer cells, resulting in drug resistance. Interestingly, these proteins have been shown to modulate mitochondrial metabolic function in different cell models. Indeed, BCL-2 promotes mitochondrial respiration in cancer cells, resulting in a pro-oxidant state in basal conditions [47], while BCL-xL stabilizes the inner membrane potential and thus modulates mitochondrial energetics in neurons [48]. Moreover, such non-canonical functions of the BCL-2 family anti-apoptotic proteins

can depend on their location, where they can interact with metabolic enzymes and transporters. For instance, MCL-1 interaction with outer mitochondrial membrane voltage-dependent anion channel (VDAC) has been shown to increase mitochondrial Ca²⁺ uptake and reactive oxygen species generation in lung cancer cells [49]. MCL-1 located at the mitochondrial matrix has also been shown to induce respiration in a mouse embryonic fibroblastic model [50]. BCL-xL can also interact with VDAC to favor the open configuration of the channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane in a murine pro-B lymphocytic cell line [51]. Furthermore, BCL-xL increases adenosine triphosphate ATP production within mitochondria by interacting with the β subunit of F(1)F(0) ATP synthase in neurons [52]. These studies show non-canonical functions of anti-apoptotic BCL-2, BCL-xL and MCL-1, related to mitochondrial function. One can suggest an interconnection between the regulation of mitochondrial function and the regulation of expression or activity of anti-apoptotic proteins of cancer cells in the pro-tumoral effects of CAFs. In particular, it would be interesting to establish whether CAFs modulate BCL-2 anti-apoptotic protein location and interactome with metabolic enzymes and transporters.

3. Mitochondrial Processing in CAFs Is Implicated in Their Pro-Tumoral Effects in an Ecosystemic Context

As seen above, CAFs participate in tumor progression via their ability to modulate mitochondrial activity. In this section, we report that this ability relies in part on mitochondrial stress of CAFs triggered by cancer cells, highlighting the reciprocal education between the two cell types. Importantly, mitochondrial processing in fibroblasts participates in their activation. We also discuss the heterogeneity of mitochondrial-mediated interactions between CAFs and cancer cells.

3.1. CAFs Mitochondrial Activity Is under Cancer Cells Control

Reciprocal education between CAFs and cancer cells is given in part by their metabolic crosstalk. Glycolytic switch in CAFs which mediates cancer cells metabolic changes is regulated by cancer cells themselves (Figure 1). Indeed, prostate cancer cells induce glycolytic switch in CAFs via the downregulation of mitochondrial deacetylase SIRT3 that promotes oxidative stress and HIF1 stabilization [7]. Oral squamous cell carcinoma cells have also been shown to metabolically reprogram normal oral fibroblasts in an indirect co-culture model by inducing mitochondrial dysfunction reported as ROS accumulation, mitochondrial permeability transition pore opening, hypoxia and mitophagy, associated with an increase in aerobic glycolysis [53]. Moreover, breast cancer cells have been shown to favor CAF oxidative stress via hydrogen peroxide secretion, leading to CAF autophagy and mitophagy mediated by HIF1 stabilization, and promoting mitochondrial dysfunction and enhanced glycolysis [54]. A recent study has shown that triple negative breast cancer cells can induce CAF glycolytic switch and mitophagy via exosome-mediated integrin ITGB4 export that induces ITGB4 expression by CAFs themselves [55]. In these studies, cancer-cell-triggered glycolytic CAFs secrete lactate. Importantly, this secretion is promoted by the upregulation of the monocarboxylate transporter MCT4 in CAFs [7,13,53,55].

Cancer cells, via mitochondrial processing, modulate other CAFs metabolic features involved in their pro-tumoral effects. Under stiff matrix conditions, squamous cell carcinoma cells have been shown to secrete glutamate that can be used by CAFs to fuel the TCA cycle and produce aspartate, that, in turn, fuels cancer cells for nucleotides biosynthesis, favoring tumor growth [56]. Notably, cancer-cell-secreted glutamate induces the glutathione pathway in CAFs, thus limiting the accumulation of ROS and superoxide induced by matrix stiffness. In a glutamine deprived co-culture ovarian cancer model, malignant cells have been shown to enhance TCA cycle activity in CAFs to maintain glutamate and citrate levels for glutamine synthesis, that is then secreted by CAFs to support cancer cells proliferation [11].

Altogether, CAFs metabolism that is involved in cancer cells mitochondrial processing is controlled by cancer cells themselves within a reciprocal mitochondrial education.

3.2. Mitochondrial Dynamics Is Involved in Fibroblasts Activation

Although CAFs can arise from bone marrow-derived precursors, mesenchymal stem cells, or endothelial cells, resident fibroblasts have been described as the major source of CAFs [57].

Mitochondrial activity and dynamics have been particularly implicated in TGF- β signaling leading to fibroblast activation into myofibroblasts, characterized by α SMA expression and invasive and migratory abilities. In normal human lung fibroblasts, mitochondrial ROS generated at mitochondrial respiratory chain complex III are required for TGF- β -induced gene expression, in particular, α SMA [58]. High mitochondrial generation of ROS caused by respiratory chain complex I dysfunction also correlates with myofibroblast activation [59]. TGF- β is not the only activation signaling modulated by mitochondria, since mitochondrial ROS have also been shown to regulate PDGF-induced signaling in primary mouse embryonic fibroblasts via oxidation of protein tyrosine phosphatases [60], possibly promoting fibroblast activation. Moreover, mitochondrial dynamics are involved in TGF- β signaling, since targeting mitochondrial-fission-mediator DRP-1 inhibits TGF- β -induced rat kidney fibroblast cell activation [61].

Interestingly, the acquisition of CAFs' metabolic characteristics by normal fibroblasts co-cultured with malignant cells precedes the acquisition of the fibroblast activation protein (FAP) and loss of Caveolin 1 [53]. This result suggests that metabolic reprogramming could participate in the activation of fibroblasts by cancer. Concordant with this, TGF- β -induced early increase in glycolysis in lung fibroblasts sustains transformation into myofibroblasts. More precisely, glycolysis increases the TCA cycle intermediate succinate, which stabilizes HIF1 α and promotes myofibroblastic differentiation [62], thus implicating metabolic mitochondrial function in TGF- β -induced fibroblast differentiation. Reduced mitochondrial α -ketoglutarate has also been shown to stabilize HIF1 α under normoxia in human colon CAFs under TGF- β or PDGF stimulation, thus favoring glycolysis. Of note, albeit no consensus was found, HIF1 α has been shown in several studies to permit oncogenic gain of functions in fibroblasts [63]. These results highlight the essential role of mitochondria in fibroblast activation.

Thus, fibroblast mitochondrial activity participates in the signaling pathways, leading to their activation. Within tumors, the fibroblast metabolic switch could either be an active phenomenon favoring their activation or a consequence of their activated state.

3.3. Mitochondrial-Mediated Interactions between CAFs and Cancer Cells Are Heterogeneous

CAFs exert specific metabolic and mitochondrial processing in cancer cells depending on cancer types and subtypes. As described earlier, the nature of the identified secreted nutrients and subsequent metabolism seems to vary according to the localization of the cancer—lactate in prostate cancer, lactate/pyruvate in breast cancer, alanine in pancreatic cancer and glutamine in ovarian cancer. This heterogeneity could originate from the specific metabolism of cancer cells [64], that could be a factor of strong interaction between cancer cells and CAFs. Additional to these disparities between cancer, depending on the tissue they originate from, intra-tumoral heterogeneity could be a source of varying cancer cells/CAF interactions. As previously reviewed by Strickaert and colleagues [65], the concept of tumor heterogeneity includes the diversity of the cell populations, including stromal cells, the cell location within the tumor, the epigenetic and genetic effects in cancer cells over time and, eventually, the variation in metabolism, all of these being strikingly linked to each other. Concerning cell location within the tumor, by using a micro-patterned co-culture model consisting in a breast cancer cell (MCF7) island surrounded by stromal cells, it has been shown that stromal mechanical constraints induce spatial heterogeneity of mitochondrial activities in cancer cells, with an impact on metabolism and the metastatic potential of cancer cells [66]. On the other hand, in melanoma, it has been reported that heterogeneity in MCT1-high and MCT1-negative or low expressing cancer cells discriminate their metastatic potential. MCT1-high cells uptake more lactate and are more efficient to metastasize, implying that glycolytic CAFs exert a differential pro-metastatic effect on these melanoma cell sub-populations [67]. Moreover, metabolic heterogeneity has been shown within malignant cells of mammary tumors by single-cell transcriptomics in a MMTV-PyMT mouse

model [68]. Indeed, one PyMT cell subpopulation expresses higher levels of genes involved in OXPHOS, while another shows higher glycolytic process gene expression. Intra-tumoral malignant cell metabolic heterogeneity could either be the result of the interactions with CAFs or could directly modulate this interaction, resulting in different pro-tumoral effects. In human breast cancer, metabolic interaction between cancer and stromal cells could further vary according to molecular subtype [69]. Indeed, this immunohistochemical study suggests a correlation between the subtype and the metabolic phenotype of the tumor (Warburg type with glycolytic tumor cells and non-glycolytic stroma or Reverse Warburg type with non-glycolytic tumor cells and glycolytic stroma). Moreover, the secreted intermediates that modulate mitochondrial function are specific of certain subtypes of cancer. It seems the case with breast-cancer-cell-secreted ITGB4 that it is mainly secreted by triple negative breast cancer cell lines, and more specifically by some of the lines of this molecular subtype [55].

The heterogeneity of the mitochondrial-mediated dialogue between CAFs and cancer cells can also be highlighted by the heterogeneity of mitochondrial activity of CAFs within tumor. CAFs are indeed heterogeneous within tumors, which could be explained by their adaptability to their environment. Determining whether CAFs mitochondrial activity also depends on their diverse cellular origins [70] would be of particular interest. Costa and colleagues identified four subsets of CAFs within breast tumors from patients [71]. RNA sequencing shows that one subset, called S4 and characterized among others by high α SMA expression and low FAP expression, exhibits gene enrichment in oxidative metabolism. The four subsets have also been identified in ovarian cancer [72]. In this latter model, the S4 subset exhibits a strong enrichment in genes encoding electron transport chain proteins. Moreover, Qian and colleagues recently identified metabolic heterogeneity between CAFs subpopulations commonly found in colorectal, ovarian and lung tumors, with some populations characterized by glycolytic signature, based on single-cell analysis of transcription factor activities [73]. These studies suggest heterogeneity in CAFs mitochondrial function within the tumor. Costa and colleagues also show specific spatial distribution with subsets S1 and S4 preferentially accumulating in the tumor while the other subtypes are found in juxta-tumors. Of note, CAFs present in juxta-tumors are enriched in CAFs with genes involved in oxidative stress, potentially revealing mitochondrial dysfunction. These results suggest that spatial proximity to the tumor could be important for CAF mitochondrial function. CAFs have indeed been shown to adapt their metabolism to the nutritional context [74], that is mainly influenced by cancer cells metabolic activity.

Thus, the interactions between CAFs and cancer cells and the consequences on mitochondrial functions depend on cancer type and seem heterogeneous within tumors, emphasizing the complexity of the understanding of the dialogue between the two cell types.

4. Targeting Mitochondria to Counteract CAF-Cancer Cells Symbiosis in Tumor Ecosystems

Targeting the tumor-stroma symbiotic crosstalk is an emerging strategy in cancer therapy. As a core platform in the pro-tumoral dialogue between CAFs and cancer cells, mitochondria must be a key target to improve current therapies in cancers. Among the targetable mitochondrial function in tumor ecosystems, we focus here on the two major pathways presented in the previous sections, namely energy metabolic activity and apoptosis. Besides their impact on tumor progression, mitochondrial generation of energy and valuable intermediates, glycolysis and oxidative phosphorylation promote therapy resistance [75]. By their ability to prevent mitochondrial apoptosis, one of the causes of the limited therapy efficacy and drug resistance, BCL-2 family members arise as potential targets in cancers.

4.1. Targeting Metabolites Bidirectional Exchanges between CAFs and Cancer Cells

As largely described, glycolytic CAFs can sustain cancer cells with lactate (and its derivative—e.g., pyruvate) to fuel mitochondrial activity and promote cancer progression [4,7–9]. One promising drug to limit lactate shuttle between glycolytic CAFs and cancer cells is dichloroacetate (DCA) [76]. DCA, by inhibiting pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) enhances the pyruvate dehydrogenase (PDH) activity and increases the subsequent entry of pyruvate into the Krebs cycle. It results in a decrease

in lactate secretion and aerobic glycolysis. It was recently shown that extinction of PDK in α SMA+ fibroblasts co-injected with 4T1 cells in an orthotopic tumors model decreases tumor growth [77]. In the same study, the authors show that breast cancer derived human CAFs are pro-glycolytic compared to fibroblasts from benign lesions. This reinforces the idea that therapeutic agents targeting glycolysis, such as DCA or 2-Deoxy-D-glucose (2DG), could be used to counteract metabolic fueling of cancer cells by CAFs. Thus, combined treatments with DCA and 2-DG block the tumor growth of MDA-MB231 induced by the highly glycolytic Caveolin-/- fibroblasts [78]. Nevertheless, the anti-tumoral effect of DCA on cancer cells is controversial due to its various impact on different models, such as in colonic cancers [79]. Further studies need to be conducted to precise the different pyruvate metabolic pathways in cancer cells under CAFs influence. This should lead to identify the metabolic phenotype in which forcing cells to perform OXPHOS with DCA is a benefit to alleviate the tumor growth.

The reciprocal transfer of lactate from cancer cells to CAFs has also been shown to enhance tumor progression and therapy resistance, making the monocarboxylate transporters (MCTs) responsible for lactate exchange, a promising target in cancers. Lactate and lactate derived metabolites cell–cell shuttle occurs via MCT1-MCT4 against which different inhibitors have been developed, such as α -cyano-4-OH-cinnamate (CHC) (Pan inhibitor), AR-C155858 (MCT-1/2 inhibitor), and AZD3965 (MCT-1 inhibitor) [80]. Although AZD3965 or MCT-1/4 silencing drastically decreases tumor growth in xenograft tumor models, whether or not their efficacy results in a disruption in CAF-cancer cells dialogue has not been established [81,82]. Nevertheless, Fiaschi and colleagues show, in vitro and in vivo, that CAFs' supporting role on prostate cancer cell growth is drastically reversed by CHC treatment or MCT-1 silencing in cancer cells [7]. MCT-1 also enables pyruvate transfer, which has been shown to be secreted by CAFs to fuel breast cancer cells [83]. Therefore, in glycolytic breast cancer cells, MCT-1 inhibition with AZD3965 results in disruption of pyruvate transport rather than lactate and is accompanied by an increase in intracellular pyruvate concentration and oxygen consumption rate [81]. These results raise the question of targeting pyruvate metabolism and especially mitochondrial pyruvate transport. In this way, Feron's team identified 7ACC2, a compound initially described to specifically block lactate influx, as a mitochondrial pyruvate transport inhibitor. This study shows that 7ACC2 slows down tumor growth by sequentially disrupting mitochondrial pyruvate entry, generating intracellular pyruvate accumulation and limiting lactate influx [84]. This suggests that blocking the mitochondrial pyruvate carrier could have a strong cytotoxic effect by simultaneously inhibiting lactate uptake and mitochondrial respiratory metabolism. Interestingly, the blockade of lactate/pyruvate exchange by increasing glycolysis and oxygen availability improves sensitivity to radiotherapy [84,85].

Numerous studies show an increase in oxidative phosphorylation in cancer cells under pressure from microenvironmental CAFs. As reported above in Section 2.1, CAF-induced OXPHOS activity in cancer cells is related to amino-acid supply, such as glutamine in ovarian tumor or alanine in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), of the latter by the former [10,11]. Unfortunately, monotherapy using glutaminase inhibitor fails to impact tumor growth in vivo [86]. Yang and colleagues showed that blocking glutamine synthesis in CAFs and glutamine catabolism in cancer cells improves therapeutic outcomes in an orthotopic mouse model of ovarian carcinoma [11]. The blockade of amino acid exchange in metabolic support from CAFs to cancer cells remains a therapeutic challenge as Parker and colleagues identify SLC38A2 as a unique critical alanine transporter in PDAC tumorigenesis [87].

In addition to targeting specific shuttles to counteract metabolic symbiosis between CAF and cancer cells, alternatively targeting the resulting metabolic reprogramming in cancer cells could be completed. Direct OXPHOS targeting in tumor–stroma metabolic dialogue could also be achieved using metformin, which functions in part through the inhibition of mitochondrial respiratory chain activity or the activation of AMP activated protein kinase [88]. By inducing cancer cell death and improving sensitivity to other therapies, the potential use of metformin in tumor treatment is attractive. Metformin disrupts tumor-stromal crosstalk by inactivating CAF and preventing their subsequent secretion of pro-tumoral factors such as SDF-1 and IL-8 in breast cancer or IL-6 in ovarian cancer [89,90]. The two latter studies show only an effect on tumor growth when CAF have been pretreated but the effect of metformin

on cancer cells in their micro-environment was not investigated. Indeed, the efficacy of metformin in cancer treatment is not conclusive. One explanation could be that, although metformin reverses the CAF-activated state without inducing cell death, normal fibroblasts could by themselves block metformin induced cancer cell apoptosis [91]. The lack of efficacy of metformin as a single agent has also been retrieved in a model of pancreatic microtumors, consisting in MiaPaCa2 cells and patient derived CAFs in 3D spheroids, despite a significant reduction in redox states. However, adjuvant treatment with metformin overcomes resistance to oxaliplatin or photodynamic therapy induced by CAFs [82].

4.2. Targeting Mitochondrial Apoptosis

Most anticancer drugs currently used in clinical oncology exploit mitochondrial apoptotic signaling pathway to trigger cancer cell death. Cancer cells can escape apoptosis by modifying the equilibrium between the anti- and pro-apoptotic members, including BH3-only proteins of the BCL2 family. Small molecules, named BH-3 mimetics, which functionally replicate the pro-apoptotic effect of BH3-only proteins and can therefore specifically counterbalance the effect of pro-survival proteins (BCL-2, BCL-xL and MCL-1), have been developed. We reported above in Section 2 that CAFs can help malignant cells to escape cell death by modulating sensitivity to apoptosis in these cells [35,37]. Thus, BH-3 mimetics provide opportunity to counteract CAF induced chemoresistance. Consistently, using synthetic lethality screen, Marusyk and colleagues identify BCL-2/BCL-xL inhibitors (ABT-737 and ABT-263) as candidates to overcome CAF-induced resistance to lapatinib in breast cancers [37]. In luminal breast cancer cells, we have shown that CAFs conditioned-media-induced apoptotic resistance to BCL-2/BCL-xL inhibitors could be completely reversed with a BH-3 mimetic targeting MCL-1 (A1210477). Of note, the combination of the two inhibitors ABT-737 and A-1210477 leads to the death of both cancer cells and CAFs [35].

Regarding the pro-tumorigenic effects of CAFs, it is tempting to directly target CAFs in therapy by inducing apoptosis, provided the strategy selectively kills activated fibroblasts. The ability of BH-3 mimetics to trigger apoptosis is governed by the “primed for death” state of the cells [92]. Nevertheless, due to CAFs heterogeneity, prior to be therapeutically exploited, a precise knowledge of the apoptosis priming of the distinct CAFs subsets, including pro-tumoral and anti-tumoral populations, is needed. As it is, there are differences in mitochondrial priming between normal and activated fibroblasts, but also between CAFs, depending the type of cancers they originate from. Using the BH3 profiling technique, it has been suggested in a fibrosis model that activated myofibroblast is primed to apoptosis, as targeting BCL-2/BCL-xL with ABT-263 induces apoptosis in fibroblasts exclusively when they are mechano-activated. The forced expression of α SMA in fibroblasts led to the same results by inducing BCL-xL expression in a YAP-TAZ dependent manner [93]. We also showed that contrary to normal fibroblasts, breast CAFs rely on MCL-1 for their survival. This could be related to their activated state as normal human lung fibroblasts become sensitive to MCL-1 inhibition following their “activation” by TGF- β concomitantly with α SMA expression and MCL-1 protein stabilization [35]. Differently, in cholangiocarcinoma, cancer-cell-secreted PDGF (previously reported to promote CAF activation) was shown to induce apoptotic priming of CAFs. It is likely to occur by the facilitation of binding of Bak to BCL-2, which renders the CAFs more sensitive to ABT-263 [94]. In accordance with this, ABT-263 treatment depletes CAFs, reduces tumor burden and decreases lymphatic vascularization and metastasis in cholangiocarcinoma in vivo [94–96]. Although dependence of apoptosis priming to the CAFs activated state seems fairly consensual, it remains that, depending on the tissue, CAFs rely on different anti-apoptotic proteins for their survival. Whether BH-3 mimetics modulate stroma aggressiveness by targeting distinct CAF subpopulations within the tumor remains an open question.

5. Conclusions

Emerging therapeutic strategies aim to overcome CAF-cancer cells’ pro-tumoral symbiosis on the one hand and to target mitochondria in cancers on the other hand. Numerous studies address the pro-tumoral metabolic reprogramming of cancer cells by CAFs and identify attractive pharmacological

targets. Nevertheless, the preclinical validation of these targets in a CAF-cancer cell context remains poorly investigated. Moreover, metabolic drugs are controversial because of their off-target effects on normal cells. Due to the obvious reciprocal influence between CAFs and cancer cells regarding their mitochondrial functions—i.e., metabolic activity and apoptosis resistance—it might be more efficient to target the two cellular processes in a context of tumoral ecosystem. However, both therapeutic options are limited by the heterogeneity of CAFs/cancer cell dialogue and apoptotic priming, originating from cancer subtype and stage, and presence within the tumor. This emphasizes the importance of models used to study mitochondrial implications in tumor–stroma mutual support. Finally, the understanding of close interactions between cellular metabolic features and mitochondrial apoptosis could help to find better targets in cancer therapies.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, L.N. and F.S.; writing—review and editing, P.P.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by Ligue contre le cancer Grand-ouest, Institut de Cancérologie de l’Ouest (ICO)—Odyssea, Cancéropôle Grand-Ouest CONCERTO and the SIRIC ILIAD program.

Acknowledgments: This manuscript was prepared in the context of the SIRIC ILIAD program supported by the French Ministry Higher Education and Research and Innovation (MESRI) (research grant to L.N.) and the Institute for Health and Medical Research (Inserm). We thank Thomas Bonneaud for fruitful discussion.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

ATP	Adenosine TriPhosphate
CAF	Cancer-Associated Fibroblast
ECM	ExtraCellular Matrix
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ETC	Electron Transport Chain
GSH	reduced glutathione
HIF	Hypoxia Inducible Factor
IGF	Insulin-like Growth Factor
ITGB4	Integrin Beta 4
MCT	MonoCarboxylate Transporter
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
mtDNA	mitochondrial DNA
PGC1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
ROS	Reactive Oxygen Species
TAZ	Transcriptional coActivator with PDZ-binding motif
TCA	TriCarboxylic Acid
YAP	Yes-Associated Protein

References

1. Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J. Gen. Physiol.* **1927**, *8*, 519–530. [[CrossRef](#)]
2. Quail, D.F.; Joyce, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1423–1437. [[CrossRef](#)]
3. Elenbaas, B.; Weinberg, R.A. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp. Cell Res.* **2001**, *264*, 169–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Pavlides, S.; Whitaker-Menezes, D.; Castello-Cros, R.; Flomenberg, N.; Witkiewicz, A.K.; Frank, P.G.; Casimiro, M.C.; Wang, C.; Fortina, P.; Addya, S.; et al. The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 3984–4001. [[CrossRef](#)]
5. Kuzet, S.E.; Gaggioli, C. Fibroblast activation in cancer: When seed fertilizes soil. *Cell Tissue Res.* **2016**, *365*, 607–619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Sakamoto, A.; Kunou, S.; Shimada, K.; Tsunoda, M.; Aoki, T.; Iriyama, C.; Tomita, A.; Nakamura, S.; Hayakawa, F.; Kiyoi, H. Pyruvate secreted from patient-derived cancer-associated fibroblasts supports survival of primary lymphoma cells. *Cancer Sci.* **2019**, *110*, 269–278. [[CrossRef](#)]
7. Fiaschi, T.; Marini, A.; Giannoni, E.; Taddei, M.L.; Gandellini, P.; de Donatis, A.; Lanciotti, M.; Serni, S.; Cirri, P.; Chiarugi, P. Reciprocal Metabolic Reprogramming through Lactate Shuttle Coordinately Influences Tumor-Stroma Interplay. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 5130–5140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ippolito, L.; Morandi, A.; Taddei, M.L.; Parri, M.; Comito, G.; Iscaro, A.; Raspollini, M.R.; Magherini, F.; Rapizzi, E.; Masquelier, J.; et al. Cancer-associated fibroblasts promote prostate cancer malignancy via metabolic rewiring and mitochondrial transfer. *Oncogene* **2019**, *38*, 5339–5355. [[CrossRef](#)]
9. Sun, K.; Tang, S.; Hou, Y.; Xi, L.; Chen, Y.; Yin, J.; Peng, M.; Zhao, M.; Cui, X.; Liu, M. Oxidized ATM-mediated glycolysis enhancement in breast cancer-associated fibroblasts contributes to tumor invasion through lactate as metabolic coupling. *EBioMedicine* **2019**, *41*, 370–383. [[CrossRef](#)]
10. Sousa, C.M.; Biancur, D.E.; Wang, X.; Halbrook, C.J.; Sherman, M.H.; Zhang, L.; Kremer, D.; Hwang, R.F.; Witkiewicz, A.K.; Ying, H.; et al. Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature* **2016**, *536*, 479–483. [[CrossRef](#)]
11. Yang, L.; Achreja, A.; Yeung, T.L.; Mangala, L.S.; Jiang, D.; Han, C.; Baddour, J.; Marini, J.C.; Ni, J.; Nakahara, R.; et al. Targeting Stromal Glutamine Synthetase in Tumors Disrupts Tumor Microenvironment-Regulated Cancer Cell Growth. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 685–700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zhao, H.; Yang, L.; Baddour, J.; Achreja, A.; Bernard, V.; Moss, T.; Marini, J.C.; Tudawe, T.; Seviour, E.G.; San Lucas, F.A.; et al. Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *eLife* **2016**, *5*, e10250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Whitaker-Menezes, D.; Martinez-Outschoorn, U.E.; Lin, Z.; Ertel, A.; Flomenberg, N.; Witkiewicz, A.K.; Birbe, R.; Howell, A.; Pavlides, S.; Gandara, R.; et al. Evidence for a stromal-epithelial “lactate shuttle” in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 1772–1783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Haigis, M.C.; Sinclair, D.A. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2010**, *5*, 253–295. [[CrossRef](#)]
15. O’Callaghan, C.; Vassilopoulos, A. Sirtuins at the crossroads of stemness, aging, and cancer. *Aging Cell* **2017**, *16*, 1208–1218. [[CrossRef](#)]
16. Pastò, A.; Bellio, C.; Pilotto, G.; Ciminale, V.; Silic-Benussi, M.; Guzzo, G.; Rasola, A.; Frasson, C.; Nardo, G.; Zulato, E.; et al. Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation. *Oncotarget* **2014**, *5*, 4305–4319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Vlashi, E.; Lagadec, C.; Vergnes, L.; Reue, K.; Frohnen, P.; Chan, M.; Alhiyari, Y.; Dratver, M.B.; Pajonk, F. Metabolic differences in breast cancer stem cells and differentiated progeny. *Breast Cancer Res. Treat.* **2014**, *146*, 525–534. [[CrossRef](#)]
18. Porporato, P.E.; Payen, V.L.; Pérez-Escuredo, J.; de Saedeleer, C.J.; Danhier, P.; Copetti, T.; Dhup, S.; Tardy, M.; Vazeille, T.; Bouzin, C.; et al. A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Rep.* **2014**, *8*, 754–766. [[CrossRef](#)]
19. Pelicano, H.; Carney, D.; Huang, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updates* **2004**, *7*, 97–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Sciacovelli, M.; Gonçalves, E.; Johnson, T.I.; Zecchini, V.R.; da Costa, A.S.H.; Gaude, E.; Drubbel, A.V.; Theobald, S.J.; Abbo, S.R.; Tran, M.G.B.; et al. Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature* **2016**, *537*, 544–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Demircioglu, F.; Wang, J.; Candido, J.; Costa, A.S.H.; Casado, P.; Delgado, B.D.L.; Reynolds, L.E.; Gomez-Escudero, J.; Newport, E.; Rajeeve, V.; et al. Cancer associated fibroblast FAK regulates malignant cell metabolism. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Curtis, M.; Kenny, H.A.; Ashcroft, B.; Mukherjee, A.; Johnson, A.; Zhang, Y.; Helou, Y.; Batlle, R.; Liu, X.; Gutierrez, N.; et al. Fibroblasts Mobilize Tumor Cell Glycogen to Promote Proliferation and Metastasis. *Cell Metab.* **2019**, *29*, 141–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rebbeck, C.A.; Leroi, A.M.; Burt, A. Mitochondrial Capture by a Transmissible Cancer. *Science* **2011**, *331*, 303. [[CrossRef](#)]

24. Tan, A.S.; Baty, J.W.; Dong, L.F.; Bezawork-Geleta, A.; Endaya, B.; Goodwin, J.; Bajzikova, M.; Kovarova, J.; Peterka, M.; Yan, B.; et al. Mitochondrial Genome Acquisition Restores Respiratory Function and Tumorigenic Potential of Cancer Cells without Mitochondrial DNA. *Cell Metab.* **2015**, *21*, 81–94. [[CrossRef](#)]
25. Lin, C.S.; Lee, H.T.; Lee, S.Y.; Shen, Y.A.; Wang, L.S.; Chen, Y.J.; Wei, Y.H. High Mitochondrial DNA Copy Number and Bioenergetic Function are Associated with Tumor Invasion of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 11228–11246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Spees, J.L.; Olson, S.D.; Whitney, M.J.; Prockop, D.J. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1283–1288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Caicedo, A.; Fritz, V.; Brondello, J.M.; Ayala, M.; Dennemont, I.; Abdellaoui, N.; de Fraipont, F.; Moisan, A.; Prouteau, C.A.; Boukhaddaoui, H.; et al. MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Moschoi, R.; Imbert, V.; Nebout, M.; Chiche, J.; Mary, D.; Prebet, T.; Saland, E.; Castellano, R.; Pouyet, L.; Collette, Y.; et al. Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood* **2016**, *128*, 253–264. [[CrossRef](#)]
29. Pasquier, J.; Guerrouahen, B.S.; Al Thawadi, H.; Ghiabi, P.; Maleki, M.; Abu-Kaoud, N.; Jacob, A.; Mirshahi, M.; Galas, L.; Rafii, S.; et al. Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *J. Transl. Med.* **2013**, *11*, 94. [[CrossRef](#)]
30. Burt, R.; Dey, A.; Aref, S.; Aguiar, M.; Akarca, A.; Bailey, K.; Day, W.; Hooper, S.; Kirkwood, A.; Kirschner, K.; et al. Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress. *Blood* **2019**, *134*, 1415–1429. [[CrossRef](#)]
31. Maji, S.; Panda, S.; Samal, S.K.; Shriwas, O.; Rath, R.; Pellecchia, M.; Emdad, L.; Das, S.K.; Fisher, P.B.; Dash, R. Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. In *Advances in Cancer Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 137, pp. 37–75. ISBN 978-0-12-815123-5.
32. Yan, H.; Guo, B.Y.; Zhang, S. Cancer-associated fibroblasts attenuate Cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells by promoting STAT3 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *470*, 947–954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tao, L.; Huang, G.; Wang, R.; Pan, Y.; He, Z.; Chu, X.; Song, H.; Chen, L. Cancer-associated fibroblasts treated with cisplatin facilitates chemoresistance of lung adenocarcinoma through IL-11/IL-11R/STAT3 signaling pathway. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38408. [[CrossRef](#)]
34. Long, X.; Xiong, W.; Zeng, X.; Qi, L.; Cai, Y.; Mo, M.; Jiang, H.; Zhu, B.; Chen, Z.; Li, Y. Cancer-associated fibroblasts promote cisplatin resistance in bladder cancer cells by increasing IGF-1/ER β /Bcl-2 signalling. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Louault, K.; Bonneaud, T.L.; Séveno, C.; Gomez-Bougie, P.; Nguyen, F.; Gautier, F.; Bourgeois, N.; Loussouarn, D.; Kerdraon, O.; Barillé-Nion, S.; et al. Interactions between cancer-associated fibroblasts and tumor cells promote MCL-1 dependency in estrogen receptor-positive breast cancers. *Oncogene* **2019**, *38*, 3261–3273. [[CrossRef](#)]
36. Weigel, K.J.; Jakimenko, A.; Conti, B.A.; Chapman, S.E.; Kaliney, W.J.; Leevy, W.M.; Champion, M.M.; Schafer, Z.T. CAF-Secreted IGFBPs Regulate Breast Cancer Cell Anoikis. *Mol. Cancer Res.* **2014**, *12*, 855–866. [[CrossRef](#)]
37. Marusyk, A.; Tabassum, D.P.; Janiszewska, M.; Place, A.E.; Trinh, A.; Rozhok, A.I.; Pyne, S.; Guerriero, J.L.; Shu, S.; Ekram, M.; et al. Spatial Proximity to Fibroblasts Impacts Molecular Features and Therapeutic Sensitivity of Breast Cancer Cells Influencing Clinical Outcomes. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 6495–6506. [[CrossRef](#)]
38. Armstrong, T. Type I Collagen Promotes the Malignant Phenotype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7427–7437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Aoudjit, F.; Vuori, K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* **2001**, *20*, 4995–5004. [[CrossRef](#)]
40. An, J.; Enomoto, A.; Weng, L.; Kato, T.; Iwakoshi, A.; Ushida, K.; Maeda, K.; Ishida-Takagishi, M.; Ishii, G.; Ming, S.; et al. Significance of cancer-associated fibroblasts in the regulation of gene expression in the leading cells of invasive lung cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2013**, *139*, 379–388. [[CrossRef](#)]
41. Dupont, S.; Morsut, L.; Aragona, M.; Enzo, E.; Giulitti, S.; Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Le Digabel, J.; Forcato, M.; Bicciato, S.; et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **2011**, *474*, 179–183. [[CrossRef](#)]

42. Chen, X.; Gu, W.; Wang, Q.; Fu, X.; Wang, Y.; Xu, X.; Wen, Y. C-MYC and BCL-2 mediate YAP-regulated tumorigenesis in OSCC. *Oncotarget* **2018**, *9*, 668–679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mürköster, S.S.; Werbing, V.; Koch, D.; Sipos, B.; Ammerpohl, O.; Kalthoff, H.; Tsao, M.S.; Fölsch, U.R.; Schäfer, H. Role of myofibroblasts in innate chemoresistance of pancreatic carcinoma-Epigenetic downregulation of caspases. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 1751–1760. [[CrossRef](#)]
44. Wang, L.; Li, X.; Ren, Y.; Geng, H.; Zhang, Q.; Cao, L.; Meng, Z.; Wu, X.; Xu, M.; Xu, K. Cancer-associated fibroblasts contribute to cisplatin resistance by modulating ANXA 3 in lung cancer cells. *Cancer Sci.* **2019**, *110*, 1609–1620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Duluc, C.; Moatassim-Billah, S.; Chalabi-Dchar, M.; Perraud, A.; Samain, R.; Breibach, F.; Gayral, M.; Cordelier, P.; Delisle, M.B.; Bousquet-Dubouch, M.P.; et al. Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7*, 735–753. [[CrossRef](#)]
46. Huanwen, W.; Zhiyong, L.; Xiaohua, S.; Xinyu, R.; Kai, W.; Tonghua, L. Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with constitutive and laminin-induced phosphorylation of FAK in pancreatic cancer cell lines. *Mol. Cancer* **2009**, *8*, 125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Chen, Z.X.; Pervaiz, S. Bcl-2 induces pro-oxidant state by engaging mitochondrial respiration in tumor cells. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1617–1627. [[CrossRef](#)]
48. Chen, Y.; Aon, M.A.; Hsu, Y.T.; Soane, L.; Teng, X.; McCaffery, J.M.; Cheng, W.C.; Qi, B.; Li, H.; Alavian, K.N.; et al. Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential. *J. Cell Biol.* **2011**, *195*, 263–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Huang, H.; Shah, K.; Bradbury, N.A.; Li, C.; White, C. Mcl-1 promotes lung cancer cell migration by directly interacting with VDAC to increase mitochondrial Ca²⁺ uptake and reactive oxygen species generation. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1482. [[CrossRef](#)]
50. Perciavalle, R.M.; Stewart, D.P.; Koss, B.; Lynch, J.; Milasta, S.; Bathina, M.; Temirov, J.; Cleland, M.M.; Pelletier, S.; Schuetz, J.D.; et al. Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 575–583. [[CrossRef](#)]
51. Heiden, M.G.V.; Li, X.X.; Gottleib, E.; Hill, R.B.; Thompson, C.B.; Colombini, M. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 19414–19419. [[CrossRef](#)]
52. Alavian, K.N.; Li, H.; Collis, L.; Bonanni, L.; Zeng, L.; Sacchetti, S.; Lazrove, E.; Nabili, P.; Flaherty, B.; Graham, M.; et al. Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 1224–1233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Zhang, Z.; Gao, Z.; Rajthala, S.; Sapkota, D.; Dongre, H.; Parajuli, H.; Suliman, S.; Das, R.; Li, L.; Bindoff, L.A.; et al. Metabolic reprogramming of normal oral fibroblasts correlated with increased glycolytic metabolism of oral squamous cell carcinoma and precedes their activation into carcinoma associated fibroblasts. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 1115–1133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Martinez-Outschoorn, U.E.; Lin, Z.; Trimmer, C.; Flomenberg, N.; Wang, C.; Pavlides, S.; Pestell, R.G.; Howell, A.; Sotgia, F.; Lisanti, M.P. Cancer cells metabolically “fertilize” the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: Implications for PET imaging of human tumors. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 2504–2520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Sung, J.S.; Kang, C.W.; Kang, S.; Jang, Y.; Chae, Y.C.; Kim, B.G.; Cho, N.H. ITGB4-mediated metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* **2020**, *39*, 664–676. [[CrossRef](#)]
56. Bertero, T.; Oldham, W.M.; Grasset, E.M.; Bourget, I.; Boulter, E.; Pisano, S.; Hofman, P.; Bellvert, F.; Meneguzzi, G.; Bulavin, D.V.; et al. Tumor-Stroma Mechanics Coordinate Amino Acid Availability to Sustain Tumor Growth and Malignancy. *Cell Metab.* **2019**, *29*, 124–140. [[CrossRef](#)]
57. Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 582–598. [[CrossRef](#)]
58. Jain, M.; Rivera, S.; Monclus, E.A.; Synenki, L.; Zirk, A.; Eisenbart, J.; Feghali-Bostwick, C.; Mutlu, G.M.; Budinger, G.R.S.; Chandel, N.S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor- β signaling. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 770–777. [[CrossRef](#)]
59. Taddei, M.L.; Giannoni, E.; Raugei, G.; Scacco, S.; Sardanelli, A.M.; Papa, S.; Chiarugi, P. Mitochondrial Oxidative Stress due to Complex I Dysfunction Promotes Fibroblast Activation and Melanoma Cell Invasiveness. *J. Signal. Transduct.* **2012**, *2012*, 684592. [[CrossRef](#)]

60. Frijhoff, J.; Dagnell, M.; Augsten, M.; Beltrami, E.; Giorgio, M.; Östman, A. The mitochondrial reactive oxygen species regulator p66Shc controls PDGF-induced signaling and migration through protein tyrosine phosphatase oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *68*, 268–277. [[CrossRef](#)]
61. Wang, Y.; Lu, M.; Xiong, L.; Fan, J.; Zhou, Y.; Li, H.; Peng, X.; Zhong, Z.; Wang, Y.; Huang, F.; et al. Drp1-mediated mitochondrial fission promotes renal fibroblast activation and fibrogenesis. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 29. [[CrossRef](#)]
62. Xie, N.; Tan, Z.; Banerjee, S.; Cui, H.; Ge, J.; Liu, R.M.; Bernard, K.; Thannickal, V.J.; Liu, G. Glycolytic Reprogramming in Myofibroblast Differentiation and Lung Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2015**, *192*, 1462–1474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Petrova, V.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Melino, G.; Amelio, I. The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis* **2018**, *7*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Gentric, G.; Mieulet, V.; Mechta-Grigoriou, F. Heterogeneity in Cancer Metabolism: New Concepts in an Old Field. *Antioxid. Redox Signal.* **2017**, *26*, 462–485. [[CrossRef](#)]
65. Strickaert, A.; Saiselet, M.; Dom, G.; de Deken, X.; Dumont, J.E.; Feron, O.; Sonveaux, P.; Maenhaut, C. Cancer heterogeneity is not compatible with one unique cancer cell metabolic map. *Oncogene* **2017**, *36*, 2637–2642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Begum, H.M.; Ta, H.P.; Zhou, H.; Ando, Y.; Kang, D.; Nemes, K.; Mariano, C.F.; Hao, J.; Yu, M.; Shen, K. Spatial Regulation of Mitochondrial Heterogeneity by Stromal Confinement in Micropatterned Tumor Models. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Tasdogan, A.; Faubert, B.; Ramesh, V.; Ubellacker, J.M.; Shen, B.; Solmonson, A.; Murphy, M.M.; Gu, Z.; Gu, W.; Martin, M.; et al. Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential. *Nature* **2020**, *577*, 115–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Yeo, S.K.; Zhu, X.; Okamoto, T.; Hao, M.; Wang, C.; Lu, P.; Lu, L.J.; Guan, J.L. Single-cell RNA-sequencing reveals distinct patterns of cell state heterogeneity in mouse models of breast cancer. *Elife* **2020**, *9*, e58810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Choi, J.; Kim, D.H.; Jung, W.H.; Koo, J.S. Metabolic interaction between cancer cells and stromal cells according to breast cancer molecular subtype. *Breast Cancer Res.* **2013**, *15*, R78. [[CrossRef](#)]
70. LeBleu, V.S.; Kalluri, R. A peek into cancer-associated fibroblasts: Origins, functions and translational impact. *Dis. Model. Mech.* **2018**, *11*, dmm029447. [[CrossRef](#)]
71. Costa, A.; Kieffer, Y.; Scholer-Dahirel, A.; Pelon, F.; Bourachot, B.; Cardon, M.; Sirven, P.; Magagna, I.; Fuhrmann, L.; Bernard, C.; et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 463–479. [[CrossRef](#)]
72. Givel, A.M.; Kieffer, Y.; Scholer-Dahirel, A.; Sirven, P.; Cardon, M.; Pelon, F.; Magagna, I.; Gentric, G.; Costa, A.; Bonneau, C.; et al. miR200-regulated CXCL12 β promotes fibroblast heterogeneity and immunosuppression in ovarian cancers. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Qian, J.; Olbrecht, S.; Boeckx, B.; Vos, H.; Laoui, D.; Ethlioglu, E.; Wauters, E.; Pomella, V.; Verbandt, S.; Busschaert, P.; et al. A pan-cancer blueprint of the heterogeneous tumor microenvironment revealed by single-cell profiling. *Cell Res.* **2020**, *30*, 745–762. [[CrossRef](#)]
74. Yan, W.; Wu, X.; Zhou, W.; Fong, M.Y.; Cao, M.; Liu, J.; Liu, X.; Chen, C.H.; Fadare, O.; Pizzo, D.P.; et al. Cancer-cell-secreted exosomal miR-105 promotes tumour growth through the MYC-dependent metabolic reprogramming of stromal cells. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *20*, 597–609. [[CrossRef](#)]
75. Zaal, E.A.; Berkers, C.R. The Influence of Metabolism on Drug Response in Cancer. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 500. [[CrossRef](#)]
76. Romero, I.L.; Mukherjee, A.; Kenny, H.A.; Litchfield, L.M.; Lengyel, E. Molecular Pathways: Trafficking of Metabolic Resources in the Tumor Microenvironment. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 680–686. [[CrossRef](#)]
77. Becker, L.M.; O’Connell, J.T.; Vo, A.P.; Cain, M.P.; Tampe, D.; Bizarro, L.; Sugimoto, H.; McGow, A.K.; Asara, J.M.; Lovisa, S.; et al. Epigenetic Reprogramming of Cancer-Associated Fibroblasts Deregulates Glucose Metabolism and Facilitates Progression of Breast Cancer. *Cell Rep.* **2020**, *31*, 107701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Bonuccelli, G.; Tsigos, A.; Whitaker-Menezes, D.; Pavlides, S.; Pestell, R.G.; Chiavarina, B.; Frank, P.G.; Flomenberg, N.; Howell, A.; Martinez-Outschoorn, U.E.; et al. Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 3506–3514. [[CrossRef](#)]

79. Ho, N.; Coomber, B.L. Pyruvate dehydrogenase kinase expression and metabolic changes following dichloroacetate exposure in anoxic human colorectal cancer cells. *Exp. Cell Res.* **2015**, *331*, 73–81. [[CrossRef](#)]
80. Payen, V.L.; Mina, E.; van Hée, V.F.; Porporato, P.E.; Sonveaux, P. Monocarboxylate transporters in cancer. *Mol. Metab.* **2020**, *33*, 48–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Hong, C.S.; Graham, N.A.; Gu, W.; Espindola Camacho, C.; Mah, V.; Maresh, E.L.; Alavi, M.; Bagryanova, L.; Krotee, P.A.L.; Gardner, B.K.; et al. MCT1 Modulates Cancer Cell Pyruvate Export and Growth of Tumors that Co-express MCT1 and MCT4. *Cell Rep.* **2016**, *14*, 1590–1601. [[CrossRef](#)]
82. Morais-Santos, F.; Granja, S.; Miranda-Gonçalves, V.; Moreira, A.H.J.; Queirós, S.; Vilaça, J.L.; Schmitt, F.C.; Longatto-Filho, A.; Paredes, J.; Baltazar, F.; et al. Targeting lactate transport suppresses *in vivo* breast tumour growth. *Oncotarget* **2015**, *6*, 19177–19189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Patel, B.B.; Ackerstaff, E.; Serganova, I.S.; Kerrigan, J.E.; Blasberg, R.G.; Koutcher, J.A.; Banerjee, D. Tumor stroma interaction is mediated by monocarboxylate metabolism. *Exp. Cell Res.* **2017**, *352*, 20–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Corbet, C.; Bastien, E.; Draoui, N.; Doix, B.; Mignon, L.; Jordan, B.F.; Marchand, A.; Vanherck, J.C.; Chaltin, P.; Schakman, O.; et al. Interruption of lactate uptake by inhibiting mitochondrial pyruvate transport unravels direct antitumor and radiosensitizing effects. *Nat. Commun.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
85. Bola, B.M.; Chadwick, A.L.; Michopoulos, F.; Blount, K.G.; Telfer, B.A.; Williams, K.J.; Smith, P.D.; Critchlow, S.E.; Stratford, I.J. Inhibition of Monocarboxylate Transporter-1 (MCT1) by AZD3965 Enhances Radiosensitivity by Reducing Lactate Transport. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 2805–2816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Biancur, D.E.; Paulo, J.A.; Małachowska, B.; del Rey, Q.M.; Sousa, C.M.; Wang, X.; Sohn, A.S.W.; Chu, G.C.; Gygi, S.P.; Harper, J.W.; et al. Compensatory metabolic networks in pancreatic cancers upon perturbation of glutamine metabolism. *Nat. Commun.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Parker, S.J.; Amendola, C.R.; Hollinshead, K.E.R.; Yu, Q.; Yamamoto, K.; Encarnacion-Rosado, J.; Rose, R.E.; LaRue, M.M.; Sohn, A.S.W.; Biancur, D.E.; et al. Selective alanine transporter utilization creates a targetable metabolic niche in pancreatic cancer. *Cancer Discov.* **2020**. [[CrossRef](#)]
88. Wang, Y.; An, H.; Liu, T.; Qin, C.; Sesaki, H.; Guo, S.; Radovick, S.; Hussain, M.; Maheshwari, A.; Wondisford, F.E.; et al. Metformin Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 1511–1523. [[CrossRef](#)]
89. Shao, S.; Zhao, L.; An, G.; Zhang, L.; Jing, X.; Luo, M.; Li, W.; Meng, D.; Ning, Q.; Zhao, X.; et al. Metformin suppresses HIF-1 α expression in cancer-associated fibroblasts to prevent tumor-stromal cross talk in breast cancer. *FASEB J.* **2020**. [[CrossRef](#)]
90. Xu, S.; Yang, Z.; Jin, P.; Yang, X.; Li, X.; Wei, X.; Wang, Y.; Long, S.; Zhang, T.; Chen, G.; et al. Metformin Suppresses Tumor Progression by Inactivating Stromal Fibroblasts in Ovarian Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 1291–1302. [[CrossRef](#)]
91. Zhang, Z.; Liang, X.; Fan, Y.; Gao, Z.; Bindoff, L.A.; Costea, D.E.; Li, L. Fibroblasts rescue oral squamous cancer cell from metformin-induced apoptosis via alleviating metabolic disbalance and inhibiting AMPK pathway. *Cell Cycle* **2019**, *18*, 949–962. [[CrossRef](#)]
92. Sarosiek, K.A.; Fraser, C.; Muthalagu, N.; Bhola, P.D.; Chang, W.; McBrayer, S.K.; Cantlon, A.; Fisch, S.; Golomb-Mello, G.; Ryan, J.A.; et al. Developmental Regulation of Mitochondrial Apoptosis by c-Myc Governs Age- and Tissue-Specific Sensitivity to Cancer Therapeutics. *Cancer Cell* **2017**, *31*, 142–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Lagares, D.; Santos, A.; Grasberger, P.E.; Liu, F.; Probst, C.K.; Rahimi, R.A.; Sakai, N.; Kuehl, T.; Ryan, J.; Bhola, P.; et al. Targeted apoptosis of myofibroblasts with the BH3 mimetic ABT-263 reverses established fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaal3765. [[CrossRef](#)]
94. Rizvi, S.; Mertens, J.C.; Bronk, S.F.; Hirsova, P.; Dai, H.; Roberts, L.R.; Kaufmann, S.H.; Gores, G.J. Platelet-derived Growth Factor Primes Cancer-associated Fibroblasts for Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 22835–22849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Cadamuro, M.; Brivio, S.; Mertens, J.; Vismara, M.; Moncsek, A.; Milani, C.; Fingas, C.; Malerba, C.M.; Nardo, G.; Dall’Olmo, L.; et al. Platelet-derived growth factor-D enables liver myofibroblasts to promote tumor lymphangiogenesis in cholangiocarcinoma. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, 700–709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

96. Mertens, J.C.; Fingas, C.D.; Christensen, J.D.; Smoot, R.L.; Bronk, S.F.; Werneburg, N.W.; Gustafson, M.P.; Dietz, A.B.; Roberts, L.R.; Sirica, A.E.; et al. Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 897–907. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



HAL
open science

Targeting of MCL-1 in breast cancer-associated fibroblasts reverses their myofibroblastic phenotype and pro-invasive properties

Thomas L Bonneaud, Chloé Lefebvre, Lisa Nocquet, Agnes Basseville, Julie Roul, Hugo Weber, Mario Campone, Philippe P Juin, Frédérique Souazé

► To cite this version:

Thomas L Bonneaud, Chloé Lefebvre, Lisa Nocquet, Agnes Basseville, Julie Roul, et al.. Targeting of MCL-1 in breast cancer-associated fibroblasts reverses their myofibroblastic phenotype and pro-invasive properties. *Cell Death and Disease*, 2022, 13 (9), pp.787. 10.1038/s41419-022-05214-9 . inserm-03777381

HAL Id: inserm-03777381

<https://inserm.hal.science/inserm-03777381>

Submitted on 14 Sep 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.

ARTICLE OPEN



Targeting of MCL-1 in breast cancer-associated fibroblasts reverses their myofibroblastic phenotype and pro-invasive properties

Thomas L. Bonneaud^{1,2}, Chloé C. Lefebvre^{1,2}, Lisa Nocquet^{1,2}, Agnes Basseville³, Julie Roul^{1,2,4}, Hugo Weber^{1,2}, Mario Campone^{1,2,4}, Philippe P. Juin^{1,2,4} and Frédérique Souazé^{1,2}

© The Author(s) 2022

Cancer-associated fibroblasts (CAF) are a major cellular component of epithelial tumors. In breast cancers in particular these stromal cells have numerous tumorigenic effects in part due to their acquisition of a myofibroblastic phenotype. Breast CAFs (bCAFs) typically express MCL-1. We show here that pharmacological inhibition or knock down of this regulator of mitochondrial integrity in primary bCAFs directly derived from human samples mitigates myofibroblastic features. This decreases expression of genes involved in actomyosin organization and contractility (associated with a cytoplasmic retention of the transcriptional regulator, yes-associated protein—YAP) and decreases bCAFs ability to promote cancer cells invasion in 3D coculture assays. Our findings underscore the usefulness of targeting MCL-1 in breast cancer ecosystems, not only to favor death of cancer cells but also to counteract the tumorigenic activation of fibroblasts with which they co-evolve. Mechanistically, pharmacological inhibition of MCL-1 with a specific BH3 mimetic promotes mitochondrial fragmentation in bCAFs. Inhibition of the mitochondrial fission activity of DRP-1, which interacts with MCL-1 upon BH3 mimetic treatment, allows the maintenance of the myofibroblastic phenotype of bCAFs.

Cell Death and Disease (2022)13:787; <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05214-9>

INTRODUCTION

In epithelial tumors, cancer-associated fibroblasts (CAFs) are an important component of a hijacked stroma and may represent up to more than half of the whole breast tumor volume. These cells are composed of different heterogeneous and plastic populations with various supporting effects on cancer cells [1, 2]. In breast cancer, different subsets of CAF have been described, differing in their expression markers, their secretions and their main characteristics (pro-tumor functions, immunoregulatory properties...) possibly linked to a different activation status. Subsets with myofibroblastic characteristics are enriched in tumor tissue and contribute to pathogenesis [3, 4]. Myofibroblastic CAFs are indeed key mediators of fibrotic tumor stroma, which is characterized by accumulation of extracellular matrix (ECM), increased tissue stiffness and breast cancer risk [5–7]. They have marked stress fibers and contract collagen, which underlies their pro-invasive properties [8, 9]. The myofibroblastic characteristics of CAFs rely on the expression of a set of genes involved in the structure of the actomyosin cytoskeleton (among them the ACTA2 encoding for the myofibroblastic activation marker α -SMA) controlled by mechano-sensitive transcription factors, YAP-TEAD and MRTF-SRF [10, 11]. These two pathways are mutually dependent and are closely regulated by the polymerization state of the actin cytoskeleton [11]. In addition to responding to mechanical stress,

myofibroblast differentiation is also under the control of secreted factors [12].

Given the adverse effects of myofibroblastic CAFs on cancer progression and treatment resistance of cancer cells [13], their pharmacological manipulation and selective eradication within the tumor is therapeutically relevant [14–16]. Importantly, activated myofibroblasts are more refractory to cell death than other fibroblasts, and express higher levels of pro-survival proteins [17, 18]. Fibroblasts from patients with scleroderma rely on BCL-xL or MCL-1/BCL-xL for survival [17]. We ourselves established that MCL-1 mRNA expression positively correlates with stromal score in publicly available expression datasets from luminal breast cancers. CAFs derived from breast cancers (bCAFs), regardless of subtype, express MCL-1 at a higher level than in normal fibroblasts. This was in particular established using CAFs grown ex vivo in culture conditions that favor their myofibroblastic phenotype [13, 19]. In these cells, MCL-1 exerts its canonical function as it prevents mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) in conjunction with BCL-xL [13].

In this study, we explored whether the typical expression of MCL-1 in bCAFs endowed with a myofibroblastic phenotype may constitute a vulnerability. BH3 mimetics are small molecules developed to specifically antagonize the anti-apoptotic function of various BCL-2 homologs, including MCL-1 [20]. They bind to the

¹Université de Nantes, INSERM, CNRS, CRCI2NA, 44000 Nantes, France. ²SIRIC ILIAD, Nantes, Angers, France. ³Omics Data Science Unit, ICO, Angers, France. ⁴ICO René Gauducheau, Saint Herblain, France. ✉email: philippe.juin@univ-nantes.fr; frederique.souaze@univ-nantes.fr

Edited by Professor Nickolai Barlev

Received: 3 November 2021 Revised: 19 August 2022 Accepted: 24 August 2022

Published online: 14 September 2022

BH3-binding groove of anti-apoptotic proteins, which is critical for their engagement of the BH3 domain of their pro-apoptotic, MOMP-promoting, counterparts. In numerous settings, inhibition of MCL-1 groove coincidentally stabilizes MCL-1, most likely because the turn-over of this labile protein is highly dependent upon its binding to endogenous proteins harboring a BH3, or BH3-like, domain [21–23]. BH3 mimetics were initially conceived to pharmacologically favor MOMP and apoptosis in cancer cells, which are characterized by frequent alterations in the expression and activity of BCL-2 homologs. MCL-1 in particular is frequently overexpressed in many cancers, including breast cancers, and this was established to contribute to resistance to the cytotoxic effects of chemotherapy, radiotherapy and BH-3 mimetics selectively targeting other BCL-2 homologs [13, 20, 24, 25]. We also established that in luminal breast cancers, MCL-1 expression in tumor cells is extrinsically favored by paracrine effects of bCAFs. This defines MCL-1 as a target in stroma-influenced breast cancers, and advocates for a comprehensive investigation of the effects of its targeting in distinct cellular components, such as myofibroblastic CAFs, of these tumor ecosystems. We describe here that targeting MCL-1 with a BH-3 mimetic fails to induce efficient apoptosis in bCAFs. However, treatment leads to a loss of myofibroblastic features of these cells, which we ascribe to a contributing role of MCL-1 to the actomyosin dynamics of the bCAF myofibroblastic phenotype.

RESULTS

MCL-1 targeting influences transcriptional programs involved in actomyosin organization/contractility in viable bCAFs

We previously showed that high expression level of MCL-1 was a hallmark of activated bCAFs [13]. bCAFs systematically express the anti-apoptotic protein MCL-1 at a high level, while expression of BCL-xL is sporadic and that of BCL-2 barely detectable. To investigate whether this set of expressions corresponds to specific survival dependencies, we performed pharmacological BH-3 profiling of primary cultures of bCAFs (derived from human breast cancer samples). We treated these cells with combinations of BH-3 mimetics targeting MCL-1 (S63845), BCL-2 (ABT-199), BCL-xL (A1331852) or BCL-2/BCL-xL/BCL-w (ABT-737) and measured cell death rates (using Annexin-V binding as a readout). Results revealed that bCAFs survival did not rely on the function of a single anti-apoptotic protein (and a fortiori on that of MCL-1 alone) but rather on the combined functions of MCL-1 and BCL-xL (Fig. 1A). Accordingly, in contrast to combined targeting (using for instance S63845 + ABT-737), which triggered robust caspase 3/7 activation, targeting MCL-1 only resulted in not significant caspase-3/7 activation (Fig. 1B, S63845).

To further document the biological effects of MCL-1 targeting on bCAFs, we performed a differential gene expression (DGE) analysis on RNA-seq data from six different primary cultures of bCAF (derived from 3 triple negative and 3 luminal breast cancers) treated or not with S63845 (500 nM, 18 h). We then performed a hierarchical clustering of CAFs according to the 43 differentially expressed genes, and plotted them accordingly in a heatmap (Fig. 1C, D). As expected, CAFs were split into two clusters according to the treatment received. No additional clustering was observed according to cancer subtype origin (TNBC or Luminal). We confirmed by RT-PCR the S63845-induced significant down-regulation of a selected set of genes (MYH10, MYH2, ACTA2 and ITGA11) compared to untreated CAFs (Fig. 1E, sg control). To confirm that MCL-1 contributes to the expression of this set of genes, we knocked down MCL-1 expression in primary bCAFs by CRISPR-CAS9-based genome editing. Genetic deletion of MCL-1 in bCAFs phenocopied the transcriptomic effects of S63845 treatment. Moreover, S63845 has no additional effect on gene expression in MCL-1 deficient CAFs (Fig. 1E, sgMCL-1). MCL-1 knock down was validated by the significant decrease in MCL-1

expression and loss of MCL-1 stabilization induced by S63845 (Supplementary Fig. 2D). The functionality of MCL-1 loss was assessed by the ability of the BCL-xL antagonist (A1331852) to trigger cell death in KD MCL-1 whereas it did not in control sg CAFs (Fig. 1F, Bottom).

Myofibroblastic features of bCAFs are MCL-1 dependent

Gene Ontology (GO) pathway enrichment analysis based on DGE results indicated that pharmacological inhibition of MCL-1 in bCAFs was mainly associated with a decreased expression of genes involved in extracellular matrix and actomyosin structure organizations and in contractility (Fig. 2A). Among these genes, the majority is known to be involved in myofibroblastic differentiation and are bona fide CAF markers such as ACTA2 (coding for α -SMA), MYH10 (coding for myosin IIB), COL11A1 or ITGA11 (Figs. 1C, E, and 2A). To validate the impact of MCL-1 targeting on bCAFs myofibroblastic phenotype, we evaluated the effects of S63845 treatment and of MCL-1 knock down on α -SMA and myosin IIB protein expressions, CAF contractile force and CAF surface area. Either manipulation induced a decrease in α -SMA and myosin IIB expressions (Fig. 2B, E, H, and I), inhibited collagen contraction ability (Fig. 2C, F) and reduced CAFs surface area (Fig. 2D, G).

Targeting of bCAFs-expressed MCL-1 decreases invasiveness and pro-invasive effects on cancer cells without affecting their proliferation

We investigated the consequence of S63845-induced phenotypic changes on the invasive properties of bCAFs. To this end, we analyzed the influence of MCL-1 expression on invasion of bCAFs spheroid in type I collagen matrix. As shown in Fig. 3A, B, whereas bCAFs rapidly invaded the collagen matrix in these 3D assays, MCL-1 targeting (by S63845 in Fig. 3A or genetic silencing in Fig. 3B) significantly reduced bCAFs invasion. As bCAFs were described to promote cancer cells invasion [8], we also investigated fibroblast-led invasion of breast cancer cells and the influence of S63845 treatment in 3D coculture assays. Cancer cells were engineered to express GFP as a discriminating marker and we chose to use luminal T47D breast cancer cells that, under our experimental conditions, did not invade the collagen matrix when grown as spheroids in the absence of bCAFs (Fig. 3C). Upon coculture with bCAFs as 3D-multicellular tumor spheroids in type I collagen, GFP-positive T47D cancer cells invaded collagen and this was blocked by S63845 treatment (Fig. 3D) without inducing cancer cell death (Supplementary Fig. 1A). Loss of myofibroblastic features and of contractility noted upon MCL-1 neutralization are accompanied by a decrease in the pro-invasive properties of bCAFs.

Our DGE analysis revealed that in addition to the down-regulation of genes implicated in myofibroblastic features, S63845 induced the transcription of some inflammatory related genes such as IL33, CCL7, ESM1, Has2, and TMEMs (Fig. 1C, D and Fig. 4A). As shown in Fig. 4A, the same effect was observed on mRNA expression in CAFs knocked down for MCL-1. These inflammatory factors may influence cancer cell migration and proliferation [26–28]. However, neither the silencing of MCL-1 in CAFs nor its inhibition by S63845 detectably increased cancer cell migration or proliferation, as evaluated by wound-healing assays and time-lapse video-microscopy (Fig. 4B, C). It should be noted that under the conditions of coculture used here, the decrease in cancer cell proliferation observed when CAFs were present may be caused by metabolic competition between the two cell types or by the technique used.

The phenotypic effects on bCAFs of MCL-1 targeting rely on mitochondrial fragmentation

We finally explored the mechanistic basis of the effects of MCL-1 inhibition on bCAFs. In addition to MOMP, MCL-1 was shown to regulate the dynamics between mitochondrial fusion and fission in human pluripotent stem cells (hPSCs) and in hPSCs-derived cardiomyocytes [29], and S63845 treatment of cardiomyocytes

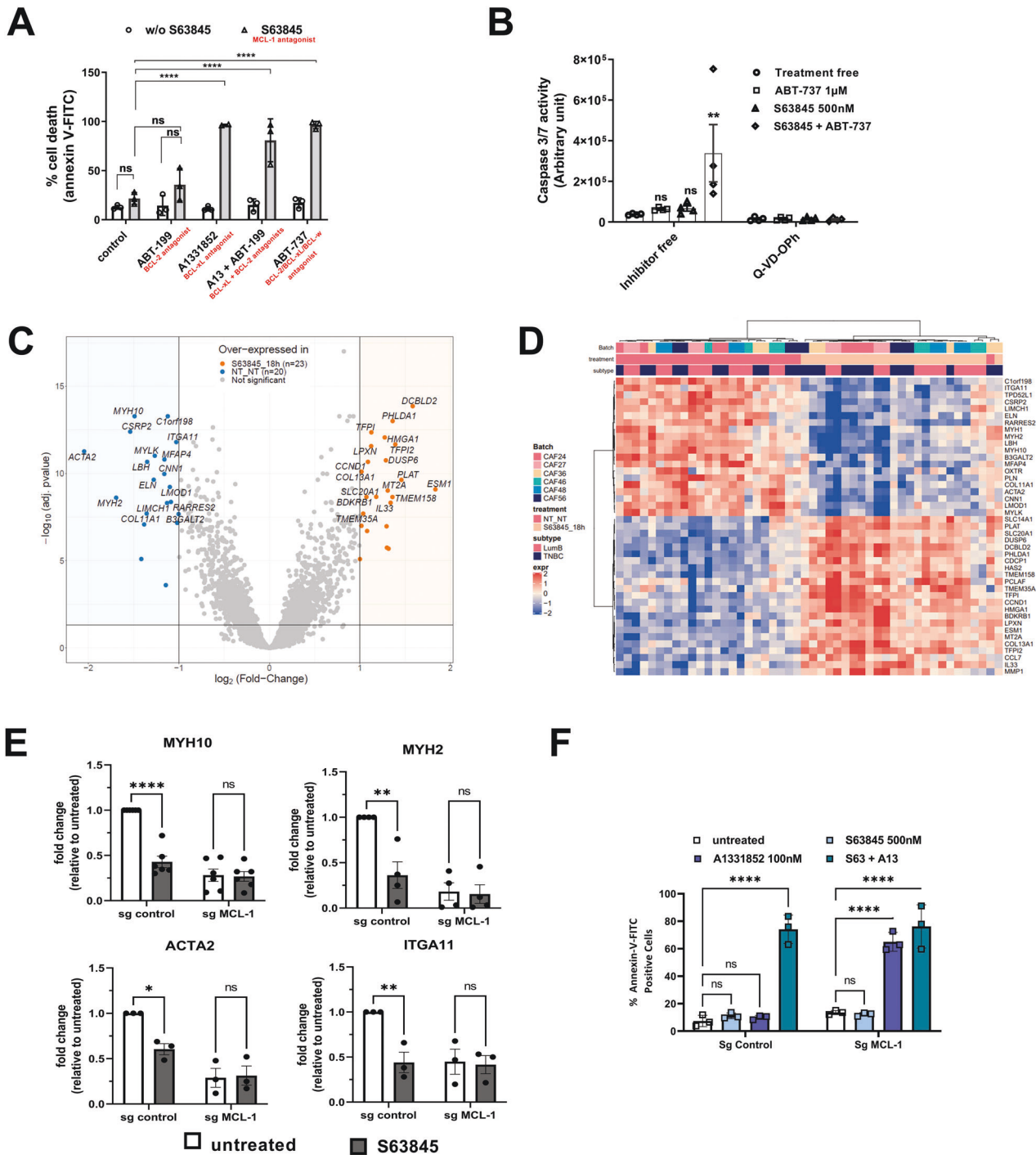


Fig. 1 MCL-1 targeting influences transcriptional programs involved in actomyosin organization/contractility in viable bCAFs. **A** Three different primary cultures of CAFs were treated with ABT-199 (1 μM), A1331852 (100 nM), ABT-199 (1 μM) + A1331852 (100 nM) or ABT-737 (1 μM) with or without S63845 (500 nM) for 72 h in DMEM containing 1% FBS, apoptosis was measured by Annexin-V flow cytometry. Data are means ± SEM from three independent experiments. Two-way ANOVA, **** $P < 0.0001$, ns: not significant. **B** Caspase 3/7 activity was measured by caspase Glo assay and expressed in arbitrary unit. Data are means ± SEM from four independent experiments. Two-way ANOVA. * $P < 0.05$, ns: not significant. **C** Volcano plot displaying differentially expressed genes between S63845 treated and non-treated primary culture of CAFs from luminal B ($n = 3$) and triple negative ($n = 3$) breast cancers. The vertical axis (y-axis) corresponds to the mean expression value of \log_{10} (q -value), and the horizontal axis (x-axis) displays the \log_2 fold-change value. The red dots represent the upregulated expressed transcripts; the blue dots represent the transcripts whose expression is downregulated. **D** A hierarchically clustered heatmap showing the expression patterns of the 23 most extreme DE mRNA. Red and blue represent up- and downregulated expression in CAFs treated or not with S63845. Color density indicating levels of fold-change was displayed. **E** qRT-PCR of MYH10, MYH2, ACTA2 and ITGA11 mRNA in CAFs Sg control or sg MCL-1 treated or not by S63845 500 nM for 18 h. Mean and SEM of three independent experiments are represented as fold-change of mRNA level related to untreated Sg control. Two-way ANOVA, * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, ns: not significant. **F** CAFs sg control or silenced for MCL-1 (sg MCL-1) were treated or not with S63845 (500 nM), A1331852 (100 nM) or S63845 (500 nM) + A1331852 (100 nM) for 48 h in DMEM containing 1% FBS. Apoptosis was measured by Annexin-V flow cytometry. Data are means ± SEM from three independent experiments. P -value was determined by two-way ANOVA. **** $P < 0.0001$, ns: not significant.

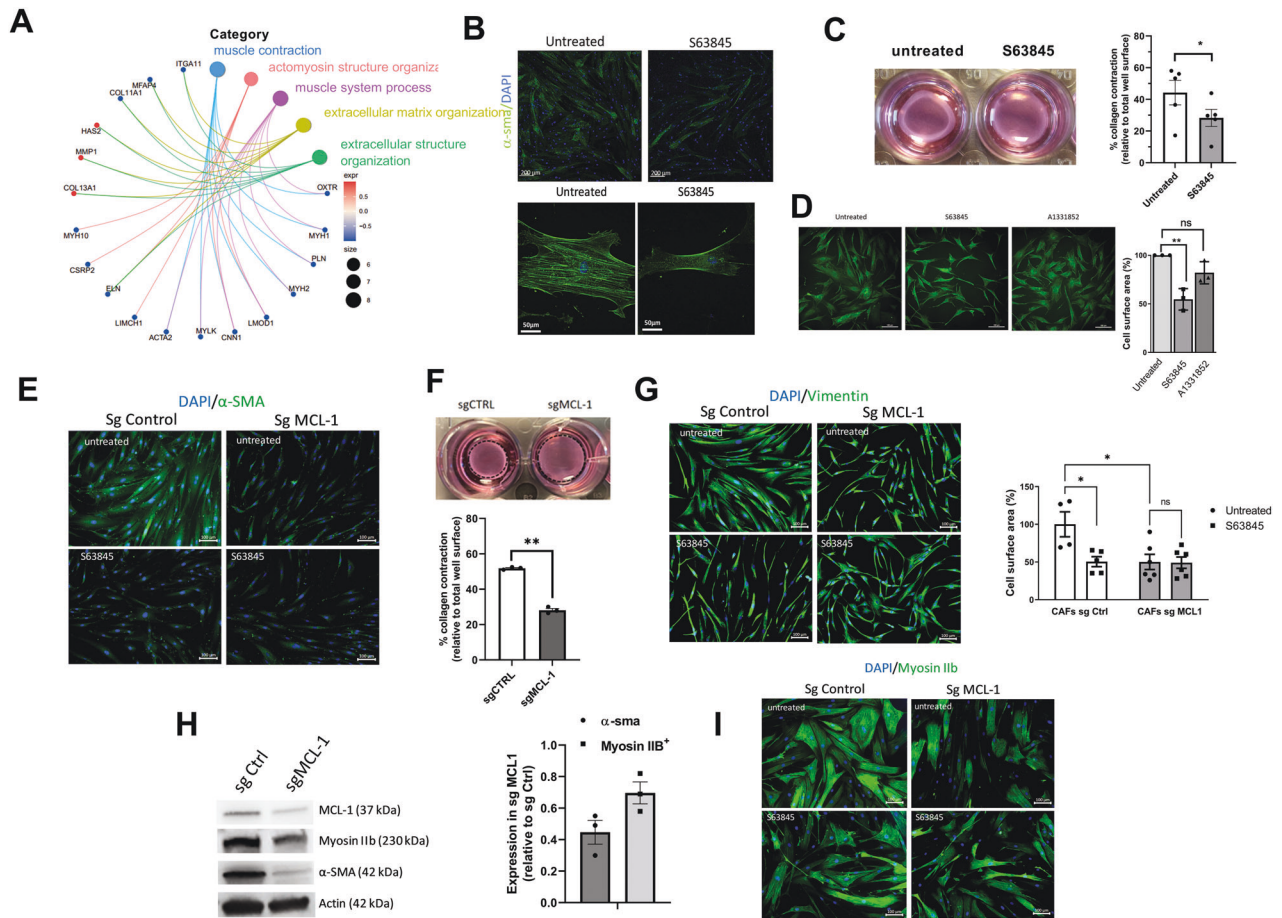


Fig. 2 MCL-1 antagonist mitigates myofibroblastic features. **A** Gene Ontology (GO) pathway enrichment analysis based on DGE results. **B** Representative immunofluorescence of α-smooth muscle actin (α-SMA) (green) in CAF treated or not with S63845 for 18 h, nuclei were stained in blue (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) ($n = 3$). **C** Representative images of CAFs contraction of collagen gels. Quantification of collagen gel contraction by CAFs treated or not with S63845. 100% represents the total surface area of the well ($n = 5$) Student t-test, $*P < 0.05$. **D** Representative immunocytochemistry of Vimentin immunostaining used to determine cells surface area of 3 different CAFs treated or not with S63845 500 nM or A1331852 100 nM for 18 h. Cells area were determined with imageJ software by measuring average of cell surface area from 200 cells for each condition, results are expressed in arbitrary unit relative to untreated cells. Anova, $**P < 0.01$, ns: not significant. **E** Representative immunofluorescence of α-smooth muscle actin (α-SMA) (green) in CAFs knock down for MCL-1 (Sg MCL-1) or not (Sg Control), nuclei were stained in blue (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) ($n = 3$). **F** Representative images of CAFs contraction of collagen gels. Quantification of collagen gel contraction by CAFs knock down for MCL-1 (Sg MCL-1) or not (Sg Control). 100% represents the total surface area of the well. ($n = 3$) Student t-test, $**P < 0.01$. **G** Representative immunocytochemistry of Vimentin immunostaining used to determine cells surface area of 3 different CAFs Sg Control or Sg MCL-1. Cells area were determined with imageJ software by measuring average of cell surface area from 200 cells for each condition, results are expressed in arbitrary unit relative to untreated cells. Anova, $*P < 0.05$, ns: not significant. **H** (Left) Representative experiment of protein expression level (MCL-1, Myosin IIB, α-SMA) evaluated using western blots, Actin expression was used as loading control. (Right) Quantification of the amounts of α-SMA or Myosin IIB protein band relative to Actin in CAFs Sg MCL-1, results are expressed as a ratio relative to Sg Control. **I** Representative immunofluorescence of Myosin IIB (green) in CAFs knock down for MCL-1 (Sg MCL-1) or not (Sg control), nuclei were stained in blue (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) ($n = 3$).

was shown to promote mitochondrial fission [30]. A more thorough investigation of the impact of S63845 treatment on the mitochondrial network of bCAFs showed that it reduced mitochondrial length in bCAFs whereas BCL-xL antagonist (with A1331852) did not (Fig. 5A, B). S63845-induced mitochondrial ultrastructural defects did not coincide with detectable changes in oxidative phosphorylation (measured with a Seahorse, Supplementary Fig. 1B) and mitochondrial mass (evaluated by total TOM-20 expression, Supplementary Fig. 1C). The effect of S63845 was prevented by co-treatment with Mdivi-1, an inhibitor of dynamin-related protein 1 (DRP-1) impairing Drp1 oligomerization, its self-assembly in rings in association with mitochondria and its subsequent GTPase activity, suggesting that it relies on activation of the endogenous mitochondrial fission machinery of which this protein is a critical member (Fig. 5A). Mechanistically, and in line with previous reports in numerous other cell types, bCAFs

treatment with S63845, but not with A1331852, enhanced MCL-1 protein levels (Supplementary Fig. 1D, E). MCL-1 accumulated preferentially at the mitochondria as illustrated by the colocalization of MCL-1 and TOM20 seen in immunocytochemistry (Supplementary Fig. 1E). S63845 treatment enhanced interactions between MCL-1 and DRP1, as judged in co-immunoprecipitation assays, in a Mdivi-1-sensitive manner. In contrast, S63845 prevented interactions between MCL-1 and NOXA (Fig. 5C).

We also showed that the S63845-induced down-regulation of a set of genes (MYH10, MYH2, ACTA2 and ITGA11) is impaired in presence of Mdivi-1 for most tested genes (Fig. 5D). It is to note that this Mdivi-1-sensitive effect on gene regulation is not found on the upregulated genes (Supplementary Fig. 2A).

Transcription factor "activation" analysis based on S63845-induced differential gene expression hinted on SRF as a candidate transcription factor possibly involved in the observed down

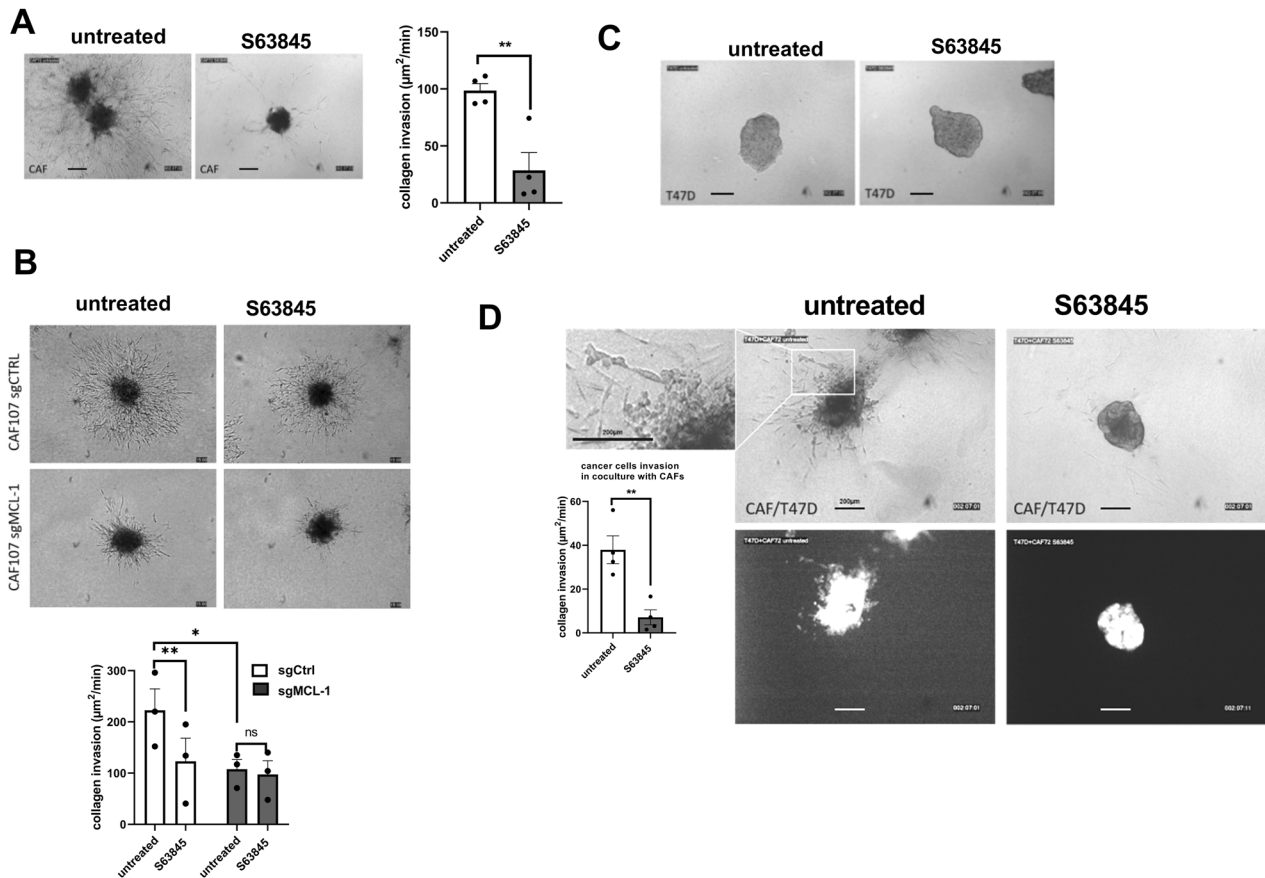


Fig. 3 MCL-1 targeting in bCAFs decreases invasiveness and pro-invasive effects on cancer cells. **A** CAFs treated or not with S63845 **B** CAFs sg control or sg MCL-1 treated or not with S63845 **C** T47D cancer cells or **D** multicellular CAF + T47D-eGFP 3D spheroid invasion into collagen in presence or not of S63845 (500 nM) was monitored up to 48 h using microscopy time-lapse. Representative images of tumor cell invasion are shown. Quantification (3 spheroids per CAF in 3 or 4 different CAFs) are expressed in invaded surfaces (including cells number and distance) expressed in $\mu\text{m}^2/\text{units}$ of time (min).

regulations (Supplementary Fig. 2B). However, we could not detect any change in the nuclear localization of SRF or of its cofactor, MRTF, upon treatment (data not shown). SRF/MRTF-regulated genes were shown to co-depend on YAP in bCAFs [11]. Using confocal immunofluorescence, we found that the proportion of bCAFs exhibiting nuclear localization of YAP (including nuclear and cytosolic) was decreased upon pharmacological inhibition (Fig. 5E, Top and Bottom). Without ruling out the involvement of additional transcriptional factors, this argues that cytoplasmic retention of YAP may contribute, at least in part, to the transcriptional effects of MCL-1 targeting. The effects of MCL-1 targeting on MYH10, MYH2, ACTA2 and ITGA11 mRNA down-regulation (Fig. 5D) and on YAP cytoplasmic retention (Fig. 5E) were reversed by Mdivi-1 treatment. To further document the link between MCL-1 regulated mitochondrial dynamics and myofibroblastic features, we co-evaluated myosin-II β (MYH10) expression since this protein has an established role in CAFs invasion ability [10, 31] and since its mRNA expression was found downregulated by S63845 and mitochondrial networks (distinguished between fragmented and fused by immunolabelling of the outer mitochondrial membrane protein TOM20 Fig. 5F; individual values are shown in Supplementary Fig. 3) in bCAFs cultured in the absence or presence of S63845. S63845-induced mitochondrial fragmentation was accompanied by a decrease in Myosin-II β expression in bCAFs with 60% of CAFs not expressing it (mostly exhibiting fragmented mitochondria) versus 30% in the control (Fig. 5F, Top and Bottom). Mdivi-1 co-treatment prevented these effects (Fig. 5F). This was recapitulated by treatment with another MCL-1

targeting BH3 mimetic (AZD5991) but not by a BCL-xL targeting BH3 mimetic (A1331852).

These results suggest that acute pharmacological inhibition of MCL-1 contributes to a loss of the myofibroblastic phenotype of bCAFs by promoting mitochondrial dynamic imbalance. Of note, we failed to detect steady state mitochondrial fragmentation in MCL-1-deficient CAFs (data not shown), and Mdivi-1 treatment did not restore the long-term effects of MCL-1 knock down on the expression of “myofibroblastic genes” (Supplementary Fig. 2B). However, the effect of S63845 on mitochondrial fragmentation was lost in MCL-1-deficient CAFs but not in BAX-BAK-deficient CAFs (obtained by CRISPR-CAS9) (Supplementary Fig. 2D). Acute MCL-1 inhibition and long-term MCL-1 deletion may thus mitigate the myofibroblastic features of bCAFs by distinct mechanisms, underscoring the complexity of MCL-1 contribution to bCAFs phenotypes.

DISCUSSION

We herein present a novel and unexpected role for MCL-1: its contribution to the myofibroblastic phenotype and pro-invasive capacity of cancer-associated fibroblasts. Numerous studies showed that tumor intrinsic deregulation of MCL-1 expression/activity promotes breast cancer progression and treatment resistance. We also previously showed that in luminal breast cancers, MCL-1 expression in tumor cells, leading to a survival advantage, was extrinsically favored by neighboring CAFs, which themselves exhibit high MCL-1 expression [13]. Our study thus

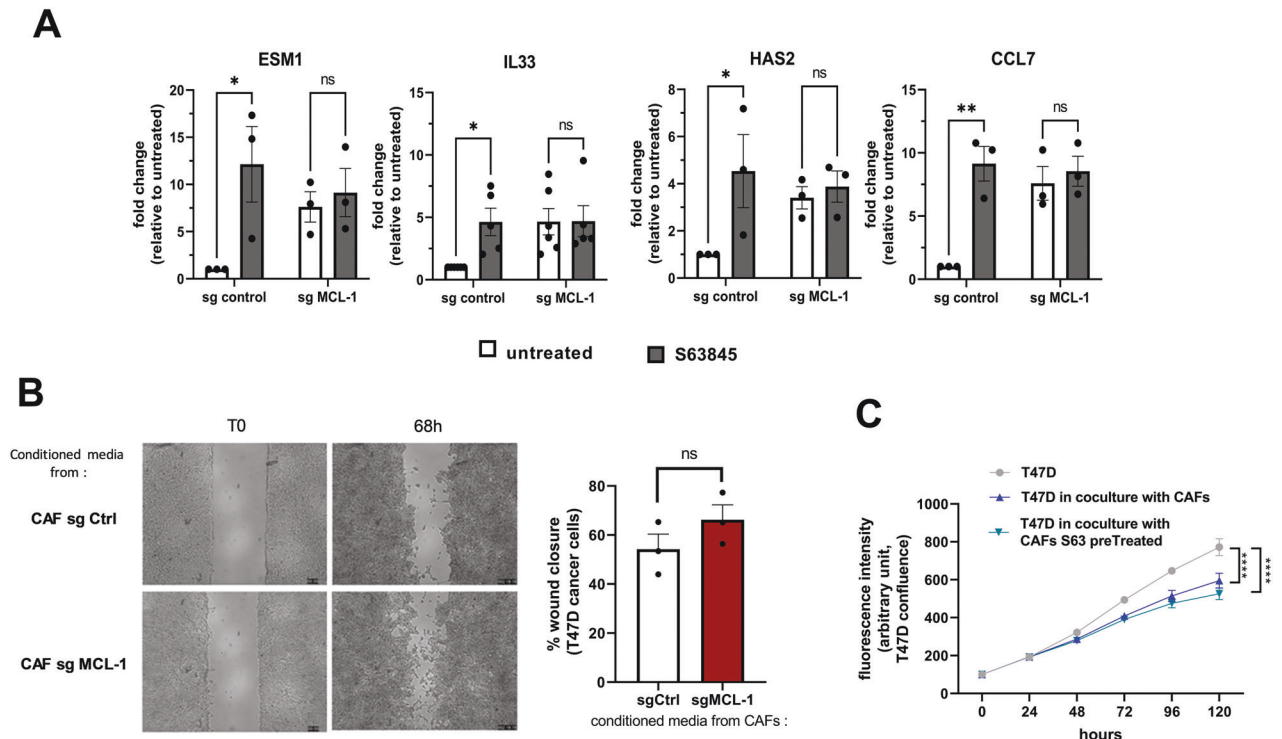


Fig. 4 MCL-1 targeting in bCAFs does not induce cancer cell migration or proliferation. **A** qRT-PCR of ESM1, IL33, HAS2 and CCL7 mRNA in CAFs Sg control or sg MCL-1 treated or not by S63845 500 nM for 18 h. Mean and SEM of three to five independent experiments are represented as fold-change of mRNA level related to untreated Sg control. Two-way ANOVA, $*P < 0.1$, $**P < 0.01$, ns: not significant. **B** (Left) Representative images from in vitro scratch wound-healing assays of T47D cancer cells in presence of conditioned media from CAFs Sg control or CAFs Sg MCL-1 at T0 and after 68 h. (Right) Quantification of wound closure expressed in percentage of total wound recovery at indicated time points during the scratch wound assay. Student *t*-test (ns: not significant). **C** Proliferation of T47D-eGFP cancer cells in coculture with CAFs pretreated or not with S63845 measured. Confluency was measured using time-lapse video-microscopy (incucyte live cells analysis) during 120 h. Student *t*-test ($****P < 0.0001$).

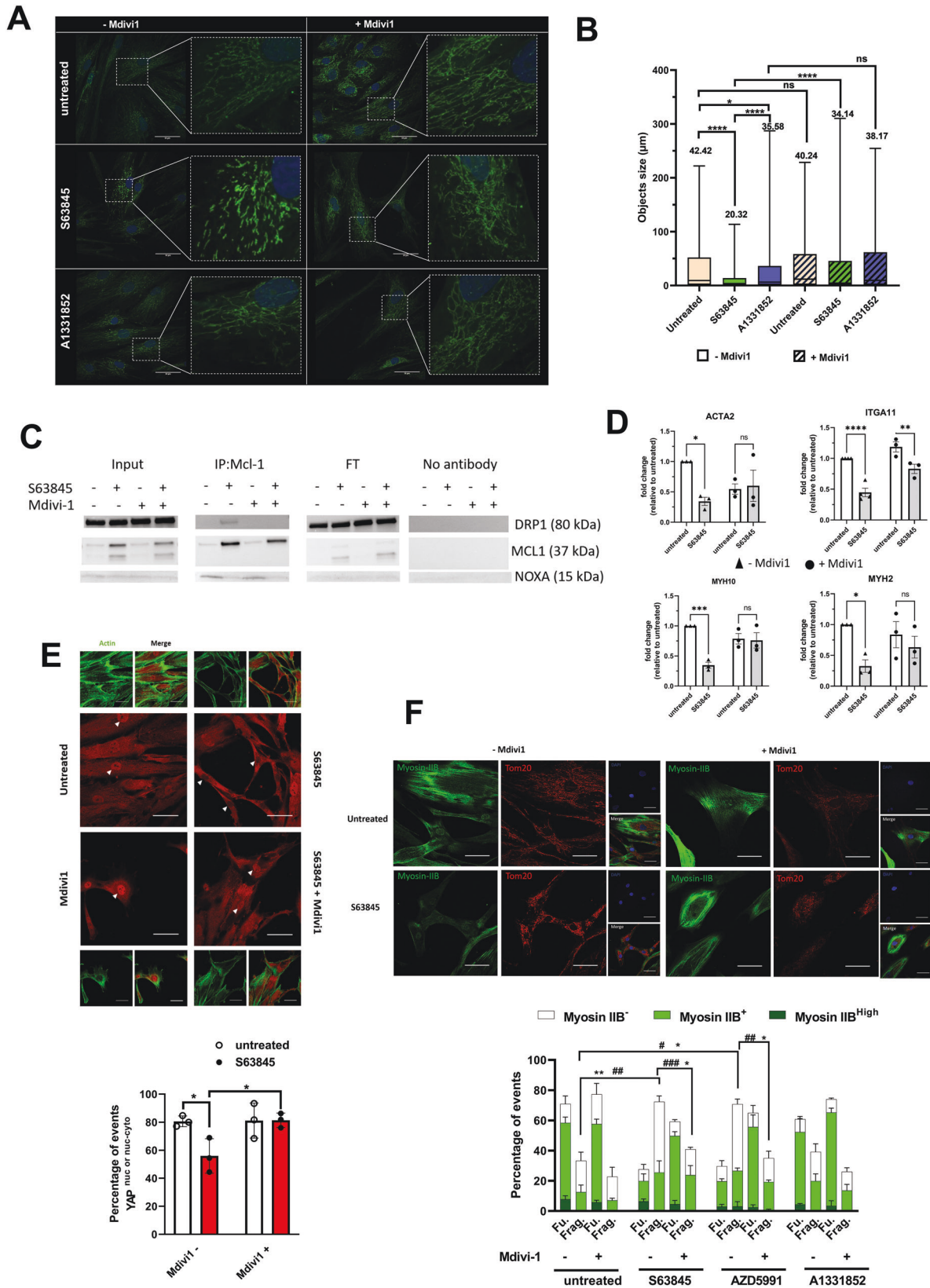
brings support to the notion that MCL-1 targeting may improve the treatment of breast cancer [20, 25] while putting forth an effect not only on cancer cells but also on non-malignant cells that interact with them. One implication is that the therapeutic potential of BH3 mimetics inhibiting MCL-1 may be preclinically overlooked if reductive models using only tumor cells are used. Our study highlights instead that diverse cellular components of the microenvironment may experience an intense pressure on BCL-2 family dependent mechanisms during tumor growth. This advocates for the use of assays that include cellular components of the microenvironment to investigate the effects of targeted agents such as BH3 mimetics, but also of cytotoxic compounds that indirectly impact on the BCL-2 network.

While in some models BH3 mimetics antagonizing MCL-1 efficiently counter tumor progression [32], the sole targeting of MCL-1 in solid tumors proved little efficiency to trigger cell death on its own, both in xenograft and PDX immunodeficient mice models [25, 33]. Likewise, we observed that treatment of bCAFs with S63845 only induced moderate apoptotic rates. Moreover, treatment with a BCL-xL antagonist (A1331852), which alone did not induce bCAF death, did so in combination with S63845. Inefficient killing of the latter as a single agent may thus ensue from dynamic sequestration by BCL-xL of pro-apoptotic proteins released from MCL-1 upon treatment. We cannot rule out, however, that S63845 inefficiency when used alone may stem from the lack of binding of pro-apoptotic proteins to MCL-1 at baseline, (leaving “empty” MCL-1 available to engage pro-apoptotic proteins released from BCL-xL by A1331852, and to protect from cell death). In all cases, our functional studies show that MCL-1 combines its anti-apoptotic activity with that of BCL-xL to maintain bCAFs survival. Consistently, CRISPR-Cas9 engineered

knock down of MCL-1 in bCAFs dramatically sensitized them to a BCL-xL inhibitor.

Even though the pro-apoptotic effects of MCL-1 targeting are restrained by BCL-xL activity, MCL-1 targeting by itself modifies the tumorigenic phenotype of bCAFs by mitigating their myofibroblastic features and invasive properties. Our study evokes reports indicating that MCL-1 is not only an anti-apoptotic protein determining life death decisions but also a more subtle regulator of the phenotype, and the mechanical properties in particular, of various cell types. A role for MCL-1 in cellular differentiation was defined in cardiomyocytes, and stem cells [29, 30] and the antagonistic effects of its pharmacological inhibition by S63845 in cardiomyocyte function and contractility was described [30]. This latter effect, which corroborates our study, may be the basis for the dose limiting cardiotoxic effect of MCL-1 antagonists when used in the clinic [34]. The therapeutic window for exploiting the effects of MCL-1 targeting on a myofibroblastic tumor stroma described here may thus be narrow, unless specific tumor delivery strategies intervene.

Our study indicates a strong dependency on MCL-1 of the myCAF phenotype. CAFs are a heterogeneous component of the cellular microenvironment as underlined by numerous studies identifying phenotypically distinct CAFs subsets in various cancers [3, 19, 35–38]. There seems to be some consensus regarding the existence of perivascular CAFs and of ECM rich CAFs. The latter population is enriched by our isolation protocol [13], and heterogeneous in itself. Breast ECM-CAF encompass, in molecular subtype dependent and patient specific proportions, CAF subsets endowed with an inflammatory phenotype (iCAFs) and other myofibroblastic CAFs (myCAFs). A similar dichotomy was described in pancreatic ductal adenocarcinoma models and clinical samples,



where IL1-driven iCAFs and TGF β driven myCAFs were described [39]. The latter study unravels an “activation” process with a transition from normal fibroblasts to a single CAF phenotype, later diverging to either iCAF or myCAF. MyCAFs are of particular

relevance as they exert an immunosuppressive effect and are associated with primary resistance with immunotherapy. Further studies are required to determine at which step(s) of this CAF “activation” MCL-1 is involved. In particular, understanding whether

Fig. 5 MCL-1 targeting induces changes in actomyosin structure organization in a DRP-1-dependent manner. **A** Mitochondrial fission was detected by TOM20 staining in CAFs treated or not with S63845 500 nM or A1331852 100 nM for 18 h in the presence or not of Mdivi-1 50 μ M. Scale bar = 50 μ m. **B** Quantification of mitochondrial network length was performed by measuring the size of TOM-20 labeled structures on deconvolved images in 10 cells/condition in 3 independent experiments. Objects smaller than 0.5 μ m were not considered. **C** Representative co-immunoprecipitation of MCL-1 and DRP-1 and western blotting for MCL-1, DRP1, or NOXA in CAFs treated or not with S63845 in presence or not of Mdivi-1 ($n = 3$). FT: Flow Through. **D** qRT-PCR of MYH10, MYH2, ACTA2, and ITGA11 mRNA in CAFs treated or not by S63845 500 nM for 18 h in the presence or not of Mdivi-1. Mean and SEM of three independent experiments are represented as fold-change of mRNA level related to untreated control. Two-way ANOVA, * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns: not significant. **E** Quantification (percentage of cells positive for nuclear YAP or nuclear and cytosolic YAP) (Bottom) and confocal image (Top) of YAP staining (red) and FITC-phalloidin (green) in CAFs treated or not with S63845. Randomly generated images set names were randomized for analysis. Around sixty to one-hundred cells were analyzed per condition. Counting events were done manually through NIS-Elements software (Nikon software). Fluorescence intensity and positivity staining were determined by positive and negative control comparison, dependent on the experiment. The nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 50 μ m. Two-way ANOVA, * $P < 0.05$. **F** Quantification (Bottom) and confocal image (Top) of Myosin IIB staining (green) and immunofluorescence of TOM-20 (red) in CAFs treated or not with different BH3 mimetics (as indicated) in the presence or not of Mdivi-1. Randomly generated images set names were randomized for analysis. Around sixty to one-hundred cells were analyzed per condition. Counting events were done manually through NIS-Elements software (Nikon software). Fluorescence intensity and positivity staining were determined by positive and negative control comparison, dependent on the experiment. The nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 50 μ m, Two-way ANOVA, **** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ for myosin IIB-, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ for fragmented mitochondria.

MCL-1 expression and interactome are differently regulated in distinct subsets during activation is of particular interest.

One of the most exciting implication from our study is that it shows that CAFs "activation", or at least some steps of this complex and tumorigenic process may be reversible, as myofibroblastic features can be pharmacologically reversed using a small molecule targeting MCL-1. Our data argue that the molecular basis for the effects of S63845 in bCAFs are not canonical, in that they seem to associate neither to the release of one or more pro-apoptotic proteins from MCL-1 nor to obvious MOMP. Consistently, the effects of S63845 do not necessitate BAX-BAK expression: MCL-1 targeting induced mitochondrial fragmentation BAX-BAK KD bCAFs (Supplementary Fig. 2D), note that these cells are resistant to S63845 combined with A1331852 (Supplementary Fig. 2E). We instead ascribed the effects of S63845 to induction of mitochondrial fragmentation, as changes induced in the actomyosin network by MCL-1 targeting where counteracted by inhibition of DRP-1. This evokes reports of an active, possibly groove independent role for MCL-1 in mitochondrial fission in mouse embryonic fibroblasts [40] and of the effects of S63845 treatment on mitochondrial fission and on the inhibition of cardiomyocyte function and contractility [30]. MCL-1 is a very labile protein with a half-life protein around 30 min [13, 24] stabilized in many cell types by occupancy of its BH3-binding groove by endogenous proteins or S63845 [21–23, 34, 41]. This also occurs in bCAFs as S63845 induces an increase in MCL-1 protein expression level and further studies are required to identify bCAF expressed proteins involved in MCL-1 turn-over. Stabilization of MCL-1 in S63845 treated bCAFs coincides with its interaction with DRP-1 in a Mdivi-1-sensitive manner. MCL-1 was already described to interact with DRP-1 (in addition to OPA1), for instance in human pluripotent stem cells (hPSCs) and in hPSC-derived cardiomyocytes [40, 42] [29, 30]. The most likely explanation for the S63845 short-term effect in bCAFs is that the treatment allows groove independent interaction of MCL-1 with DRP-1 at mitochondria (where MCL-1 was found to accumulate), leading to organelle fission and subsequent loss of myofibroblastic features. MCL-1 also appears to contribute to the myofibroblastic features of CAFs by other mechanisms, unrelated to acute mitochondrial fission, as MCL-1 knock down CAFs are phenotypically altered in a Mdivi-1 manner without exhibiting overt mitochondrial fragmentation. Further studies are required to unravel how loss of MCL-1 impacts on myofibroblastic features in the long-term. As inflammatory and myofibroblastic CAFs phenotypes are mutually exclusive, one may speculate that MCL-1 loss (which induces the

expression of inflammatory genes in a Mdivi-1 independent manner) may erode the latter by favoring the former.

Our description of the effects of S63845 unravels a link, in bCAFs, between mitochondrial fusion/fission dynamics, actomyosin cytoskeleton and the expression of a set of myofibroblastic genes. These are known to be regulated by transcription factors such as SRF-MRTF and YAP-TEAD whose mechano-dependent activity is itself dependent on an active actomyosin network [11]. We propose that S63845 treatment interferes with this positive feedback loop, as it prevented the nuclear localization of YAP in the same time as it prevented actomyosin fibers formation. Numerous studies have established an influence of mitochondrial function on cytoskeleton organization and/or mechano-dependent transcription factors [43, 44]. It should be noted that we observed changes in myofibroblastic features during S63845 treatment whereas we could not detect any change in mitochondrial mass or oxidative phosphorylation. We thus propose that the biological effect we describe relies on a more direct link between the mitochondrial fusion-fission machinery and the cytoskeleton.

The effects of S63845 (and of the related AZD molecule) and of MCL-1 knock down herein reported pleads for the use of MCL-1 inhibitors for the treatments of cancers with stromal evolutions into myofibroblasts (with advantages and limitations discussed above) but also give indications about the influence of current treatments might have on the tumor stroma. It is relevant here to note that MCL-1 mRNA and protein expression levels are inhibited by anthracyclines, which are part of the chemotherapeutic cocktail used for breast cancer therapy. Analyzing the clinical effects of chemotherapy on CAF expressed MCL-1 may thus help predict tumor response.

METHODS AND MATERIALS

Cell culture and reagents

Fresh human mammary samples were obtained from treatment naive patients with invasive carcinoma after surgical resection at the Institut de Cancérologie de l'Ouest, Nantes/Angers, France. As required by the French Committee for the Protection of Human Subjects, informed consent was obtained from enrolled patients and protocol was approved by Ministère de la Recherche (agreement no.: DC-2012-1598) and by local ethic committee (agreement no.: CB 2012/06). Breast cancer-associated fibroblasts (bCAFs) isolation and characterization were previously described in Louault et al. [13].

For the CRISPR Cas9-induced knock-out (KO) primary bCAFs, single-guide (sg) RNA sequences targeting human genes were designed using the CRISPR design tool (<http://crispor.tefor.net>). The guide sequences CGCGTGACGTCCGGGACCT were cloned in the plentiCRISPRV2 vector that was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid # 52961) [45]. Cells

were selected using 1 µg/ml puromycin and protein extinction were confirmed by immunoblot analysis.

The human breast cancer cell lines T47D were purchased from American Type Culture Collection (Bethesda, MD, USA), GFP was introduced by lentiviral infection with PFG12 (insert EGFP) from Addgene. FG12 was a gift from David Baltimore (Addgene plasmid # 14884; <http://n2t.net/addgene:14884>; RRID:Addgene_14884).

BH3 mimetics, S63845 and ABT-199 (Chemietek, Indianapolis, IN, USA), AZD-5991 and A1331852 (MedChemExpress, NJ, USA), ABT-737 (Selleckchem, Houston, TX, USA), and Q-VD-OPh (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and Mdivi-1 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) were diluted in DMSO and used at the indicated concentrations.

Apoptosis assays

The activity of caspase-3/7 was measured by Caspase-Glo-3/7 assay kit according to the manufacturer's instructions (Promega). Cell death was assessed by an Annexin-V FITC-binding assay (Miltenyi, France) performed according to manufacturer's instructions. Flow-cytometry analysis was performed on an Accuri C6 flow cytometer (BD biosciences San Jose, CA, USA).

Immunocytochemistry

Cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde/4% sucrose for 15 min. Cells were permeabilized for 5 min at room temperature in 0.25% Triton-X-100 in PBS, washed twice with PBS, and incubated for 30 min at 37 °C in PBS containing 10% BSA. Cells were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies diluted in PBS containing 3% BSA. Antibodies used were as follows: mouse anti alpha-SMA (1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); Myosin-IIb (1:1000, BioLegend, San Diego, CA, USA); YAP1 (1:50, Proteintech, Manchester, UK); TOM20 (1:80, Santa Cruz Biotech., Dallas, TX, USA); MCL-1 (1:800, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); Vimentin (1:100, Merck, Darmstadt, Germany). Actin labeling were performed with Alexa 488-conjugated Phalloidin (1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). After washing, cells were incubated for 90 min at room temperature with the appropriate Alexa 488-conjugated secondary antibodies diluted in PBS containing 3% BSA. Cells were washed with PBS and mounted with ProLong Diamond Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Fluorescence images were acquired with Nikon A1 Rsi Inverted Confocal Microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with NIS-Elements software (Nikon). Images set position were generated randomly through NIS-Elements JOBS module (Nikon).

Immunoblot analysis

Cells were re-suspended in lysis buffer (1% SDS; 10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8.1; 1 mM PMSF; 10 µg/ml aprotinin; 10 µg/ml leupeptin; 10 µg/ml pepstatin; 1 mM Na3VO4 and 50 mM NaF). For western blotting, following SDS-PAGE, proteins were transferred to 0.45 µm nitrocellulose membranes using Trans-Blot® Turbo™ Transfer System Cell system (Bio-Rad). The membrane was then blocked in 5% nonfat dry milk TBS 0.05% Tween 20 and incubated with primary antibody overnight at 4 °C. Blots were incubated with the appropriate secondary antibodies for 1 h at room temperature and visualized using the Chemi-Doc XRS + system (Bio-Rad). The used primary antibodies were anti-α-SMA (Invitrogen) (MA5 11547), anti-Myosin-IIb (BioLegend) (909901), anti-MCL-1 (Santa Cruz) (sc-819) anti-Bax (Dako) (A3533), anti-Bak (Cell signaling) (3814), anti-Tom20 (ab186734) (Abcam) anti-β-ACTIN (Millipore) (MAB1501R). Whole uncropped images of the original western blots are presented in Supplementary Fig. 4.

Co-Immunoprecipitation

CAFs were collected in lysis buffer (CHAPS 1%, TRIS-HCl 20 mM pH=7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH=8.0, proteases and phosphatases inhibitors). Co-Immunoprecipitation was performed using PureProteome™ Protein A Magnetic Beads (Millipore, LSKMAGA10). Protein extracts were first precleared using 10 µl of beads for 200 µg of proteins (1-h incubation at 4 °C). 2 µl of anti-MCL-1 antibody (Cell signaling mAb #94296) and 10 µl of beads were then used for 200 µg of proteins following manufacturer's instructions. For western blotting, DRP-1 antibody (MA5-26255, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used as primary antibody (1:1000) and the same anti-MCL-1 primary antibody (1:1000). Clean-Blot™ IP Detection Reagent (HRP) (Thermo Scientific #21230) was used as secondary antibody (1:1000). Whole uncropped images of the original western blots are presented in Supplementary Fig. 4.

Seahorse

OCR measurements were performed using the Seahorse XF HS Mini Analyzer (Seahorse Bioscience). Cells were plated in duplicate in 8-well seahorse plate (7000 cells per well) and treated with S63845 500 nM for 18 h. Then, medium was replaced by glutamine/glucose/pyruvate-free DMEM (no sodium bicarbonate) adjusted to pH 7.4 and incubated for 45 min at 37% in a CO₂-free incubator. OCR was normalized to cell number ratio determined by cell counting at the end of the experiment.

Analysis of mRNA expression data in CAFs

Sample were analyzed according to the following protocol [46]. Gene expression profiles are generated by parsing the alignment files (.bam) and counting for each sample the number of UMIs associated with each gene. Reads aligned on multiple genes, containing more than three mismatches with the reference sequence or having a polyA pattern are discarded. Finally, a matrix containing the counts of all genes on all samples is produced. The expression values, corresponding to the absolute abundance of mRNAs in all samples, is then ready for further gene expression analysis. From normalized count matrix (DESeq2 package) [47], batch effect was corrected according to CAF patient origin using Limma package. Differentially expressed genes were calculated using eBayes function (Limma) and filtered in with an adjusted p-value inferior to 0.05 and a log2 fold-change superior to 1. Heatmap was built with complexHeatmap package using euclidean distance and ward D2 clustering method. Pathway enrichment analysis was done using clusterprofiler package.

Transcription factor activation was determined using gene set enrichment analysis (GSEA, fgsea package) using "TFT_Legacy" from molecular signature database (msigdb package) and *t*-test-ranked genes.

Collagen gel contraction assay

Fibroblasts (100,000 cells) were re-suspended in 500 µl collagen type I suspension (1 mg/ml) (BD/corning) (354249) in DMEM supplemented with 1% FBS. Cell suspension was cast into each well of 24-well tissue culture plate and incubated at 37 °C for 1 h in order to facilitate gelation. Following this, gels were released from the surface of the culture well using a sterile tip. Contraction between the different conditions was evaluated at 3 h.

RNA isolation and quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated using Nucleospin RNA (Macherey-nagel, Hoerd, France) and transcribed into cDNA by Maxima First Strand cDNA synthesis Kit (Thermo scientific). Quantitative RT-PCR (qPCR) was performed using the EurobioGreen qPCR Mix Lo-Rox with qTOWER (Analytik-jena, jena, Germany). Reaction was done in 10 µl final with 4 ng RNA equivalent of cDNA and 150 nM primers. Relative quantity of mRNA was estimated by Pfaffl method [48] and normalized on the average relative quantity of two housekeeping genes.

```
RPLP05'-AACCCAGCTCTGGAGAACT/CCCTGGAGATTTTGTGGT-3'
GAPDH5'-CAAAGGGTATCATCTCTGC/AGTTGTCATGGATGACCTTGG-3'
ACTA25'-CTATGCTCTGGACGCACAAC/CAGATCCAGACGCATGATGGCA-3'
MYH25'-GTCTGCCAATCCAGAAGC/CAGCTGTCAAATCTCTCTGAA-3'
MYH105'-GACTGAGGCGCTGGATCTGT/AAAGCAATTGCCCTTCAGCC-3'
ITGA115'-CGGCCTCCAGTATTTGGCT/GGAGGCTGGCATTGATCTGA-3'
ESM1 5'-AAAGGCTGCTGATGTAGT/TCTCTGAGGTGGCATACG-3'
IL33 5'-AATCAGGTGACGGTGTG/ACACTCCAGGATCAGTCTTG-3'
CCL7 5'-ACCACAGTAGCCACTGTCC/GAGGAGCATCCCACAGTTTT-3'
HAS2 5'-TCGCAACACGTAACGC/ACTTCTTTTTCCACCCATTT-3'
```

3D spheroid collagen invasion

3D-spheroids were obtained by re-suspending cells at a concentration of 1.25×10^4 cells/ml in 20% Methyl-cellulose/80% DMEM 10% FBS. Then, 100 µl per well were distributed in 96-well-conical-plates (non-treated surface) and centrifuged 1 min at 200 × *g*. Spheroids were harvested the next day and transferred in a collagen type I suspension (2 mg/ml) (BD/corning) (354249) supplemented with 1% FBS in the presence of the indicated treatments. After collagen polymerization, DMEM 1% FBS (+/- treatment) were added to the top of each well to prevent any gel desiccation. Invasion was monitored by fully automated *Dmi6000b Wide Field Fluorescence Microscope* (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) during 48 h.

Wound-healing assay

Uniform wounds were obtained into the cell culture by using the ibidi Culture-Insert 2 well (ibidi GmbH Munich, Germany, No. 81176). The

culture-Inserts were placed in the individual wells of a 12-well plate. In each reservoir, T47D cancer cells (1×10^5 cells) were plated in 100 μ l DMEM 10% FBS. The silicon inserts were removed after the cells had undergone confluence. The gaps created were washed with PBS and each well was filled with 1 ml conditioned media from CAF sg Control or CAF sg MCL-1 (conditioning for 48 h in DMEM 1% FBS). Migration of the cells (wound closure) was monitored by fully automated *Dmi6000b Wide Field Fluorescence Microscope* (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Cell proliferation

For cell proliferation, we used live-cell imaging using an IncuCyte FLR imaging system (Essen BioScience). Briefly, T47D-eGFP cancer cells (8×10^4 cells) were plated into 24-well plates containing CAFs sg control or sg MCL-1 (1×10^5 cells plated 2 days before and treated or not with S63845 500 nM for 18 h) in DMEM 1% FBS. Plates were scanned every 24 h for 120 h, scanning 9 fields per well. Results are expressed as percentage of fluorescence intensity relative to T0.

Statistical analysis

Student's *t*-tests was used for statistical analysis in experiments with two groups and Two-way analysis of variance (ANOVA) was used for statistical analysis for overall condition effects with GraphPad Prism 5.0 Software. All data are presented as mean \pm SEM of at least three independent experiments. The symbols correspond to a *P*-value inferior to *0.05, **0.01, ***0.001, and **** 0.0001.

DATA AVAILABILITY

RNAseq data are available on Gene Expression Omnibus under the accession number GSE211012.

REFERENCES

- Bu L, Baba H, Yoshida N, Miyake K, Yasuda T, Uchihara T, et al. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene* [Internet]. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0765-y>.
- Louault K, Li RR, DeClerck YA. Cancer-associated fibroblasts: understanding their heterogeneity. *Cancers* 2020;12:3108.
- Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Pelon F, Bourachot B, Cardon M, et al. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer. *Cancer Cell*. 2018;33:463–79.
- Wu SZ, Roden DL, Wang C, Holliday H, Harvey K, Cazet AS, et al. Stromal cell diversity associated with immune evasion in human triple-negative breast cancer. *EMBO J*. 2020;39:e104063.
- Yamashita M, Ogawa T, Zhang X, Hanamura N, Kashikura Y, Takamura M, et al. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer*. 2012;19:170–6.
- Northey JJ, Barrett AS, Acerbi I, Hayward MK, Talamantes S, Dean IS, et al. Stiff stroma increases breast cancer risk by inducing the oncogene ZNF217 [Internet]. *J Clin Invest*. 2020;130:5721–37.
- Hanley CJ, Mellone M, Ford K, Thirdborough SM, Mellows T, Frampton SJ, et al. Targeting the myofibroblastic cancer-associated fibroblast phenotype through inhibition of NOX4. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110:109–120.
- Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9:1392–400.
- Wever OD, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer*. 2008;123:2229–38.
- Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol*. 2013;15:637–46.
- Foster CT, Gualdrini F, Treisman R. Mutual dependence of the MRTF-SRF and YAP-TEAD pathways in cancer-associated fibroblasts is indirect and mediated by cytoskeletal dynamics. *Genes Dev*. 2017;31:2361–75.
- Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:20009–14.
- Louault K, Bonneaud TL, Séveno C, Gomez-Bougie P, Nguyen F, Gautier F, et al. Interactions between cancer-associated fibroblasts and tumor cells promote MCL-1 dependency in estrogen receptor-positive breast cancers. *Oncogene* 2019;38:3261–73.
- Nocquet L, Juin PP, Souazé F. Mitochondria at center of exchanges between cancer cells and cancer-associated fibroblasts during tumor progression. *Cancers* 2020;12:3017.
- Belhabib I, Zaghoudi S, Lac C, Bousquet C, Jean C. Extracellular matrices and cancer-associated fibroblasts: targets for cancer diagnosis and therapy? *Cancers*. 2021;13:3466.
- Sala L, Franco-Valls H, Stanisavljevic J, Curto J, Vergés J, Peña R, et al. Abrogation of myofibroblast activities in metastasis and fibrosis by methyltransferase inhibition. *Int J Cancer*. 2019;145:3064–77.
- Lagares D, Santos A, Grasberger PE, Liu F, Probst CK, Rahimi RA, et al. Targeted apoptosis of myofibroblasts with the BH3 mimetic ABT-263 reverses established fibrosis. *Sci Transl Med*. 2017;9:eal3765.
- Zhou Y, Huang X, Hecker L, Kurundkar D, Kurundkar A, Liu H, et al. Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2013;123:1096–108.
- Kieffer Y, Hocine HR, Gentric G, Pelon F, Bernard C, Bourachot B, et al. Single-cell analysis reveals fibroblast clusters linked to immunotherapy resistance in cancer. *Cancer Disco*. 2020;10:1330–51.
- Bolomsky A, Vogler M, Köse MC, Heckman CA, Ehk G, Ludwig H, et al. MCL-1 inhibitors, fast-lane development of a new class of anti-cancer agents. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2020;13:173.
- Conage-Pough JE, Boise LH. Phosphorylation alters Bim-mediated Mcl-1 stabilization and priming. *FEBS J*. 2018;285:2626–40.
- Singh PK, Roukounakis A, Frank DO, Kirschnek S, Das KK, Neumann S, et al. Dynein light chain 1 induces assembly of large Bim complexes on mitochondria that stabilize Mcl-1 and regulate apoptosis. *Genes Dev*. 2017;31:1754–69.
- Czabotar PE, Lee EF, van Delft MF, Day CL, Smith BJ, Huang DCS, et al. Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:6217–22.
- Nijhawan D. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev*. 2003;17:1475–86.
- Merino D, Whittle JR, Vaillant F, Serrano A, Gong JN, Giner G, et al. Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer. *Sci Transl Med*. 2017;9:eam7049.
- Shen JX, Liu J, Zhang GJ. Interleukin-33 in malignancies: friends or foes? *Front Immunol*. 2018;9:3051.
- Zhang H, Shen YW, Zhang LJ, Chen JJ, Bian HT, Gu WJ, et al. Targeting endothelial cell-specific molecule 1 protein in cancer: a promising therapeutic approach. *Front Oncol*. 2021;11:687120.
- Udabage L, Brownlee GR, Waltham M, Blick T, Walker EC, Heldin P, et al. Antisense-mediated suppression of hyaluronan synthase 2 inhibits the tumorigenesis and progression of breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65:6139–50.
- Rasmussen ML, Kline LA, Park KP, Ortolano NA, Romero-Morales AI, Anthony CC, et al. A non-apoptotic function of MCL-1 in promoting pluripotency and modulating mitochondrial dynamics in stem cells. *Stem Cell Rep*. 2018;10:684–92.
- Rasmussen ML, Taneja N, Neininger AC, Wang L, Robertson GL, Riffle SN, et al. MCL-1 inhibition by selective BH3 mimetics disrupts mitochondrial dynamics causing loss of viability and functionality of human cardiomyocytes. *iScience* 2020;23:101015.
- Kuragano M, Uyeda TQP, Kamijo K, Murakami Y, Takahashi M. Different contributions of nonmuscle myosin IIA and IIB to the organization of stress fiber subtypes in fibroblasts. *Wang YL, editor. Mol Biol Cell*. 2018;29:911–22.
- Campbell KJ, Mason SM, Winder ML, Willemssen RBE, Cloix C, Lawson H, et al. Breast cancer dependence on MCL-1 is due to its canonical anti-apoptotic function. *Cell Death Differ*. 2021;28:2589–600.
- Annunziato S, de Ruiter JR, Henneman L, Brambillasca CS, Lutz C, Vaillant F, et al. Comparative oncogenomics identifies combinations of driver genes and drug targets in BRCA1-mutated breast cancer. *Nat Commun*. 2019;10:397.
- Kotschy A, Szlavik Z, Murray J, Davidson J, Maragno AL, Le Toumelin-Braizat G, et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 2016;538:477–82.
- Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvisé M, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2017;214:579–96.
- Cremasco F, Astarita JL, Grauel AL, Keerthivasan S, MacIsaac K, Woodruff MC, et al. FAP delineates heterogeneous and functionally divergent stromal cells in immune-excluded breast tumors. *Cancer Immunol Res*. 2018;6:1472–85.
- Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Ragulan C, Cros J, Patil Y, Martinet M, et al. Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol*. 2019;248:51–65.
- Su S, Chen J, Yao H, Liu J, Yu S, Lao L, et al. CD10+GPR77+ cancer-associated fibroblasts promote cancer formation and chemoresistance by sustaining cancer stemness. *Cell* 2018;172:841–56.

39. Dominguez CX, Müller S, Keerthivasan S, Koeppen H, Hung J, Gierke S, et al. Single-cell RNA sequencing reveals stromal evolution into LRRIC15⁺ myofibroblasts as a determinant of patient response to cancer immunotherapy. *Cancer Discov.* 2020;10:232–53.
40. Moyzis AG, Lally NS, Liang W, Leon LJ, Najor RH, Orogo AM, et al. Mcl-1-mediated mitochondrial fission protects against stress but impairs cardiac adaptation to exercise. *J Mol Cell Cardiol.* 2020;146:109–20.
41. Caenepeel S, Brown SP, Belmontes B, Moody G, Keegan KS, Chui D, et al. AMG 176, a selective MCL1 inhibitor, is effective in hematologic cancer models alone and in combination with established therapies. *Cancer Discov.* 2018;8:1582–97.
42. Morciano G, Giorgi C, Balestra D, Marchi S, Perrone D, Pinotti M, et al. Mcl-1 involvement in mitochondrial dynamics is associated with apoptotic cell death. Newmeyer DD, editor. *Mol Biol Cell.* 2016;27:20–34.
43. von Eyss B, Jaenicke LA, Kortlever RM, Royle N, Wiese KE, Letschert S, et al. A MYC-driven change in mitochondrial dynamics limits YAP/TAZ function in mammary epithelial cells and breast cancer. *Cancer Cell.* 2015;28:743–57.
44. Huang S, Wang X, Wu X, Yu J, Li J, Huang X, et al. Yap regulates mitochondrial structural remodeling during myoblast differentiation. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2018;315:C474–84.
45. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods.* 2014;11:783–4.
46. Charpentier E, Cornec M, Dumont S, Meistermann D, Bordron P, David L, et al. 3' RNA sequencing for robust and low-cost gene expression profiling [Internet]. Protocol Exchange; 2021 Jan [cited 2021 Oct 7]. Available from: <https://protocolexchange.researchsquare.com/article/pex-1336/v1>.
47. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15:550.
48. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:45e–45.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank members of the “Stress adaptation and tumor escape” laboratory for their support. We thank Drs V. Maguer-Satta, C. Blanquart, and V. Sauzeau for fruitful discussions and their suggestions. We thank P. Gomez, C. Seiller, and Gavard-Bidère team members for providing reagents and technical advice. We benefited from technical support from the cytometry (CytoCell). We acknowledge the MicroPICell facility, SFR-Santé, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France, member of the national infrastructure France-Biomed supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04), special thanks to P. Hulin and S. Nedellec for their advice. We are most grateful to the Genomics Core Facility GenoA, member of Biogenouest and France Genomique and to the Bioinformatics Core Facility BiRD, member of Biogenouest and Institut Français de Bioinformatique (IFB) (ANR-11-INBS-0013) for the use of their resources and their technical support. T.L. Bonneaud was supported by a *fellowship* from Ligue contre le cancer (CD44 and CD36), A. Basseville received a funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 841313, and L. Nocquet was a recipient of French ministry of Higher Education, Research and Innovation. This work was supported by INCa (SIRIC ILIAD, INCa-DGOS Inserm-12558 and INCa-PLBio 16086), Ligue contre le cancer (CD44, CD53 and CD22) and Run Odyssey to ICO-Gauducheau.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TLB, CCL, LN, JR, HW, and FS conducted experiments. TLB, CCL, LN, PPJ, and FS designed the experiments. TLB, CCL, LN, AB, PPJ, and FS analyzed the data. MC gave

assistance in collecting tissue samples. AB, PPJ, and FS wrote the paper. PPJ and FS obtained funding. PPJ and FS conceived the study and supervised it.

FUNDING

TLB was supported by a *fellowship* from Ligue contre le cancer (CD44 and CD36), AB received a funding from the European Union’s Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 841313, and LN was a recipient of French ministry of Higher Education, Research and Innovation. This work was supported by INCa (SIRIC ILIAD, INCa-DGOS Inserm-12558, and INCa-PLBio 16086), Ligue contre le cancer (CD44, CD53, and CD22) and Run Odyssey to ICO-Gauducheau.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Informed consent was obtained from enrolled patients and protocol was approved by Ministère de la Recherche (agreement no.: DC-2012-1598) and by local ethic committee (agreement no.: CB 2012/06).

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05214-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Philippe P. Juin or Frédérique Souazé.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

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



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/>.

© The Author(s) 2022

Titre : Etude de la résistance à l'apoptose des cellules de cancer du sein triple négatif sous l'influence des fibroblastes associés au cancer

Mots clés : Apoptose, Cancer du sein, Fibroblaste associé au cancer, BH3 mimétiques, Métabolisme

Résumé :

Les cancers du sein triple négatifs (CSTN) sont particulièrement agressifs. Les résistances à l'apoptose (une mort cellulaire programmée), résultantes d'un dérèglement de l'équilibre entre protéines de la famille BCL-2, limitent la réponse aux chimiothérapies. Les fibroblastes associés au cancer (CAFs) participent à la résistance aux traitements. Dans ce contexte, notre étude vise à mieux comprendre comment les CAFs influencent la réponse des cellules malignes de CSTN à l'apoptose.

Nous montrons que les protéines anti-apoptotiques BCL-xL et MCL-1 jouent conjointement un rôle central dans la survie des lignées de CSTN, et que BCL-xL est le frein majeur à l'efficacité d'une chimiothérapie conventionnelle. De plus, nous révélons que les CAFs provenant de tumeurs mammaires de patientes contribuent à la chimiorésistance des cellules malignes de CSTN même lorsque la résistance induite par BCL-xL est outrepassée.

Cela souligne l'intérêt majeur de mieux comprendre le dialogue entre CAFs et cellules malignes lors d'un ciblage de BCL-xL, afin d'identifier des vulnérabilités thérapeutiques. Nous montrons alors que les CAFs réduisent la sensibilité à l'apoptose des cellules malignes induite par le ciblage de BCL-xL en limitant la disponibilité en glucose. De plus, la protéine MCL-1 est impliquée dans les effets protecteurs des CAFs. Enfin, la metformine, un anti-diabétique, est capable d'annuler les effets protecteurs des CAFs en lien avec la privation en glucose qu'ils induisent.

Pour conclure, notre étude indique que l'exploration de l'interaction entre les CAFs et les cellules malignes ouvre la voie à de nouvelles associations thérapeutiques pour améliorer le traitement du CSTN.

Title : Resistance to apoptosis in triple-negative breast cancer cells under the influence of cancer-associated fibroblasts

Keywords : Apoptosis, Breast cancer, Cancer-associated fibroblast, BH3 mimetics, Metabolism

Abstract :

Triple-negative breast cancers (TNBC) are known for their high level of aggressiveness. Resistance to apoptosis, a controlled form of cell death, arises from an imbalance in BCL-2 family proteins and hinders the effectiveness of chemotherapy. Moreover, cancer-associated fibroblasts (CAFs) are associated with tumor progression and resistance to treatments. Our study aims to gain a deeper understanding of how CAFs influence the response of TNBC to apoptosis.

We show that anti-apoptotic proteins BCL-xL and MCL-1 collectively play a significant role in the survival of TNBC cell lines. Additionally, BCL-xL is a major resistance factor to conventional chemotherapy. Our results also reveal that patient-derived CAFs contribute to chemoresistance even when BCL-xL is overcome.

This underscores the importance of studying the dialog between CAFs and malignant cells when targeting BCL-xL, in order to identify potential therapeutic vulnerabilities.

In this context, we show that CAFs limit malignant cells sensitivity to BCL-xL-targeting-induced apoptosis by limiting glucose availability. MCL-1 is implicated in this protective effect. Finally, metformin, an anti-diabetic treatment, counteracts CAFs protective effect in connection with glucose deprivation.

Our work shows that investigating the interactions between CAFs and malignant cells leads to the identification of therapies that could potentially improve apoptosis-inducing treatments efficacy in TNBC.