

Glossaire

A

ADA : adénosine désaminase

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNmt : acide désoxyribonucléique mitochondrial

ADNg : acide désoxyribonucléique génomique

AMP : adénosine monophosphate

Ara-C : cytosine arabinoside (cytarabine)

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNr : acide ribonucléique ribosomique

ATP : adénosine triphosphate

5-Aza-dC : 5-aza-2'-désoxycytidine (décitabine)

B

BLM : gène de Bloom

C

C : cytidine

CAD : carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase

CDA : cytidine désaminase

CMP : cytidine monophosphate

CO : cytochrome oxydase

COD : cytosine désaminase

CTP : cytidine triphosphate

CTPS1 : CTP synthase 1

D

dC : désoxycytidine

DCF : 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate

dCK : désoxycytidine kinase

dCTP : désoxycytidine triphosphate

dFdC : difluorodésoxycytidine (gemcitabine)

dFdU : difluorodésoxyuridine

DHODH : dihydroorotate déshydrogénase

dNTP : désoxy-nucléotides triphosphate

DR : 1,3-diazépinone riboside

Drp1 : dynamin related protein 1

dU : désoxyuridine

E

ENO : énalase

ERRa : Estrogen-related receptor alpha

F

FBP : fructose-1,6-biphosphate

FH : fumarate hydratase

5-FU : 5-fluorouracile

G

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GDP : guanosine diphosphate

Glc : glucose

Gln : glutamine

Glu : glutamate

GMP : guanosine monophosphate

GOT1/2 : glutamate oxaloacétate transaminase

GSH : glutathion, forme réduite

GSSG : glutathion, forme oxydée

GTP : guanosine triphosphate

H

hCNT : human concentrative nucleoside transporter

hENT : human equilibrative nucleoside transporter

HIF1 : Hypoxia-inducible factor 1

HK : hexokinase

HSP90 : heat shock protein 90

I

IDH(3A) : isocitrate déshydrogénase (isoenzyme 3 sous unité A)

K

K_i : constante d'inhibition

K_m : constante de Michaelis-Menten

L

LDH(A) : lactate déshydrogénase (sous unité A)

M

MFN 1/2 : mitofusin 1/2

miR : micro ribonucleic acid

MTG : MitoTracker Green

MTX : MitoSox

N

NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite

NADP⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite

O

OPA1 : Optic atrophy 1

OxPhos : oxydation phosphorylante

P

PARP-1 : poly(ADP-ribose) polymérase 1

PDH : pyruvate déshydrogénase

PDHK : pyruvate déshydrogénase kinase

PDX : xénogreffe dérivée de patients

PEP : phosphoénolpyruvate

PFK(P) : phosphofructokinase (isoenzyme platelet)

2-PG : 2-phosphoglycérate

6-PG : 6-phosphogluconate

PGAM : phosphoglycérate mutase

PHDs : prolyl hydroxylases

PHGDH : phosphoglycérate déshydrogénase

PK(M) : pyruvate kinase (isoenzyme muscle)

PPP : voie des pentoses phosphates

PRPP : 5-phospho-D-ribosyl-1(α)-pyrophosphate

R

Rad51 : recombinaise 51

RedOx : oxydant réducteur

Rib5P : ribose-5-phosphate

Ribu5P : ribulose-5-phosphate

RNR : ribonucléotide réductase

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RRM2 : sous unité de la ribonucléotide réductase

S

SDH(A) : succinate déshydrogénase (sous unité A)

Sed7P : sedoheptulose-7-phosphate

shARN : short hairpin ribonucleic acid

siARN : silencing ribonucleic acid

SNP : single nucleotide polymorphism

SOD : superoxyde dismutase

T

TAM : macrophages associés à la tumeur

THU : 3,4,5,6-tétrahydrouridine

TK1 : thymidine kinase, cytoplasmique

TK2 : thymidine kinase, mitochondriale

TMRE : Tétramethylrhodamine, ethyl ester

TYMP : thymidine phosphorylase

U

U : uridine

UMP : uridine monophosphate

UMPK : UMP kinase

UMPS : UMP synthase

UPP1 : Uridine phosphorylase 1

UTR : région non traduite

V

VHL-E3 : Von Hippel–Lindau E3 Ubiquitine Ligase

W

WT : wild type

Table des matières

Résumé	1
Summary.....	2
I. Introduction bibliographique.....	3
1. Les cancers du pancréas	3
1.1. Le pancréas.....	3
1.2. Le cancer du pancréas	4
Epidémiologie	5
Symptômes	5
Facteurs de risques.....	6
1.3. Mutations retrouvées dans le cancer du pancréas	6
Les lésions prénéoplasiques	9
1.4. Diagnostic de la maladie.....	10
Imagerie et classification par grade.....	10
Classification moléculaire	11
Pistes en développement pour l'aide au diagnostic.....	12
1.5. Les traitements actuels	13
1.5.1. Protocoles de traitement	13
1.5.2. Les principales chimiothérapies	15
Le FOLFIRINOX.....	15
Le nab-paclitaxel.....	16
La gemcitabine.....	16
Mécanisme d'action et de résistance à la gemcitabine.....	16
2. La cytidine désaminase	20
2.1. Définition de la CDA	20
2.2. Structure de la CDA	20
Structure de la CDA	20
.....	22
Variants génétiques.....	22
2.3. Fonction de la CDA	23
Le recyclage des pyrimidines.....	23
La synthèse de novo des pyrimidines.....	23
Autres enzymes de recyclage de la famille des désaminases.....	24
2.4. Localisation de la CDA	25
2.5. Régulation de l'expression de la CDA.....	26

Niveau d'expression tissus-spécifique de la CDA	26
Mécanismes de régulation transcriptionnelle de la CDA	26
2.6. Régulation de l'activité de la CDA	27
Polymorphismes activateurs et réducteurs de l'activité de la CDA.....	28
Régulation post-traductionnelle.....	28
Régulation par le pool de nucléotides	28
2.7. Inhibiteurs pharmacologiques de la CDA	29
2.8. Importance fonctionnelle de la CDA dans les pathologies.....	31
Le syndrome de Bloom	32
Le rôle de la CDA dans la chimiorésistance	33
2.9. Stratégies thérapeutiques impliquant la CDA	34
3. Le métabolisme énergétique tumoral	38
3.1. La reprogrammation énergétique tumorale	38
3.1.1. L'effet Warburg	39
3.1.2. Organisation et structure du métabolisme mitochondrial	41
a. Les mitochondries	41
La biogénèse mitochondriale	43
La réplication de l'ADNmt.....	45
b. L'oxydation phosphorylante.....	46
c. Les modifications mitochondriales dans les cancers.....	48
Mutations des gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales	48
Mutations des gènes mitochondriaux.....	49
Les ROS	50
Le stress répliatif mitochondrial	51
Problèmes de dynamique mitochondriale	52
3.1.3. La glutaminolyse	56
.....	57
Le cycle de Krebs	57
La synthèse de glutathion.....	59
La synthèse de nucléotides.....	60
Autres utilisations du groupement amine γ de la glutamine	60
Autres fonctions de la glutamine.....	60
3.1.4. Activation des voies anaboliques.....	61
3.2. La régulation du métabolisme énergétique	64
3.2.1. Le rôle des oncogènes et des suppresseurs de tumeur dans la modulation du métabolisme énergétique	64
Oncogènes	64

Suppresseurs de tumeurs.....	65
L'activation de HIF	69
Les mutations d'enzymes métaboliques responsables de la reprogrammation énergétique	69
3.2.2. Le rôle de l'environnement tumoral	70
3.2.3. Les traitements ciblant le métabolisme énergétique	70
3.3. Particularités métaboliques du cancer du pancréas	73
4. Hypothèses initiales et objectifs de la thèse	76
II. Résultats.....	77
1. Contexte de l'étude	77
2. Résultats	78
3. Conclusion.....	130
III. Discussion	131
Annexe.....	181

Résumé

Le cancer du pancréas est un des cancers aux pronostics les plus sombres, avec une survie à 5 ans inférieure à 10%. Associé à une incidence en hausse dans les pays développés, et une progression silencieuse qui retarde le diagnostic, ce cancer risque de devenir l'un des plus meurtriers au monde dans les années à venir. Il est donc urgent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui régissent la carcinogénèse pancréatique afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients atteints de cette pathologie. C'est dans ce cadre que mon équipe s'est intéressée à la cytidine désaminase (CDA). En effet, la CDA est étudiée dans le cancer du pancréas depuis des dizaines d'années pour son rôle de chimiorésistance, cependant son importance fonctionnelle dans la carcinogénèse pancréatique n'avait encore jamais été explorée. Mon équipe a tout d'abord mis en évidence que la CDA est surexprimée dans les cancers du pancréas par rapport au tissu sain, et qu'elle est un marqueur de plus mauvais pronostic. De plus, son invalidation *in vitro* et *in vivo* dans des modèles expérimentaux de cancer du pancréas induit une diminution drastique de la prolifération cellulaire, prévient la croissance tumorale et mène à la mort des cellules par apoptose. Ces résultats préliminaires soulignent donc l'importance fonctionnelle de la CDA dans la carcinogénèse pancréatique. Ces résultats ont alors donné naissance à mes travaux de thèse, dont le but était d'étudier le rôle de la CDA dans le contrôle du métabolisme énergétique tumoral pancréatique. Des études protéomiques et transcriptomiques ont révélé une signature métabolique énergétique altérée dans les cellules cancéreuses pancréatiques consécutivement au ciblage de la CDA par rapport au témoin. Mes résultats de thèse montrent tout d'abord que l'invalidation de CDA induit une reprogrammation énergétique des cellules, déclenchée à court terme par un défaut du pool de mitochondries. En effet, les cellules invalidées en CDA présentent une diminution de leur masse mitochondriale, accompagnée par une diminution d'ADN mitochondrial (ADNmt). A long terme, ces cellules accumulent des dysfonctions mitochondriales, telles qu'une respiration et une production d'ATP mitochondrial nettement altérées, ainsi qu'une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Par contre, on note une surexpression ou une activation des enzymes clés de la glycolyse et une tendance à consommer davantage de glucose et de glutamine. Ces cellules présentent donc un effet Warburg exacerbé. En revanche, la surexpression de CDA dans ces cellules produit l'effet inverse sur la masse mitochondriale, et se traduit par une augmentation du pouvoir migratoire des cellules cancéreuses, et protège en partie les cellules traitées par des inhibiteurs de la fonction mitochondriale. Grâce à l'approche duale d'invalidation et de surexpression de CDA dans la même lignée cellulaire, mes résultats montrent pour la première fois un lien fort entre la CDA et la biogénèse mitochondriale et les répercussions phénotypiques de la modulation de CDA dans un modèle expérimental de cancer du pancréas. Ces effets semblent indépendants de la fonction connue de l'enzyme, puisque des formes catalytiquement inactives de la CDA reproduisent le phénotype énergétique identifié avec la forme sauvage de la protéine. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'importance de la CDA dans la modulation du pool mitochondrial, acteur incontournable de la production d'énergie et de la synthèse de macromolécules essentielles à la croissance et à l'homéostasie cellulaire et suggèrent une nouvelle fonction encore inexplorée de la CDA.

Summary

Pancreatic cancer is one of the cancers with the worst prognosis, with a 5-year survival rate of less than 10%. Combined with a rising incidence in developed countries and a silent progression that delays diagnosis, this cancer is likely to become one of the deadliest in the world in the following years. There is therefore an urgent need to better understand the molecular mechanisms that govern pancreatic carcinogenesis in order to improve the diagnosis and management of patients with this illness. It was in this context that my team became interested in cytidine deaminase (CDA). Indeed, CDA has been studied in pancreatic cancer for decades for its role in chemo-resistance, but its functional importance in pancreatic carcinogenesis had never been explored before. First of all, my team highlighted that CDA is overexpressed in pancreatic cancers compared to healthy tissue, and that it is a factor of worse prognosis. In addition, its depletion *in vitro* and *in vivo* in experimental models of pancreatic cancer induces a drastic drop in cell proliferation, prevents tumor growth and leads to cell death by apoptosis. Thus, these preliminary results highlight the functional importance of CDA in pancreatic carcinogenesis. These results gave rise to my thesis work, which aim was to study the role of CDA in the control of pancreatic tumor energy metabolism. Proteomic and transcriptomic studies revealed an altered energy metabolic signature in CDA-depleted pancreatic cancer cells against control cells. My thesis results first showed that the invalidation of CDA induces an energetic reprogramming of cells, triggered in the short term by a defect in the mitochondrial pool. Indeed, CDA-depleted cells show a decrease in their mitochondrial mass, accompanied by a decrease in mitochondrial DNA (mtDNA). In the long term, these cells accumulate mitochondrial dysfunctions, such as impaired respiration and mitochondrial ATP production and overproduction of reactive oxygen species (ROS). They also up-regulate their key glycolytic enzymes and tend to increase their glucose and glutamine uptake. Therefore, these cells have an exacerbated Warburg effect. On the other hand, the overexpression of CDA in these cells produces the opposite effect on the mitochondrial mass, results in an increase in the migratory potential of the cells and protects the cells, at least in part, against mitochondrial inhibitors. Using the dual approach of invalidation and overexpression of CDA in the same cell line, my results show for the first time a strong link between CDA and mitochondrial biogenesis and the phenotypic consequences of CDA modulation in an experimental pancreatic cancer model. These effects appear to be independent of the known function of the enzyme, since catalytically inactive mutants of CDA reproduce the energy phenotype identified with the wild form of the protein. These results open new perspectives on the importance of CDA in the modulation of the mitochondrial pool, an essential actor in the production of energy and the synthesis of macromolecules essential for cell growth and homeostasis, and suggest a new and yet unexplored function of CDA.

I. Introduction bibliographique

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle de la cytidine désaminase (CDA) dans le métabolisme énergétique du cancer du pancréas. A l'aide de deux approches complémentaires, l'inactivation et la surexpression de cette enzyme dans des lignées cancéreuses pancréatiques, j'ai mis en évidence les conséquences phénotypiques et fonctionnelles de la modulation de l'expression de la CDA sur le métabolisme énergétique tumoral pancréatique. Ces travaux ont ainsi démontré pour la première fois un lien fort entre cette enzyme et la biogénèse mitochondriale des tumeurs pancréatiques et ouvrent de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes d'oncogénèse pancréatique et la prise en charge des patients atteints de tumeurs parmi les plus agressives.

Dans cette introduction, je décrirai tout d'abord l'état actuel des connaissances autour de la prise en charge des cancers du pancréas puis je détaillerai les connaissances autour de la CDA, enfin je présenterai les bases du métabolisme énergétique tumoral pancréatique afin de replacer mes résultats de thèse dans leur contexte.

1. Les cancers du pancréas

1.1. Le pancréas

Le pancréas est un organe localisé entre l'estomac, le duodénum et l'intestin. C'est une glande lobulée mixte composée d'une partie endocrine et d'une partie exocrine distinctes ainsi que d'un canal pancréatique principal (Wirsung) et de canaux secondaires qui traversent tout l'organe. Le pancréas exocrine constitue 80-85% de l'organe et est composé de cellules acinaires qui sécrètent des enzymes nécessaires à la digestion telles que des peptidases, des lipases, des amylases et des ribonucléases. Ces enzymes sont déversées dans les canaux pancréatiques et transportées *via* le duodénum dans le tube gastro-intestinal, où elles sont activées par clivage protéolytique. Le pancréas endocrinien ne représente que 1 à 2% de l'organe et est composé de groupes de cellules éparpillés dans la glande, les îlots de Langerhans, qui contiennent quatre types de cellules majeures et deux types de cellules mineures. Les quatre principaux types sont α , β , δ et PP (voir figure 1). Les cellules des îlots sécrètent de l'insuline (cellules β), du glucagon (cellules α) et de la somatostatine (cellules δ), toutes les trois transportés *via* la circulation sanguine et impliqués dans la régulation de la glycémie¹. Les cellules PP sécrètent quant à elles le polypeptide pancréatique qui exerce plusieurs effets gastro-intestinaux, comme la stimulation de la sécrétion d'enzymes gastriques et intestinales. Ces cellules sont également présentes dans la partie exocrine du pancréas.

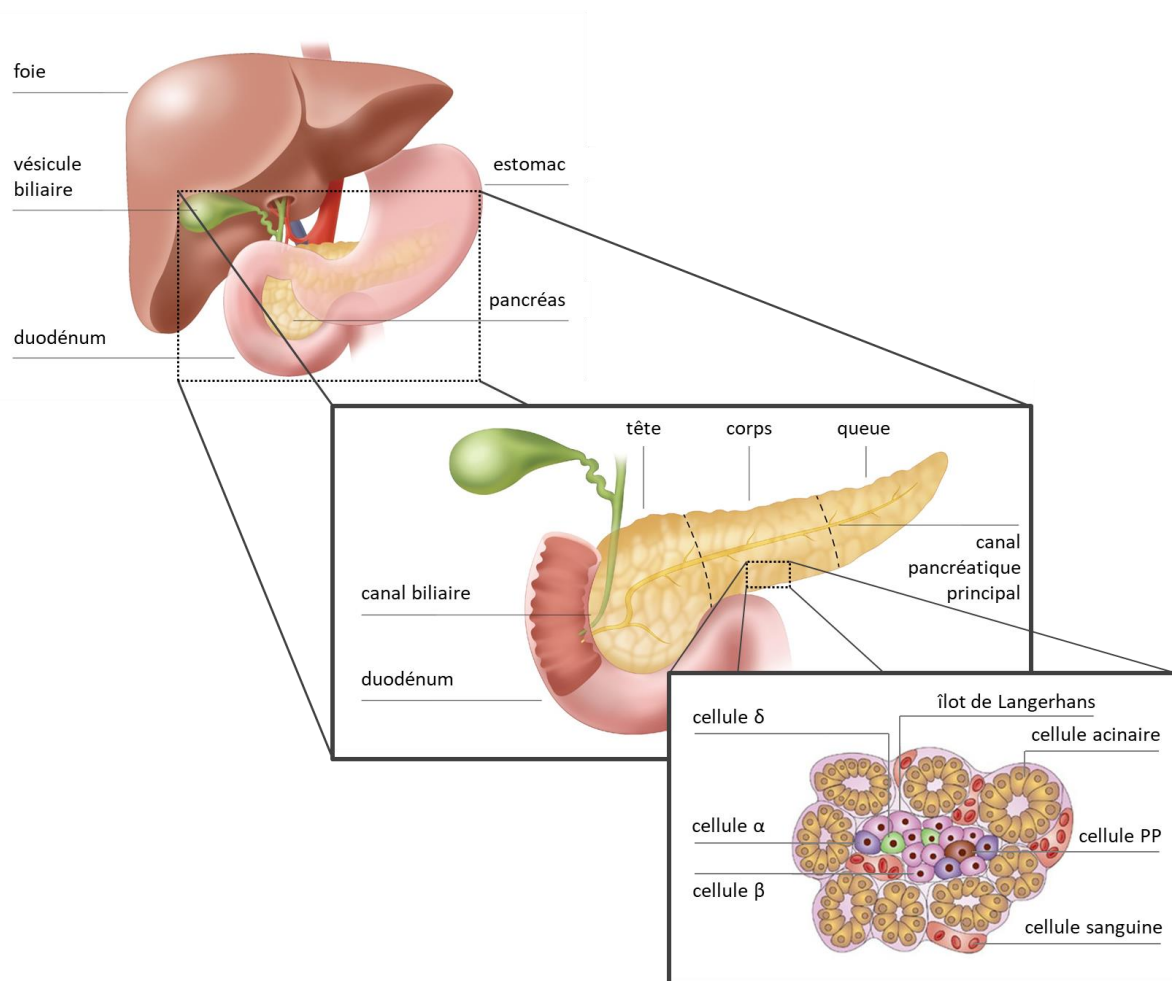


Figure 1 : Schéma représentatif de la localisation du pancréas, de la forme de la glande et de sa composition cellulaire. Adapté de : « *the Hirshberg Foundation for Pancreatic Cancer Research* » www.pancreatic.org et de N. Bardeesy & R. A. DePinho, 2003.

Le pancréas est une glande, localisée au niveau du système gastro-intestinal, qui a deux fonctions principales : la production d'hormones (insuline, glucagon, somatostatine) **régulant la glycémie**, et la production d'enzymes (peptidases, lipases, amylases et ribonucléases) **aidant à la digestion des aliments**.

1.2. Le cancer du pancréas

Les cancers du pancréas peuvent avoir pour origine les deux types de tissus qui composent le pancréas. On distingue donc les cancers pancréatiques endocriniens des cancers pancréatiques exocriniens. Le type pathologique le plus courant de cancer du pancréas est l'adénocarcinome (95 %) qui se développe dans les glandes exocrines du pancréas ; les types plus rares comprennent les cancers pancréatiques neuroendocriniens (PanNET) (3 %) qui se

produisent dans le tissu endocrine du pancréas, les lymphomes, les sarcomes et les carcinomes à cellules acinaires². Le cancer du pancréas est caractérisé par un phénotype très invasif à un stade précoce³. Il peut envahir directement la rate, les surrénales, le côlon transverse et l'estomac. Les métastases à distance ont lieu principalement dans le foie (62%) et les poumons (12%)⁴.

Environ 60% des cancers du pancréas surviennent dans la tête de la glande, 15% dans le corps et 5% dans la queue et dans 20 % des cas, la tumeur touche la glande entière¹.

L'adénocarcinome pancréatique est la forme la plus courante de cancer du pancréas. L'adénocarcinome pancréatique a un pronostic très mauvais. Typiquement après diagnostic, seulement 24% des personnes survivent 1 an, et 9% vivent pendant 5 ans⁵. Mes travaux de thèse portant exclusivement sur ce type de cancer, il sera par la suite nommé simplement cancer du pancréas.

Epidémiologie

En 2018, les cancers du pancréas sont la septième cause de décès par cancer dans les pays industrialisés (et la troisième cause de décès par cancer aux Etats-Unis) avec 458.918 nouveaux cas de cancer du pancréas diagnostiqués cette année (soit 2,5% de tous les cancers). L'incidence normalisée par l'âge est en Europe et aux Etats-Unis d'environ 7.7 pour 100.000 personnes, et la survie des patients à 5 ans est de 9%. Le cancer du pancréas est principalement une maladie des personnes âgées, 80% des cas se produisant chez les personnes de 60 à 80 ans et plus fréquemment chez les hommes que les femmes. Le taux de mortalité par cancer du pancréas est de 94% car il est difficile de diagnostiquer la maladie de façon précoce en raison de l'absence de symptômes spécifiques. De plus, l'éventail de solutions thérapeutique est faible, les chimiothérapies étant inefficaces et la chirurgie souvent impossible. En effet, 80 à 90% des patients ont des tumeurs non résécables en raison d'un diagnostic tardif. Or plus le stade est avancé au diagnostic, plus les chances de survie sont faibles. En effet, aux Etats-Unis, les personnes diagnostiquées à un stade résécable ont un taux de survie à 5 ans de 32%. Si le cancer est localement avancé, le taux de survie à 5 ans chute à 12%. Enfin, les personnes diagnostiquées à un stade métastatique (environ 1 personne sur 2) ont un taux de survie à 5 ans de seulement 3%⁵.

Symptômes

La plupart des patients atteints d'un cancer du pancréas éprouvent des douleurs abdominales (72 %), une perte de poids (58 %) ou un ictère (47 %). D'autres manifestations cliniques telles que des malaises, une perte d'appétit, une dyspepsie, des nausées et la thrombophlébite migratoire peuvent également survenir^{1,6}. Douleurs abdominales, jaunisse, prurit et urine foncée sont les symptômes d'une obstruction des voies biliaires.

Facteurs de risques

Le cancer du pancréas est associé à des facteurs de risques environnementaux tels que le tabagisme et une mauvaise alimentation ainsi qu'à des facteurs de risques héréditaires. L'influence environnementale la plus forte est le tabagisme, qui doublerait le risque de développer un cancer du pancréas⁵. Par exemple, en 2011, une étude a estimé qu'environ 26% des cancers du pancréas chez les hommes et 31% chez les femmes étaient liés au tabagisme au Royaume-Uni⁷. Une alimentation riche en graisses et en sucres⁸, l'alcoolisme⁵ et le diabète⁹ sont également impliqués. Des études estiment que l'alimentation est responsable de 30-50%¹⁰, tandis que le diabète est responsable de 9,7% des cas de cancers du pancréas^{8,11}. La pancréatite chronique qui peut résulter d'une mauvaise alimentation et qui est largement attribuable à l'alcoolisme (70%)⁵ et au cannabis¹² est à la fois une complication et un facteur de risque du cancer du pancréas. Des antécédents familiaux de cancers du pancréas (risque augmenté de 14 à 32 fois), de pancréatite chronique (risque augmenté de 50 à 80 fois), de syndromes de Peutz-Jeghers (risque augmenté 130 fois) et de cancers colorectaux (syndrome de Lynch) (risque augmenté de 8 à 10 fois) représentent des facteurs de risques héréditaires. Des mutations germinales du gène BRCA2 prédisposent également aux cancers du pancréas (risque augmenté de 4 à 10 fois). En particulier, ces mutations représentent 10% des cas de cancers du pancréas chez les Juifs ashkénazes¹. Les patients présentant ces mutations n'ont pas forcément d'antécédents familiaux de cancer du sein ou de l'ovaire puisque ces mutations sont faiblement pénétrantes. Les patients qui présentent ces mutations peuvent être traités par une thérapie ciblée à base d'Olaparib (mentionné dans le paragraphe « protocoles de traitement »). Des mutations germinales sur CDKN2A sont aussi associées à des cancers du pancréas et sont souvent détectées chez des patients issues de familles présentant une incidence accrue de mélanome (risque augmenté de 20 à 35 fois)^{1,13}.

L'**adénocarcinome** est la forme la plus courante de cancer du pancréas. Il se produit généralement chez les **personnes âgées** de 60 à 80 ans et seulement **9% des patients survivent 5 ans** après diagnostic. Plus de la moitié des patients présentent des **métastases** au moment du diagnostic et seulement 15% des patients sont éligibles à une résection chirurgicale. Le développement de ce cancer est silencieux et est associé à plusieurs facteurs de **risques environnementaux** (tabagisme, alimentation riche en graisses et en sucres, diabète et alcoolisme) et à des facteurs de **risques héréditaires** (antécédents familiaux de cancers du pancréas ou de pancréatites chroniques, syndrome de Peutz-Jeghers, cancers colorectaux, mutations de BRCA2 et de CDKN2A).

1.3. Mutations retrouvées dans le cancer du pancréas

De multiples gènes peuvent être mutés, amplifiés ou réduits au silence dans les cancers pancréatiques et certains d'entre eux sont très fréquemment retrouvés dans cette pathologie et différent de ceux observés dans d'autres cancers. L'analyse génomique de 456

adénocarcinomes pancréatiques a mis en évidence 32 mutations récurrentes¹⁴, parmi lesquelles KRAS, AKT2, C-MYC, p16, p53 et SMAD4 qui présentent chacune une prévalence supérieure à 20%.

L'oncogène *KRAS* est le plus fréquemment modifié dans le cancer du pancréas ; les mutations retrouvées sont généralement des mutations ponctuelles qui induisent une activation constitutive de la protéine. Environ 90-95% des cancers du pancréas présentent une mutation sur l'oncogène *KRAS*¹, principalement sur le codon 12 (G12D, G12V et G12R, par ordre de fréquence¹⁵). *RAS* est une famille de gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation de la prolifération, de la différenciation, de l'adhésion cellulaire et de l'apoptose. Plus de 100 gènes codent pour des protéines de type Ras, qui peuvent être divisées en huit familles principales et plusieurs sous-familles, appelées ensemble la superfamille Ras. Ces protéines sont de petites protéines G, associées à la membrane qui se lient aux nucléotides de guanosine (guanosine triphosphate GTP et guanosine diphosphate GDP). Ces protéines oscillent entre un état actif dans lequel elles sont liées à GTP et à un état de repos dans lequel elles sont liées à GDP sous l'influence de signaux délivrés par stimulation de récepteurs de surface cellulaire, tels que des récepteurs tyrosine kinase aux facteurs de croissance (voir figure 2). Les membres Ras sont en amont de voies différentes, telles que les voies MAPK et PI3K/AKT, affectant les fonctions mitogènes, telles que la synthèse d'ADN, l'organisation cytosquelettique et le métabolisme lipidique^{1,16}. La perturbation de ces signaux par mutation d'un gène *RAS* est impliquée dans de nombreux autres types de tumeurs. En effet, 15-20% des tumeurs tous organes confondus expriment des protéines Ras mutées, en particulier Hras (Harvey), Kras (Kirsten) et Nras qui coexistent dans les cellules humaines¹.

Les autres oncogènes les plus retrouvés dans le cancer du pancréas sont *AKT2* (10-20% des cancers pancréatiques) et *C-MYC* (20-30%)^{1,13}. *AKT2* code pour une protéine appartenant à la sous-famille AKT des sérine/thréonine kinases qui contiennent des domaines de type SH2 (Src homology 2-like). La protéine codée par *AKT2* est une protéine kinase capable de phosphoryler plusieurs autres protéines. En particulier, *AKT2* joue un rôle clé dans la propagation du signal en aval du récepteur à insuline et est capable d'activer la voie PI3K comme Kras¹³. Le gène *C-MYC* code pour un facteur de transcription qui régule 15% de tous les gènes humains. *C-myc* permet soit d'augmenter la transcription de gènes en se liant à des séquences Enhancer Box et en recrutant des enzymes capables d'acétyler les lysines des histones, soit de limiter la transcription des gènes cibles. Ses différentes fonctions dépendent des protéines avec lesquelles il forme un complexe¹⁷.

Divers gènes suppresseurs de tumeurs sont également désactivés au cours de la progression pancréatique tumorale. Le gène le plus fréquemment altéré est p16/CDKN2A (ou INK4A), dans 95% des cas. Ce gène code deux protéines suppressives de tumeurs. La première protéine, p16, est un inhibiteur des kinases du cycle cellulaire qui régulent la progression dans le cycle cellulaire. P16 perturbe la formation des complexes entre CDK4 (et CDK6) et les cyclines, ce qui bloque le cycle cellulaire en phase G1¹. La perte de fonction de p16 par mutation de sa séquence induit donc une progression incontrôlée de la cellule cancéreuse dans le cycle. P16 peut également être réduite au silence par méthylation de son promoteur¹⁸.

La deuxième protéine, ARF, forme un complexe avec MDM2, libérant ainsi p53 pour assurer ses nombreuses fonctions décrites ci-après¹⁹.

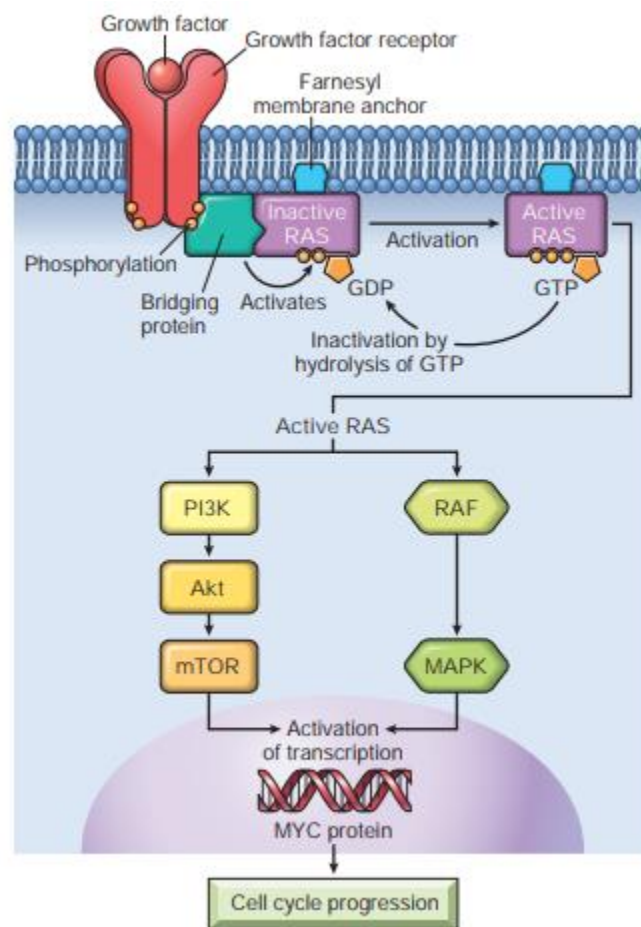


Figure 2 : Schéma du mécanisme d'activation de Ras et de la cascade de signalisation en aval. De : E. Mini et coll. 2006.

Les cancers du pancréas sont également fréquemment mutés dans le gène *TP53* (70-75%), le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers tous types confondus (50%)¹. P53 se place au milieu d'un vaste réseau de signaux ayant un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réponse aux dommages à l'ADN. P53 permet de détecter le stress cellulaire, principalement les lésions de l'ADN, mais aussi les télomères raccourcis, l'hypoxie et le stress réplicatif causé par des oncogènes tels que *RAS* et *MYC*. Dans les cellules saines non stressées, p53 est pratiquement indétectable car ubiquitylée par MDM2, menant à sa dégradation par le protéasome. Dans les cellules stressées, p53 est libérée de son interaction avec MDM2, et permet d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence ou encore l'apoptose. La capacité de p53 à réguler toutes ces processus cellulaires tient à sa fonction de facteur de transcription, activant la transcription de centaines de gènes cibles différents. Dans les cellules cancéreuses, la mutation de *TP53* sur les deux allèles induit une perte de fonction de p53, ce qui lève les freins associés à ses nombreuses fonctions et permet la croissance incontrôlée propre aux tumeurs¹.

SMAD4 est un suppresseur de tumeur inactivé dans environ 55% des cancers pancréatiques¹. Ce gène code pour une protéine qui appartient à la voie du TGFβ. Une fois complexé à d'autres protéines SMADs activées par phosphorylation *via* le récepteur au TGFβ, le complexe comprenant *SMAD4* est délocalisé dans le noyau où il régule la transcription de gènes spécifiques impliqués dans le contrôle et la régulation de la croissance cellulaire tels que *MYC* et *CDK4*²⁰.

Les lésions prénéoplasiques

Il est maintenant bien établi que les cancers du pancréas surviennent d'une progression en plusieurs étapes impliquant des lésions précurseur non invasives. Les lésions précurseurs les plus courantes sont les néoplasies intraépithéliales pancréatiques (PanINs), qui sont des lésions microscopiques survenant dans des canaux de moins de 5 mm de diamètre (environ 80% des cancers du pancréas présentent des PanINs). Il existe aussi les cystadénomes mucineux (MCNs) et les néoplasmes intracanaux mucineux et papillaires (IPMNs) qui sont des lésions macroscopiques (> 2cm et 1cm respectivement) précurseurs d'adénocarcinome pancréatique²¹. L'utilisation de modèles animaux a permis de montrer que les mutations caractéristiques des cancers du pancréas sont retrouvées de façon précoce dans les lésions prénéoplasiques, ce qui montre que le développement d'un cancer du pancréas est soumis à une évolution séquentielle²². En particulier, l'activation constitutive de *Kras* dans des pancréas murins aboutit au développement des lésions de type PanIN et peut résulter en leur évolution en cancer du pancréas. Chez l'homme, 35% des PanIN de grade 1 et 75% des panIN de grade 3 présentent une mutation sur *KRAS*. Ce qui confirme que l'altération de cet oncogène se fait à un stade très précoce et permet la progression tumorale²³. En outre, la mutation simultanée de l'oncogène *KRAS* et du suppresseur de tumeur *TP53* dans des modèles murins induit le développement de lésions de type PanIN et IPMN et le développement d'un cancer du pancréas à un stade avancé voire métastatique²⁴. Aussi T. Al Saati et ses collaborateurs ont montré que TP53INP1 (Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1) est perdue pendant la carcinogénèse pancréatique au stade PanIN de grade 2. De plus, son invalidation homozygote dans un modèle murin *KRAS*^{G12D} accélère la progression des lésions pré-néoplasiques, ce qui montre que TP53INP1 est une protéine clé de l'initiation de la carcinogénèse pancréatique. Les auteurs font également le lien entre cette protéine de réponse au stress et son rôle dans le contrôle du statut oxydant *in vivo* car le niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est augmenté chez les souris TP53INP1^{KO} et un traitement antioxydant permet de restaurer le phénotype basal²⁵.

Les principales mutations retrouvées dans le cancer du pancréas sont sur les **oncogènes KRAS** (90-95%), **AKT2** (10-20%), **C-MYC** (20-30%), et les **suppresseurs de tumeur p16/CDKN2A** (95%), **TP53** (70-75%) et **SMAD4** (55%). La carcinogénèse pancréatique suit une **évolution séquentielle** au cours de laquelle se développent des **lésions préneoplasiques** (PanINs, MCNs, IPMNs). Des modèles murins de ces lésions microscopiques ont montré que les suppresseurs de tumeurs et les oncogènes sont mutés très précocement dans les étapes de la carcinogénèse pancréatique.

1.4. Diagnostic de la maladie

Le taux sérique de l'antigène CA19-9 est souvent élevé chez les patients atteints d'un cancer du pancréas. Cependant, ce marqueur est surtout utile dans le suivi de la réponse d'un patient mais est relativement non spécifique (environ 70%) malgré une bonne sensibilité (92%) pour être utilisé comme test de dépistage. En effet, il est difficile de faire la distinction entre un cancer du pancréas et une pancréatite chronique ou d'autres états pathologiques avec inflammation, cancers colorectaux ou de l'estomac²⁶.

Imagerie et classification par grade

L'imagerie joue un rôle crucial dans le diagnostic, la stratification des patients et le suivi du cancer du pancréas. Le bilan diagnostique comprend l'échographie abdominale, la tomodensitométrie (TDM ou CT-scan), la tomographie par émission de positons (TEP), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la pancréatodénographie rétrograde endoscopique (CPRE), la cholangiopancréatographie par résonance magnétique (CPRM), l'échographie et la biopsie endoscopiques². Mais encore une fois, ces techniques utiles pour l'établissement du diagnostic une fois qu'il est suspecté ne sont pas adaptées comme tests de dépistage. Si une masse pancréatique est identifiée, une biopsie par aspiration à l'aiguille fine peut être indiquée afin de préciser le diagnostic par examen anatomopathologique⁶. L'établissement du diagnostic permet de classer le cancer selon le stade clinique de la tumeur en quatre grades⁵ :

- I (pas de propagation ou résécable), le cancer est limité au pancréas et a grandi de 2 cm (IA) ou entre 2 et 4 cm (IB)
- II (propagation locale ou résécable limite), le cancer est > 4 cm et est limité au pancréas ou s'est propagé localement aux ganglions lymphatiques voisins
- III (propagation plus large ou non résécable), le cancer peut s'être étendu aux vaisseaux sanguins ou aux nerfs voisins, mais n'a pas métastasé à des sites éloignés
- IV (métastatique), le cancer s'est étendu aux organes éloignés.

Jusqu'en 2003, les tumeurs pancréatiques étaient uniquement classées en trois groupes : « résécables », « localement avancées non résécables » et « métastatique ». La classification intermédiaire « résécable limite », qui fait référence aux tumeurs localement

avancées dans des structures voisines et qui ne sont ni clairement résécables ni clairement non résécables a permis d'améliorer la prise en charge des patients atteints de ce grade de maladie en permettant la chirurgie après traitement chimiothérapique néo adjuvant.

Classification moléculaire

R.A. Moffitt et ses collaborateurs ont identifié les signatures d'expressions spécifiques des gènes normaux, tumoraux et du stroma, et se sont appuyés sur les signatures d'expression génique précédemment identifiées pour classer les cancers du pancréas en deux sous-types moléculaires distincts (voir figure 3).

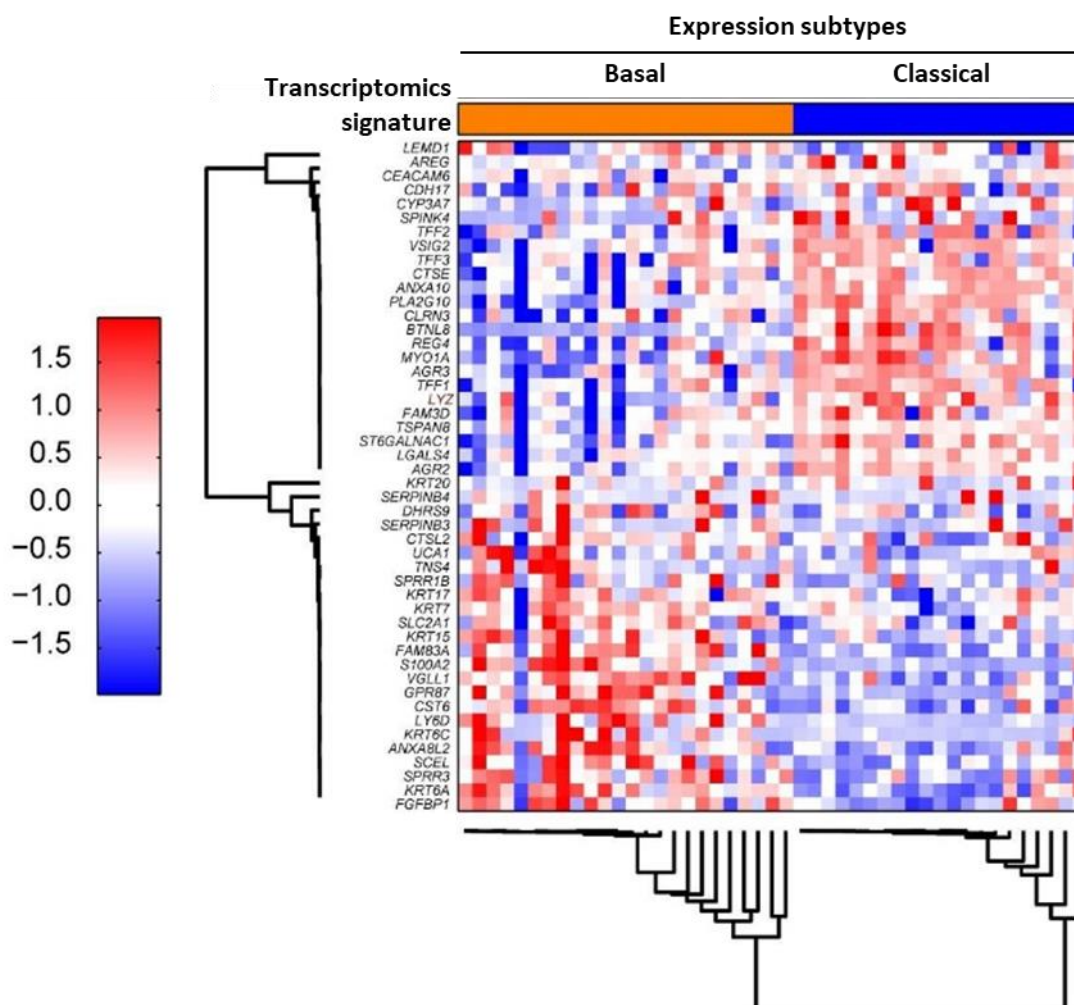


Figure 3 : Signature moléculaire des sous-types « basal » et « classic », représentée sous forme de *heat map*. Adapté de : R. A. Moffitt, 2015.

Les types « basal-like » et « classic » ainsi référencés sont corrélés à une différence significative de la survie des patients et de la réponse aux traitements. Les tumeurs de type « basal-like » ont un phénotype plus agressif et des PDX de ce type de tumeurs prennent plus vite en greffe chez la souris. Chez les patients cependant, bien que les tumeurs de type « basal-like » soient associées à un pronostic défavorable, les patients atteints de ce type de tumeurs

montrent une meilleure réponse à un traitement adjuvant²⁷. F. Puleo et ses collaborateurs ont ensuite validé les sous-types tumoraux pancréatiques « basal-like » et « classique » et y ont ajouté des modèles d'expression des gènes du microenvironnement, afin de classer les tumeurs en cinq nouveaux sous-types : les tumeurs « basales pures », les tumeurs « stroma activé », les tumeurs « desmoplastiques », les tumeurs « classiques pures » et les tumeurs « immunitaires classiques ». Ces sous-types tumoraux ont des caractéristiques de cellules cancéreuses et de cellules immunitaires et pourraient être traités par des thérapies différentes et permettre de prédire la survie des patients²⁸. Les groupes de N. Duseti et J. Iovana insistent effectivement sur le fait qu'il existe une grande hétérogénéité inter patients en terme de survie et de réponse aux traitements malgré une similitude des principaux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs mutés dans les cancers du pancréas. L'origine de cette hétérogénéité serait alors épigénétique²⁹. D'après leurs travaux, une signature d'expression génique est en effet la meilleure stratégie pour pouvoir prédire le devenir des patients atteints de cette pathologie et leur réponse aux différents traitements disponibles. L'analyse du transcriptome des patients atteints d'un cancer du pancréas permettrait donc de leur proposer un traitement personnalisé et adapté au sous-type moléculaire de leur tumeur^{30,31}.

Pistes en développement pour l'aide au diagnostic

La mutation ponctuelle de l'oncogène *KRAS* est un événement très fréquent au cours de la carcinogénèse pancréatique. En conséquences, l'identification d'une mutation caractéristique de cet oncogène dans les tissus tumoraux peut faciliter le diagnostic. Mon équipe d'accueil, entre autres, a démontré que l'analyse de mutations sur *KRAS*, effectuée sur des échantillons prélevés à l'aiguille fine semble fiable pour distinguer une néoplasie pancréatique maligne de lésions pancréatiques bénignes³²⁻³⁴. En effet, la combinaison de l'analyse du statut mutationnel de *KRAS* et des résultats anatomopathologiques augmente la sensibilité et la précision des diagnostics³⁵. La détection d'une mutation sur *KRAS* a également été effectuée sur de l'ADN de cellules tumorales en circulation ou sur de l'ADN libre circulant^{36,37} et sur des exosomes isolés³⁸ afin d'obtenir un marqueur biologique non invasif, fiable et reproductible pour dépister la présence d'un cancer du pancréas à un stade précoce. En l'absence de mutation spécifique de *KRAS*, une autre technique développée consiste à analyser la présence d'un ensemble de cinq méthylations spécifiques d'ADN tumoral circulant³⁹. Mon équipe est également pionnière dans la détection par micro fluidique d'ADN circulant, applicable par la suite à différentes séquences spécifiques ou des microARNs⁴⁰.

Plus de 50% des patients ont une tumeur métastatique au diagnostic, ce qui démontre le caractère bien trop tardif des stratégies diagnostiques mises en place. Pour la recherche de marqueurs précoces dans les cancers du pancréas, les équipes de recherche s'intéressent aux lésions pré-néoplasiques. N. Habbe et ses collaborateurs ont montré une surexpression des microARNs miR-155 et miR-21 dans les IPMNs. Ils proposent d'évaluer le niveau d'expression de ces microARNs comme biomarqueurs prédictifs précoces de cancers du pancréas⁴¹. En effet, les microARNs ont l'avantage de circuler et d'être stables dans les fluides biologiques et

donc d'être facilement exploitables pour établir un diagnostic. D'autres études, dont celle menée par mon équipe, ont confirmé la surexpression de nombreux microARNs dans les lésions pré néoplasiques par rapport au pancréas sain^{42,43}.

Le **CA19-9** est un antigène dont l'expression est élevée chez les patients atteints d'un cancer du pancréas et est mesuré pour effectuer **le suivi de la réponse** du patient à une thérapie. **L'imagerie est un outil précieux** pour effectuer le **diagnostic** de la maladie chez un patient, mais également pour déterminer le **caractère résécable** ou non de la tumeur. Une biopsie à l'aiguille fine, suivi d'un examen anatomopathologique, est également recommandée afin de préciser le **stade clinique** : I (résécable), II (résécable limite), III (localement avancé) et IV (métastatique). Ces dernières décennies, une **classification moléculaire basée sur le transcriptome** des patients s'est aussi développée dans un but **pronostic**, le sous type « basal » regroupant les tumeurs les plus agressives. L'étude de **marqueurs précoces** retrouvés dans les lésions prénéoplasiques (tels que KRAS muté, ou des microARNs) représente un domaine prometteur pour **améliorer le dépistage** et le nombre de patients éligibles à la chirurgie curative.

1.5. Les traitements actuels

La résection chirurgicale de la tumeur suivie d'un traitement adjuvant au FOLFIRINOX est aujourd'hui la méthode qui donne les meilleures espérances de survie⁴⁴. Cependant, seulement 20% des patients ont une tumeur résécable. Pour les 80% restant, les principaux objectifs de traitements sont les soins palliatifs et l'amélioration de la survie. Chez certains patients en bon état général, une petite amélioration de la survie peut être observée.

1.5.1. Protocoles de traitement

Parmi les protocoles de traitements les plus souvent appliqués, on trouve les protocoles suivants^{45,46} (voir figure 4) :

- Pour les patients avec une tumeur résécable : une chimiothérapie adjuvante est préconisée pendant 6mois après résection chirurgicale pour limiter les risques de rechute. En particulier, la meilleure survie sans progression (21,6 mois) est obtenue grâce à la combinaison d'acide folinique, 5-fluorouracile, irinotécan et oxaliplatine (mFOLFIRINOX) révélée par l'étude clinique de phase III PRODIGE24.
- Pour les patients avec une tumeur résécable limite : une thérapie néo-adjuvante (afin de réduire la taille de la tumeur préalablement à l'intervention chirurgicale) à base de chimiothérapie (gemcitabine/nab-paclitaxel, gemcitabine/cisplatine ou FOLFIRINOX) ou de radiothérapie est envisagée.
- Pour les patients avec une tumeur localement avancée non métastatique : une chimiothérapie systémique suivie d'une radiothérapie de consolidation est envisagée

(voire une chimio radiation). Des monothérapies à base de gemcitabine (Gemzar), de Capécitabine ou de 5-FU sont appliquées aux patients en mauvais état général (score ECOG PS >2). Les patients en bon état général peuvent bénéficier d'une monothérapie à base de FOLFIRINOX, ou des combinaisons à base de gemcitabine avec nab-paclitaxel, capecitabine, cisplatine...

- Pour les patients atteints d'un cancer du pancréas métastatique : Une thérapie de première ligne à la gemcitabine est souvent appliquée car elle soulage les symptômes et provoque très peu d'effets secondaires. Le FOLFIRINOX a montré une amélioration significative de la survie (11,1mois contre 6,8mois) mais est accompagné de nombreux effets secondaires. Pour les patients qui répondent le mieux, un traitement de deuxième ligne comprend des combinaisons de gemcitabine et d'autres agents comme le fluorouracil, le cisplatine, ou l'oxaliplatine.

De 2014 à 2018, le taux de survie à 5 ans pour le cancer du pancréas est passé de 6% à 9%, ce qui montre que des progrès sont réalisés mais qu'il y a un besoin urgent d'améliorer encore davantage la survie des patients⁵.

La survie des patients atteints d'un cancer du pancréas demeure très faible depuis plusieurs décennies et reste l'un des seuls pour laquelle la survie à 5ans ne dépasse pas 10%. Malgré des travaux *in vivo* prometteurs, l'une des raisons du manque de solutions thérapeutiques est que le principal oncogène retrouvé muté dans ce cancer est difficilement ciblable car impliqué dans de nombreuses voies métaboliques des cellules saines. Ainsi, malgré de nombreux efforts pour développer des thérapies ciblées, aucune n'a à ce jour montré d'efficacité permettant d'allonger la survie globale des patients de façon significative par rapport aux chimiothérapies classiques⁴⁷. Cependant, les patients présentant une mutation sur BRCA1/2 traités à l'olaparib, un inhibiteur de PARP (poly (ADP-ribose) polymérase), ont tout de même vu leur survie sans progression rallongée de 3,8 à 7,4 mois dans un essai clinique récent de phase III⁴⁸. Par contre, les nombreux essais cliniques impliquant des inhibiteurs de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ou du VEGF (Vascular endothelial growth factor) n'ont pas donné d'issue satisfaisante. De même, malgré le succès de l'immunothérapie dans certaines tumeurs solides avancées, ce n'est pas le cas pour le cancer du pancréas. Ceci peut s'expliquer du fait que les tumeurs pancréatiques sont peu antigéniques et, par conséquent, non immunogènes⁴⁹.

Le seul **traitement potentiellement curatif** pour le cancer du pancréas est la **résection chirurgicale**. Les patients pouvant bénéficier de la chirurgie reçoivent ensuite une chimiothérapie adjuvante pour réduire les risques de rechutes. Les patients **non résécables** reçoivent des **traitements palliatifs à base de chimiothérapies** (Gemcitabine, FOLFIRINOX, 5-FU, etc...) **et/ou de radiothérapie**, selon leur état général, et participent à des essais cliniques.

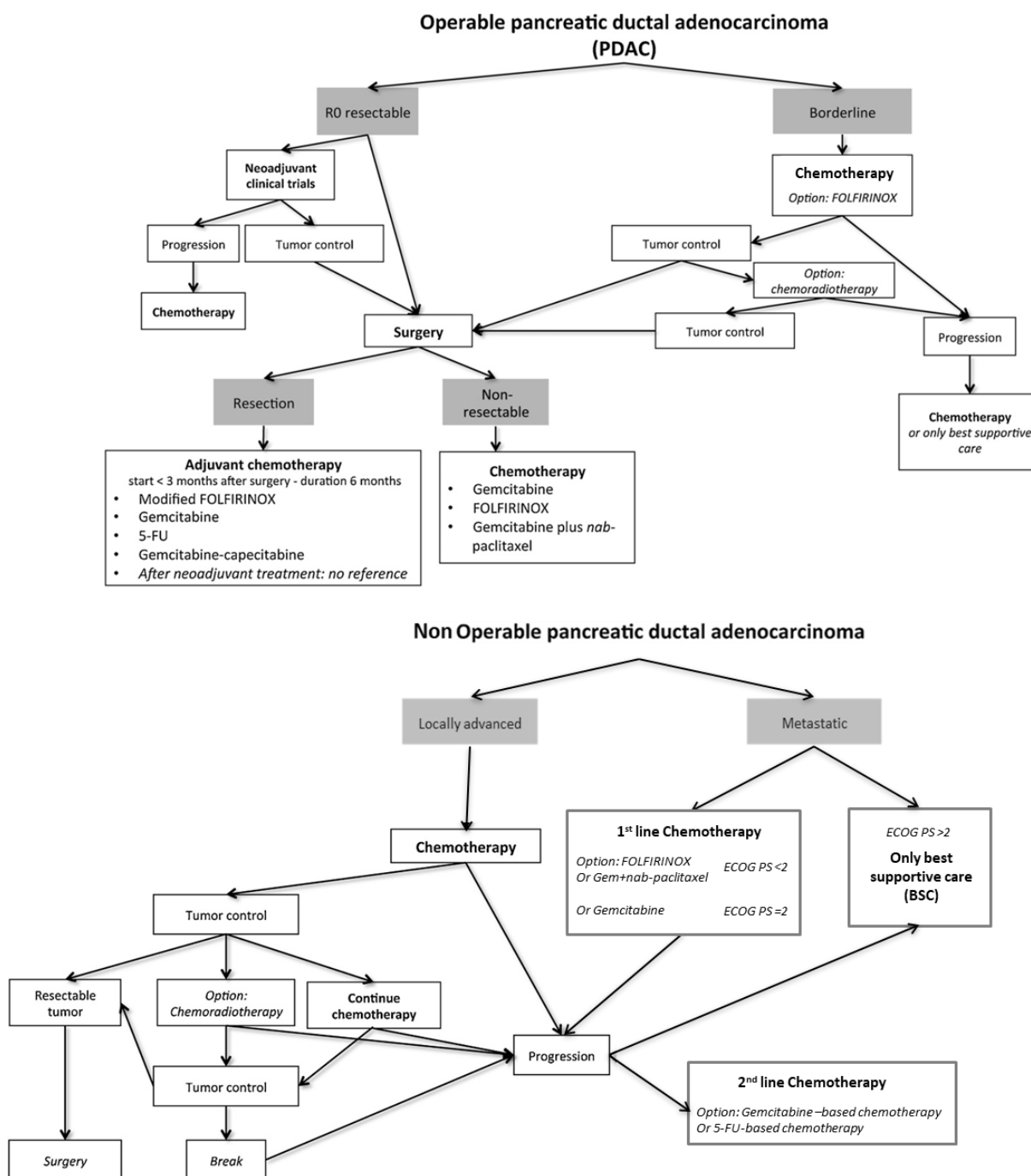


Figure 4 : Schéma décisionnel thérapeutique selon le stade clinique. Adapté de : C. Neuzillet, 2018.

1.5.2. Les principales chimiothérapies

Le FOLFIRINOX

Le FOLFIRINOX est un traitement associant le 5-fluorouracile (5-FU, un anti métabolite analogue de thymidine qui inhibe la thymidylate synthase), l'acide folinique (qui potentialise l'effet du 5-FU), l'oxaliplatine (un sel de platine qui forme des ponts intra et inter-brins d'ADN,

entraînant une interruption de la synthèse), et l'irinotécan (un inhibiteur de l'ADN topoisomérase I). Une amélioration significative de la survie globale médiane des patients atteints d'un cancer du pancréas métastatique est observée grâce au FOLFIRINOX comparativement à un traitement par gemcitabine (11,1 mois contre 6,8 mois pour la gemcitabine) et avec un meilleur taux de réponse, malgré des effets secondaires modérés à graves plus fréquents⁵⁰.

Le nab-paclitaxel

Le nab-paclitaxel (Abraxane) est un médicament composé de paclitaxel associé à une nanoparticule liée à l'albumine (nab). Le paclitaxel est une molécule de la famille des taxanes qui inhibe la fonction des microtubules qui se lient aux kinétochores lors de la métaphase⁵¹. Le nab-paclitaxel a été initialement développé pour faciliter sa dissolution et éviter ainsi les réactions d'hypersensibilité résultant des solvants utilisés auparavant pour le dissoudre. Il a été approuvé par la FDA en 2004 pour son utilisation dans le cancer du sein métastatique et le cancer du poumon métastatique non à petites cellules⁵². La combinaison de nab-paclitaxel à la gemcitabine a démontré une amélioration de la survie globale médiane des patients atteint d'un cancer du pancréas (8,5 mois contre 6,7 mois pour la gemcitabine seule), avec un meilleur taux de réponse. Cependant, ce traitement est réservé aux patients en bon état général car associé à une plus grande toxicité que la gemcitabine seule⁵³.

La gemcitabine

La gemcitabine a d'abord fait l'objet d'études cliniques en Europe et aux Etats-Unis à la fin des années 1980. Elle a été approuvée par l'EMA (The European Medicines Agency) en 1995 pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules en association avec le cisplatine et par la FDA (Food and Drug Administration) en 1996. Elle a ensuite été étudiée pour le traitement des patients atteints de cancer du pancréas en 1999⁵⁴. Depuis, la gemcitabine est considérée comme le traitement standard de référence pour le cancer du pancréas. Bien que plusieurs chimiothérapies différentes aient été évaluées en association avec la gemcitabine ou seuls, peu d'entre eux ont démontré un impact positif sur la survie chez les patients atteints de maladie métastatique.

Mécanisme d'action et de résistance à la gemcitabine

La gemcitabine, ou 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine est un analogue nucléosidique de désoxycytidine, dont deux atomes d'hydrogène du cycle pyrimidique ont été remplacés par des atomes de fluor. La gemcitabine est un composé synthétique modifié chimiquement qui a été mis au point pour imiter son homologue physiologique. Elle est transportée, métabolisée et intégrée dans l'ADN comme la désoxycytidine, à ceci près qu'elle bloque les fourches de réplication et conduit à la rupture d'un seul brin⁵⁵. Elle agit par terminaison masquée, c'est-à-dire qu'elle permet l'incorporation d'un seul dernier nucléotide après elle, bloquant ainsi la

réplication et évitant d'être repérée par les systèmes endogènes de repérage et de corrections d'erreurs⁵⁶. Les cellules incapables de se répliquer finissent donc par induire un signal de mort cellulaire par apoptose⁵⁷. L'activation de Chk1 (checkpoint 1) semble avoir une implication essentielle dans l'induction de l'apoptose initiée par l'arrêt du cycle⁵⁸. L'activité cytotoxique de la gemcitabine est le résultat d'actions complémentaires sur la synthèse de l'ADN : dFdCTP est en concurrence avec dCTP pour leur utilisation par l'ADN polymérase et l'incorporation de dFdCTP dans l'ADN provoque l'arrêt de la réplication et des dommages à l'ADN irréparables. De plus, dFdCDP a la capacité d'inhiber la ribonucléotide réductase (RNR), ce qui entraîne une déplétion de dCTP et potentialise l'efficacité de la gemcitabine (voir figure 5)⁵⁹. Enfin, l'incorporation de gemcitabine améliore la stabilité des complexes de clivage de la topoisomérase I. Ceci peut générer des cassures d'ADN par collision avec les fourches de réplication ou de transcription⁶⁰.

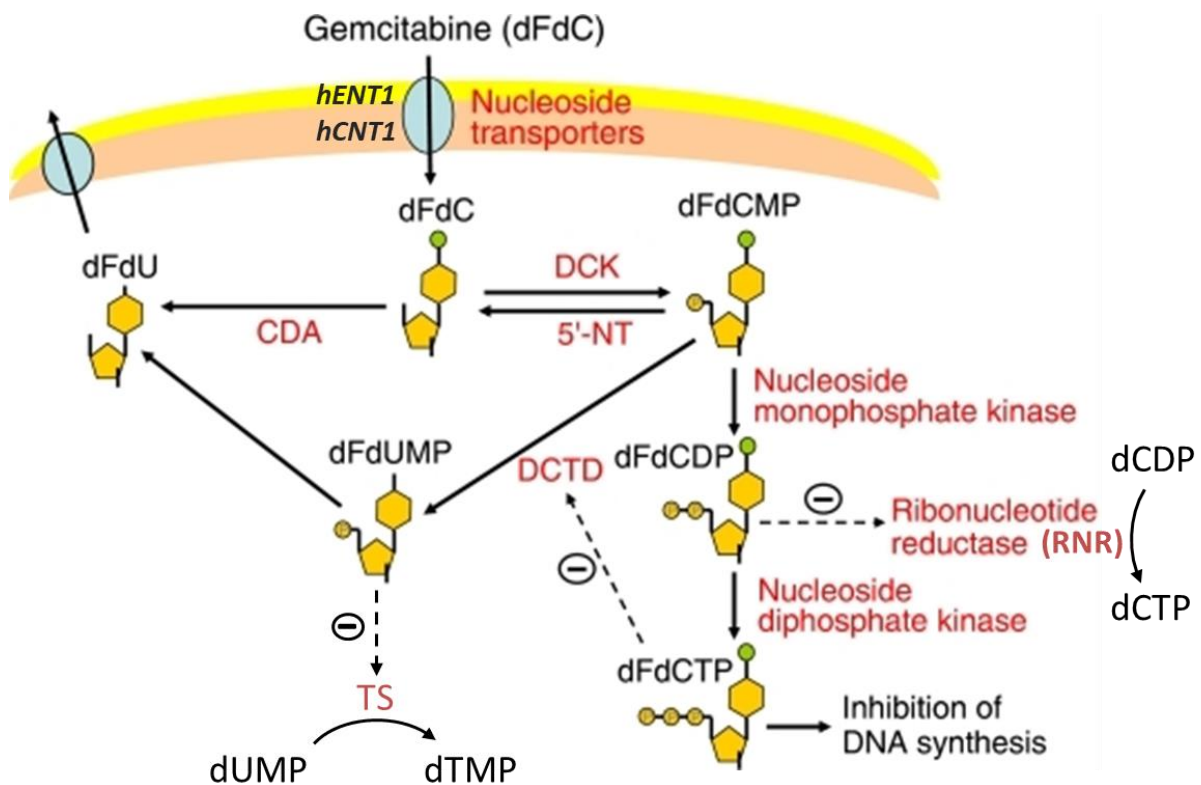


Figure 5 : Schéma de la cascade d'activation et d'inhibition de la gemcitabine. Adapté de : H. Ueno et coll. 2007.

Tout comme la désoxycytidine, la gemcitabine est une molécule hydrophile qui nécessite des transporteurs nucléosidiques spécialisés pour pénétrer dans la cellule et son activation implique des étapes métaboliques intracellulaires qui permettent la formation des résidus nucléotidiques qui seront intégrés dans l'ADN^{55,61}. Ainsi, un seul facteur de résistance à l'une des nombreuses étapes nécessaires à l'action de la gemcitabine suffit à induire une chimiorésistance.

Tout d'abord, un défaut d'un des transporteurs à nucléosides peut induire une chimiorésistance. En effet, le transport de la gemcitabine à travers la membrane cellulaire peut se faire par l'intermédiaire de multiples transporteurs actifs situés dans la membrane plasmique cellulaire : hCNT1, hCNT2 et hCNT3 (transporteurs de type concentratif, dépendant au sodium), hENT1 et hENT2 (transporteurs de type équilibré, indépendant au sodium)⁵⁵. Y.-D. Bhutia et ses collaborateurs ont montré que les tumeurs pancréatiques ont une expression réduite de hCNT1, et dépendante du cycle cellulaire⁶². Ils ont montré *in vitro* dans des lignées cancéreuses pancréatiques que la réexpression de ce transporteur permet d'augmenter l'efficacité toxique de la gemcitabine. Dans d'autres cancers aussi, la sensibilité à la gemcitabine a été corrélée *in vitro* à l'expression du transporteur nucléosidique hENT1^{63,64}. Une étude clinique sur des patients atteints d'un cancer du pancréas a également montré que les patients traités par gemcitabine avec des taux d'expression élevés de hENT1 ont une survie globale significativement plus longue (25,2 mois), que les patients présentant un faible taux de hENT1 (17,1 mois)⁶⁵.

Ensuite, une mutation ou une sous-régulation des enzymes responsables de la phosphorylation des nucléosides peut également induire une chimiorésistance. La gemcitabine est phosphorylée dans le cytoplasme par la désoxycytidine kinase dCK pour produire dFdCMP, puis ensuite converti en ses actifs diphosphate et triphosphate (dFdCDP et dFdCTP)⁵⁵. Des études cinétiques ont montré que dCK a un Km de 4,6 μ M pour la gemcitabine (contre 1,5 μ M pour la désoxycytidine), ce qui en fait un bon substrat⁶⁶. De plus, la désoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP) naturellement produite a la capacité de rétro-inhiber dCK, et en particulier d'inhiber la phosphorylation de gemcitabine. Cependant dCK étant l'étape limitante de l'activation de la gemcitabine^{61,67}, une dérégulation de cette enzyme a donc des répercussions sur l'activation de la chimiothérapie. En effet, des études *in vivo* sur tumeurs murines et xénogreffes de tumeurs humaines ont montré une corrélation claire entre le taux de dCK et la sensibilité à la gemcitabine⁶⁸. Dans le but de contourner le caractère limitant de la métabolisation de la gemcitabine par dCK, mon équipe a d'ailleurs mis au point un essai clinique de phase I (actuellement en phase II) basé sur la thérapie génique. Le projet TherGAP⁶⁹ a porté sur des patients atteints d'un cancer du pancréas avancé qui n'étaient pas admissibles à la chirurgie. Le protocole comportait deux injections intra tumorales, espacées d'un mois, du produit de thérapie génique comprenant le gène de fusion dCK::UMK combiné à une perfusion de gemcitabine. Cet essai a montré que le traitement était bien supporté par les patients, qu'il chimio sensibilisait bien les patients à la chimiothérapie et un bénéfice clinique a même été rapporté en phase I.

Dans les mitochondries, la gemcitabine peut également être phosphorylée par la thymidine kinase 2 (TK2), mais le Km cette enzyme pour la gemcitabine est toutefois de 66 μ M contre 7 μ M pour la désoxycytidine⁷⁰.

De plus, il a été montré que la sous unité M1 de la ribonucléotide réductase (RRM1) est un facteur de résistance à la gemcitabine^{71,72}, puisqu'elle permet d'une part de gêner l'incorporation de la gemcitabine dans l'ADN par compétition en régénérant le pool de dNTP⁷³, et d'autre part en interagissant directement avec la forme diphosphate de la gemcitabine et en la bloquant dans son site catalytique^{74,75}. Il a été rapporté *in vivo* que la surexpression de

RRM1 est associée à une résistance acquise à la gemcitabine dans un modèle de carcinome tumoral du colon⁷⁶.

Enfin une augmentation de l'activité de CDA ou de son expression représente un système de résistance non négligeable (voir partie « importance fonctionnelle de la CDA dans les pathologies »).

Shukla et ses collaborateurs montrent aussi que la résistance à la gemcitabine dans les cellules cancéreuses pancréatiques est due à HIF-1 α , à cause de son rôle comme facteur de transcription conduisant à l'augmentation du flux glycolytique et de la biosynthèse *de novo* de pyrimidines. Ils montrent que le ciblage de HIF1 α augmente l'efficacité de la gemcitabine⁷⁷.

Lors de la carcinogénèse pancréatique, un fort microenvironnement se met en place autour de la tumeur et participe à son développement et il est montré que ce microenvironnement tumoral abondant a un rôle important dans la résistance aux traitements⁷⁸. Ainsi, de nombreuses équipes de recherche se focalisent sur l'étude de ce réseau complexe, bien différent de la tumeur principale, et pourtant d'importance fondamentale. N. Weizman et ses collaborateurs ont montré que la résistance des tumeurs pancréatiques était en partie due aux macrophages associés à la tumeur (TAM) en surexprimant la CDA en réponse à un traitement par gemcitabine. La CDA étant excrétée dans l'environnement tumoral, la gemcitabine peut être inactivée avant même d'avoir pénétré le cytoplasme des cellules tumorales⁷⁹.

En résumé, la chimiorésistance des cancers du pancréas à la gemcitabine peut avoir de nombreuses causes. Entre tous, la CDA joue un rôle particulier dans la chimiorésistance et son implication dans la prise en charge des patients atteints d'un cancer du pancréas est irréfutable. La partie suivante a pour but de caractériser de façon approfondie la CDA et de faire un point sur les connaissances actuelles et les stratégies étudiées en relation avec cette enzyme.

La **chimiothérapie de référence** pour le traitement d'un cancer du pancréas est la **gemcitabine** (ou 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine). C'est un **analogue de la désoxycytidine** qui est transporté dans les cellules grâce notamment à hENT1 (un transporteur de nucléosides) et est métabolisé par les kinases pour être intégré dans l'ADN. La gemcitabine **agit par terminaison masquée** : s'intègre dans l'ADN en réplication, bloque les fourches, empêche les systèmes de réparation et **provoque la mort cellulaire**. De nombreux facteurs participent à la chimiorésistance des tumeurs à la gemcitabine. Notamment, la **cytidine désaminase (CDA) détoxifie la gemcitabine** en la transformant en un analogue de l'uridine, non intégré dans l'ADN.

2. La cytidine désaminase

La cytidine désaminase (CDA) est une enzyme ubiquitaire dont le rôle majeur connu à ce jour participe au recyclage des pyrimidines libres. La voie de recyclage des pyrimidines semble avoir deux rôles différents : l'un étant le recyclage de pyrimidines pour la synthèse d'autres nucléotides qui seront intégrés à l'ADN et à l'ARN, l'autre étant la dégradation des pyrimidines pour assurer une source de carbone et d'azote constante. La CDA participe par sa fonction aux deux rôles cités ci-dessus.

2.1. Définition de la CDA

La cytidine désaminase (CDA ; EC 3.5.4.5), ou parfois appelée cytidine aminohydrolase, CD ou CDD est l'enzyme responsable de la transformation de la cytidine (et de la désoxycytidine) en uridine (et désoxyuridine, respectivement).

Les séquences du gène et de la protéine CDA sont bien conservées entre les espèces. On trouve des gènes CDA orthologues chez de nombreuses espèces avec un pourcentage élevé d'homologie de séquence avec la CDA humaine. Par exemple, la séquence protéique de la CDA murine est identique à 83,79% à celle de la protéine humaine. On trouve également des similitudes de séquence de 99,77% entre la CDA chez le chimpanzé et la CDA humaine, 76,85% chez le poisson zèbre, 51,88 % chez *Saccharomyces Cerevisiae* et 39% chez *Escherichia Coli*^{80,81}.

2.2. Structure de la CDA

Structure de la CDA

La CDA appartient à la famille des cytidines et des désoxycytidylate désaminases dépendantes d'une liaison à un ion zinc⁸⁰. La CDA est composée d'un domaine désaminase de type CMP/dCMP qui consiste en une feuille centrale β avec une ou plusieurs hélices α de chaque côté⁸². Cette caractéristique est partagée avec toutes les protéines de la famille APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like). Mais contrairement à son homologue AI-CDA (cytidine désaminase induite par activation, largement décrite par R. Kumar et ses collaborateurs⁸³), la CDA n'appartient pas à la famille APOBEC et ne peut donc transformer que des pyrimidines libres.

Le gène CDA est situé sur le chromosome 1 (1p36.12)⁸⁴, mesure 29,961 pb et se compose de 4 exons⁸⁵. Le gène de la CDA code pour une protéine de 146 acides aminés (15kDa) qui s'associe à un ion zinc (Zn^{2+})⁸⁶ et s'organise en homotétramère de 52kDa⁸⁷ afin d'assurer sa fonction enzymatique⁸⁸. Le point isoélectrique de l'enzyme est de 4,5, et la zone de pH dans laquelle elle est active se situe entre 3,5 et 10,5⁸⁷. La cristallisation de la CDA ayant révélé un axe de symétrie d'ordre 2, il est admis que l'enzyme soit en fait un dimère de dimères⁸⁹ (voir figure 6).

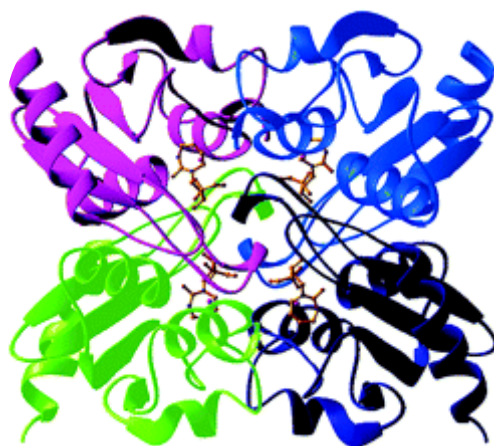


Figure 6 : Représentation de la structure cristallisée de la CDA avec un inhibiteur. Chaque monomère est représenté d'une couleur différente. De : S. J. Chung et coll. 2005.

S. Vincenzetti et ses collaborateurs ont élucidé les rôles de différents acides aminés de la protéine par mutagenèse dirigée. Ainsi, chaque monomère se lie à un atome de zinc par coordination avec les cystéines C99 et C102 tandis que C65 permet la bonne orientation du zinc⁹⁰ (voir figure 7b). E67 a un rôle central dans l'initiation de la catalyse puisque c'est le groupement carboxylique du glutamate qui permet la déprotonation/protonation de la molécule d'eau et du groupement amine du substrat respectivement, ce qui amorce l'attaque nucléophile de l'hydroxyde sur le C4 du cycle pyrimidique⁹¹. L'intermédiaire réactionnel est une interaction tétraédrique entre le cycle pyrimidique du substrat, le groupement hydroxyle formé par la molécule d'eau, le groupement carboxylate du glutamate et l'ion zinc⁹² (voir figure 7a). Chaque poche catalytique est formée par l'interaction de trois monomères, ce qui explique le fait qu'elle ait besoin d'être tétramérique pour être active⁸⁹. Entre autres, F137, Y33 et R68 sont importants pour l'interaction avec le substrat puisqu'ils participent à la formation de la poche catalytique et Y60 dans la reconnaissance du substrat^{93,94}.

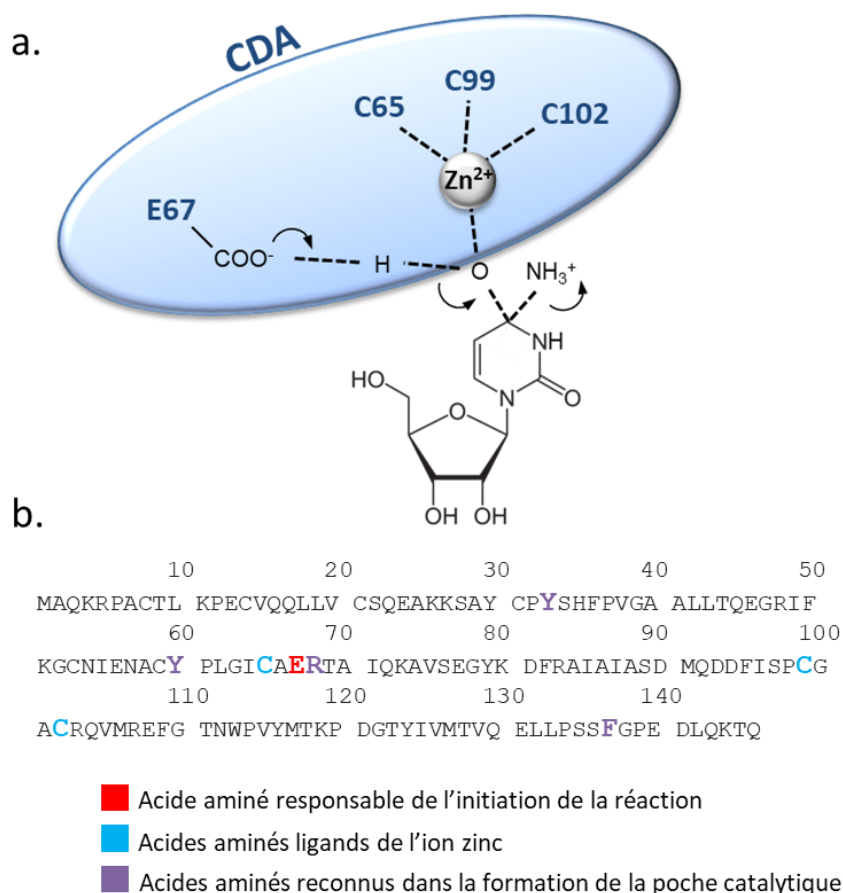


Figure 7 : a. Intermédiaire réactionnel de la transformation de la cytidine par la CDA. b. Séquence aminée d'un monomère de la protéine CDA, avec distinction en couleur des acides aminés principaux dont le rôle a été élucidé.

Variants génétiques

Les travaux de K. Kühn⁹⁵, de J. Laliberté, L. Momparler et leurs collaborateurs⁹⁶, complétés par les nombreux travaux de S. Vincenzetti et ses collaborateurs⁹⁷ ont mis en évidence l'existence de deux variants majoritaires d'ARN messager de la CDA qui diffèrent par le codon 27 et qui donnent alternativement une Glutamine ou une Lysine. Ces deux protéines appelés respectivement CDA1 et CDA2 sont capables de former les différentes combinaisons de tétramères, soit 5 isoformes enzymatiques qui ont sensiblement les mêmes propriétés physico-chimiques et enzymatiques car l'acide aminé n'est pas situé dans le site actif de l'enzyme.⁹⁷ La seule différence, d'après ces auteurs, résiderait dans la charge nette de chaque monomère, leur conférant une capacité différente de migration sous électrophorèse, CDA1 étant visualisé légèrement plus bas que CDA2 sur gel de polyacrylamide (PAGE)⁹⁷. Ces travaux ont néanmoins été complétés par de nombreux essais cliniques visant à démontrer une éventuelle corrélation entre ces deux variants et une activité plus ou moins forte de l'enzyme (voir partie « Régulation de l'activité de la CDA »). Ces polymorphismes sont retrouvés dans la population avec des fréquences plus ou moins importantes selon l'ethnicité. Le variant CDA2

est celui majoritairement retrouvé dans la population caucasienne⁹⁸ (80%). L'équipe de S. Koizumi a également mis en évidence un autre variant sur le codon 70 qui consiste en une thréonine à la place d'une alanine, mais retrouvé dans uniquement dans 4,3% de la population japonaise étudiée⁹⁹. D'autres études montrent que ce variant semble concerner exclusivement les populations africaines et asiatiques¹⁰⁰.

2.3. Fonction de la CDA

Le recyclage des pyrimidines

La CDA a une fonction de désaminase qui lui permet de catalyser la transformation des cytidines et désoxycytidines en uridines et désoxyuridines respectivement¹⁰¹ en réalisant l'hydrolyse du groupement amine en cétone avec libération d'ammoniac⁸⁹. La désamination de la cytidine en uridine participe d'une part, à assurer un maintien de l'équilibre du pool de nucléotides pour la synthèse d'ADN et d'ARN mais est également nécessaire pour le catabolisme du cycle pyrimidique, source de carbone et d'azote, et qui aboutit à la formation de bêta-alanine^{102,103} (voir figure 8). La CDA, au sein de la voie de recyclage des pyrimidines, a donc un rôle complémentaire avec la voie *de novo* de synthèse des pyrimidines.

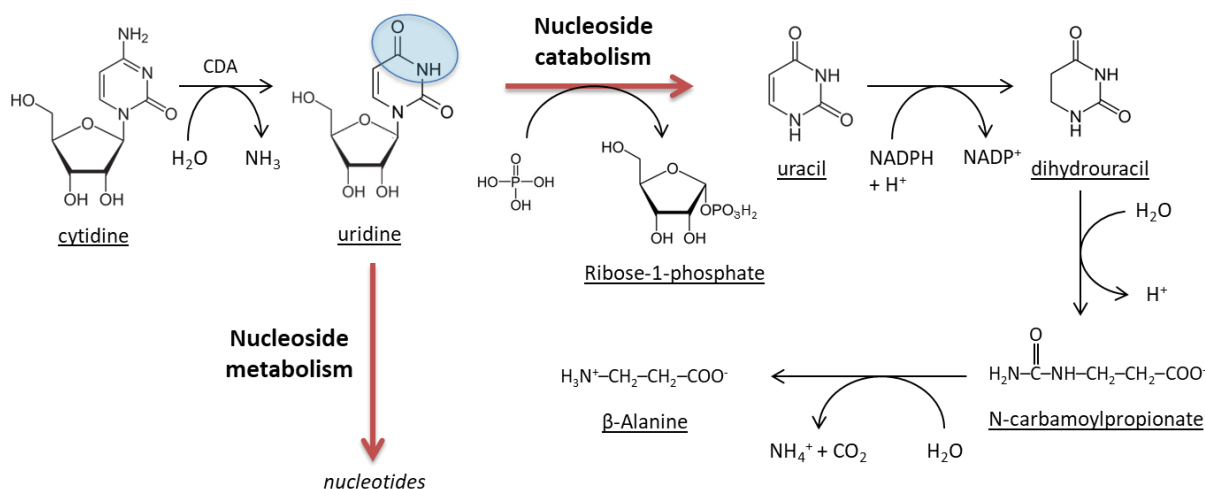


Figure 8 : Schéma réactionnel du catabolisme de l'uridine. Adapté de : « *Pyrimidine Biosynthesis and Catabolism* » www.BrainKart.com

La synthèse de novo des pyrimidines

La voie *de novo* de synthèse des pyrimidines nécessite d'une part l'apport de carbone et d'autre part l'apport d'azote afin de former le cycle pyrimidique et le ribose. Le ribose est apporté par le glucose *via* la voie des pentoses phosphates qui aboutit à la formation de PRPP (5-phospho-D-ribosyl-1(α)-pyrophosphate). Le carbone du cycle pyrimidine est apporté d'une part par le bicarbonate et d'autre part par l'aspartate (produit du cycle de Krebs) tandis que l'azote est apporté d'une part par la glutamine et d'autre part par l'aspartate. La voie *de novo*

des pyrimidines aboutit à la formation d'UMP (uridine monophosphate), qui est ensuite métabolisé pour donner les différents ribo- et désoxyribo- nucléotides (voir figure 9).

Les nucléotides nécessaires à la création d'ADN ou d'ARN sont donc synthétisés soit par la voie *de novo*, soit par la voie de recyclage. La voie *de novo* de synthèse d'UTP et CTP semble relativement bien conservée entre espèces. Cependant certains organismes semblent incapables de produire de l'UMP par la voie *de novo*, ce qui rend la voie de recyclage indispensable à leur survie¹⁰⁴.

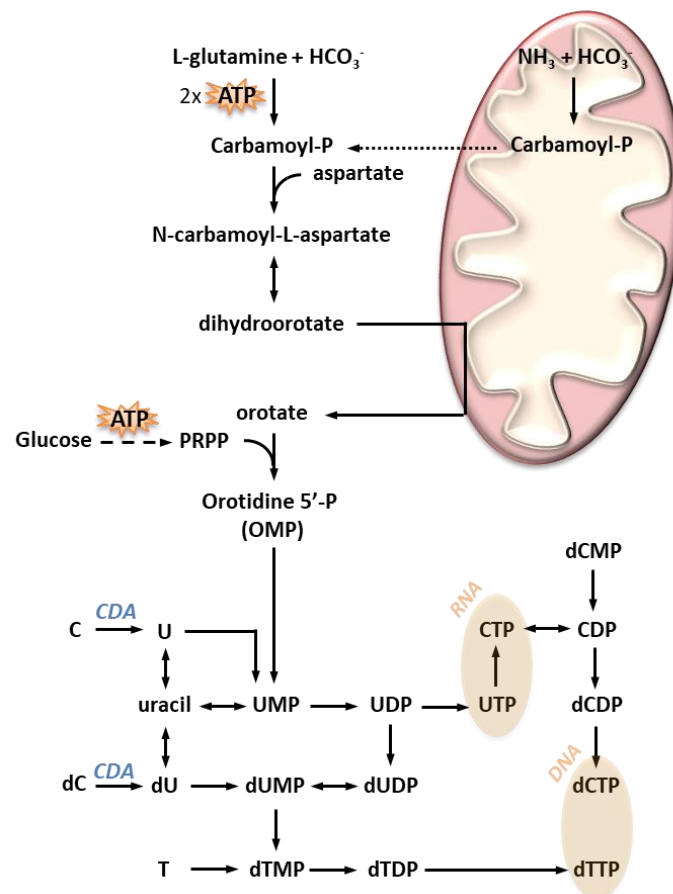


Figure 9 : Schéma de la voie de synthèse des pyrimidines.

Autres enzymes de recyclage de la famille des désaminases

La CDA n'est pas la seule désaminase cytoplasmique impliquée dans le recyclage des nucléotides. En contraste avec la CDA qui réalise l'hydrolyse de la cytosine sous forme nucléosidique, la désamination de l'adénine peut être réalisée sous forme nucléosidique (adénosine) par l'adénosine désaminase ou sous forme nucléotidique (AMP) par l'AMP désaminase. La guanosine, quant à elle est désaminée par la guanosine désaminase pour donner une xanthosine¹⁰⁵.

Il existe également une famille d'enzymes, appelées APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like), capable de désaminer les nucléotides engagés dans des liaisons ARN comme l'AI-CDA (activation-induced CDA)⁸³, souvent confondue avec la CDA. Ces deux enzymes sont cependant bien différentes, tant par leur structure et leur domaine catalytique, que par leur localisation subcellulaire.

2.4. Localisation de la CDA

Les bases de données référencent la CDA comme étant une protéine cytoplasmique¹⁰⁶ dont la fonction d'édition des cytidines lui permet de recycler les pyrimidines libres du cytoplasme, par la suite transportées passivement dans le noyau ou activement dans les mitochondries (par la famille des transporteurs d'adénine nucléotide ANT ou encore SLC25A19¹⁰⁷) où elles seront intégrées à l'ADN ou à l'ARN. Il est donc communément admis que la CDA est contenue principalement dans la fraction cytoplasmique. Cependant, A. Somasekaram et ses collaborateurs rapportent que la CDA semble avoir une localisation nucléaire possible due à une séquence NLS bipartite reconnue par le récepteur à importine¹⁰⁸. Ce sont les seuls à avoir mentionné une telle localisation, la taille sous forme tétramérique de la CDA ne lui permettant pas d'être transportée de façon passive à la membrane nucléaire (>40-50kDa).

La CDA est également retrouvée dans le sérum de patients¹⁰⁹. L'activité sérique de la CDA est d'ailleurs étudiée en relation avec plusieurs cancers pour prédire la réponse chimio thérapeutique ou les toxicités liées à la chimiothérapie¹¹⁰⁻¹¹³. De plus, l'activité sérique de la CDA est mesurée dans le cadre de grossesses anormales avec complications¹¹⁴, une inflammation aiguë dans l'arthrite rhumatoïde et certaines autres conditions¹¹⁵. En effet, il est connu que la CDA est libérée dans le sérum lorsque la membrane des PMN (polymorphonucléaires neutrophiles) est endommagée¹¹⁶. L'augmentation de l'activité sérique de la CDA chez les patients atteints de ces différentes conditions pourrait ainsi s'expliquer par la libération de l'enzyme par les cellules endommagées des tissus exprimant des niveaux élevés de CDA (comme le placenta et les neutrophiles).

Résumé des paragraphes 2.1 à 2.4 :

La **cytidine désaminase (CDA)** est une enzyme cellulaire responsable de la **transformation de cytidine** (et désoxycytidine) **en uridine** (et désoxyuridine). La CDA a donc un rôle dans le recyclage du pool de pyrimidine et participe avec le soutien de la voie *de novo* au **maintien et à l'équilibre du pool de nucléotides** pour assurer la synthèse d'ADN et d'ARN. C'est une **enzyme homotétramérique de 16kDa** qui nécessite des ions zinc pour assurer sa fonction catalytique. Plusieurs **polymorphismes** de l'enzyme ont été trouvés dans la population générale. La CDA a une localisation principalement **cytoplasmique** et peut être **excrétée** dans le sérum.

2.5. Régulation de l'expression de la CDA

En 1998, Schroder J. K. et ses collaborateurs corrélient le niveau protéique de la CDA à la quantité d'ARN messager et ils n'observent aucune amplification du gène *CDA*, ce qui signifie que la régulation se fait au niveau transcriptionnel ou épigénétique¹¹⁷.

Niveau d'expression tissu-spécifique de la CDA

Selon les tissus d'un même organisme, il existe une forte hétérogénéité d'expression de la CDA. La CDA est plus exprimée dans la moelle osseuse et le foie, et de façon plus modérée voire indétectable dans les autres tissus¹¹⁸ (voir figure 10). Au sein de la population leucocytaire, l'activité de la CDA est de 279 nmol/h/mg de protéines dans les lymphocytes périphériques tandis qu'elle est mesurée à 2443 nmol/h/mg de protéines dans les granulocytes¹¹⁹. De façon plus générale, il a été reporté que le niveau de CDA est plus élevé dans les cellules matures hématopoïétiques que dans les cellules immatures¹⁰⁴.

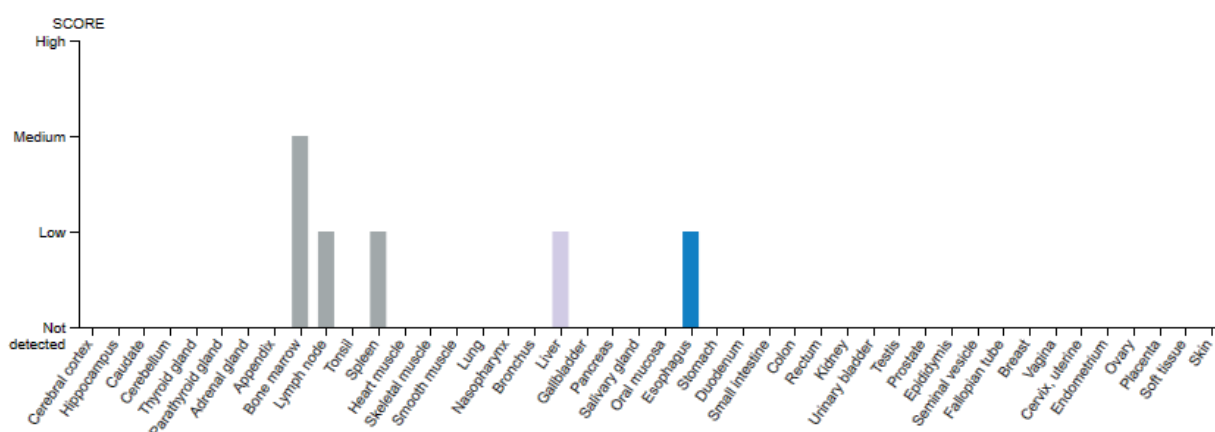


Figure 10 : Expression protéique de la CDA dans les tissus. De : « *Human Protein Atlas* » www.proteinatlas.org

Mécanismes de régulation transcriptionnelle de la CDA

Peu de mécanismes de régulation du niveau d'expression de la CDA sont réellement connus à l'heure actuelle. Tout d'abord, S. Watanabe et T. Uchida ont montré que l'injection de vitamine D3 induit une augmentation du niveau d'expression protéique de la CDA dans certaines tumeurs¹¹⁸. S. S. Shord et R. P. Patel ont montré que l'administration de paclitaxel (anticancéreux antinéoplasique) a un effet sur le niveau d'ARN messager de la CDA dans certaines lignées cancéreuses¹²⁰. Cependant, aucun mécanisme n'est proposé par ces deux équipes pour expliquer la modulation du niveau d'expression de la CDA. K. K. Frese et ses collaborateurs ont montré que le nab-paclitaxel réduit le niveau de protéine CDA, mais pas le niveau d'ARN *in vivo*. Ils ont montré que c'est la production de ROS qui induit une diminution du niveau de CDA, puisque le taux de CDA est rétabli lorsqu'on utilise la N-acétylcystéine (NAC,

une molécule antioxydante)¹²¹.

Plus récemment, l'équipe de M. Amor-Gueret a montré que le niveau d'expression de la CDA dans les tumeurs est régulé négativement par méthylation du promoteur de la CDA¹²². En effet, l'utilisation d'un médicament inhibant les méthyltransférases de l'ADN sur des cellules à faible expression de CDA augmente l'expression de CDA dans ces cellules. Aussi, plusieurs sites de liaison à des facteurs de transcription dans la région du promoteur de la CDA ont été décrits dans la littérature : cEBPs, SP1, AP1, Myc/Max, HFH2, Lyf1, ARP1⁸⁵ et GATA1¹²³. D'autre part, plusieurs mutations naturelles du gène de la CDA sont retrouvées dans la population, et en particulier, dans le domaine proche du promoteur. Ces mutations sont susceptibles de modifier les sites de liaison aux facteurs de transcription et donc d'altérer le niveau de transcription de la CDA. L'équipe de R. E. Ferrell a mis en évidence trois polymorphismes à un seul nucléotide (SNP) -92A>G, -451C>T et -897C>A qui forment un haplotype où ATC induit une plus faible expression de la CDA¹²⁴.

De plus, l'équipe de Z.-M. Shao a corrélé négativement miR-484 à l'expression de la CDA et a montré que la surexpression de miR-484 contrecarre la chimiorésistance induite par la CDA. Il semblerait que ce micro ARN puisse se lier directement à la partie 3'UTR de son ARN messager et d'induire une diminution de l'expression protéique de la CDA¹²⁵. A. Rajabpour et ses collaborateurs ont également montré que l'expression de miR-608 est diminuée lors de l'induction de chimiorésistance dans des cellules cancéreuses pancréatiques, dans lesquelles l'expression de CDA est alors augmentée¹²⁶. Enfin, l'équipe de Z. Gil a montré que les macrophages participent à la chimiorésistance de la tumeur en augmentant l'expression de CDA^{79,127} et ils ont mis en évidence le rôle du miR-365 comme régulateur de l'expression de CDA¹²⁸.

La CDA présente une **expression très hétérogène** dans les tissus d'un même organisme. Son niveau d'expression protéique est corrélé à la quantité d'ARN messager, ce qui signifie que sa **régulation est réalisée au niveau transcriptionnel ou épigénétique**. La régulation de l'expression de la CDA s'exerce par **méthylation de son promoteur** et plusieurs **microARN** ont été associés à la régulation de son expression.

2.6. Régulation de l'activité de la CDA

L'activité sérique de la CDA a été mesurée dans une cohorte de 150 patients atteint d'un cancer, elle s'étale de 0,6 à plus de 18 U/mg, soit une grande hétérogénéité inter-patients¹¹⁰. De nombreux polymorphismes du gène *CDA* ont été mis en évidence dans la population. Ces variations génétiques affectent la structure de l'enzyme, cependant seul quelques-uns ont pu être corrélés à une activité plus ou moins importante de l'enzyme. Ces mutations non synonymes sont essentiellement contenues sur la séquence codante du gène.

Polymorphismes activateurs et réducteurs de l'activité de la CDA

Les deux polymorphismes les plus étudiés sont les substitutions nucléotidiques simples 208G>A et 79A>C. Malgré certaines études non conclusives voire des résultats contradictoires sur la corrélation entre l'activité enzymatique de la CDA et ses variations géniques, il semblerait que la présence du SNP 208G>A (A70T) résulte en une plus faible activité de la CDA^{113,129} tandis que la mutation 79A>C (K27Q) est activatrice vis-à-vis de la cytidine et de la désoxycytidine^{130,131}. S. Vincenzetti et ses collaborateurs mettent également en évidence un haplotype activateur de la CDA (-451T/-92G/-31Del/79C/435C)¹⁰⁰. Ces polymorphismes ont également des répercussions sur la métabolisation des drogues avec une diminution de 68% de l'activité vis-à-vis de l'Ara-C avec la mutation protéique A70T rapporté par L. Yue, et ses collaborateurs¹²⁹. Etrangement, plusieurs résultats sont contradictoires concernant la mutation K27Q. Une équipe a montré une diminution de 23% à 70% de l'activité de la CDA vis-à-vis de l'ara-C¹³² et une diminution de 34% de l'activité de cette même enzyme vis-à-vis de la gemcitabine¹³³, tandis qu'une autre montre une augmentation de l'activité de la CDA vis-à-vis de l'Ara-C mais une diminution vis-à-vis de la décitabine¹³⁰. Ces incohérences entre l'activité de la CDA et ses SNP suggèrent que les polymorphismes du gène ne suffisent pas à expliquer l'hétérogénéité de l'activité sérique de la CDA entre patients. Malheureusement, les données sur les mécanismes de modulation de l'activité de la CDA sont rares.

Régulation post-traductionnelle

Les bases de données référencent un site de phosphorylation possible de la protéine CDA sur Y79, documenté par sept études à grande échelle¹³⁴. Cependant, aucune étude n'a été menée spécifiquement pour comprendre les conséquences de la modification post-traductionnelle de la protéine CDA ou le mécanisme par lequel elle est phosphorylée.

Régulation par le pool de nucléotides

Il n'a actuellement jamais été reporté dans la littérature de régulation de type allostérique ou par ses substrats et/ou ses produits de l'activité de la CDA. En effet, bien que les produits de la CDA tels que l'uridine et ses dérivés, ou le CMP aient la capacité d'inhiber l'enzyme, des études de pharmacocinétique ont montré que leur affinité avec la CDA (K_i) est très modérée et leur concentration dans l'environnement bien trop faible pour qu'ils exercent une inhibition détectable de l'enzyme¹³⁵. Cependant, ce type de régulation par le pool de nucléotides est possible pour d'autres enzymes de recyclage semblables à la CDA, telles que la cytosine désaminase (COD)¹³⁶ ou encore l'adénosine désaminase (ADA) qui est régulée par la présence d'inosine¹³⁷. Des expériences *in vitro* restent donc à mettre en place pour s'assurer que la CDA n'est pas sensible à une régulation similaire.

2.7. Inhibiteurs pharmacologiques de la CDA

Les inhibiteurs pharmacologiques connus de la CDA reposent tous sur le même mécanisme d'action. La conversion de cytidine en uridine par la CDA s'accompagne d'un intermédiaire réactionnel qui résulte de l'attaque nucléophile du complexe eau/zinc sur le C4 du cycle pyrimidique, et à la suite duquel le groupement ammoniac est libéré. En remplaçant le groupement NH_3 par un proton par exemple (comme c'est le cas pour la zébularine, voir figure 11), l'intermédiaire réactionnel est bloqué. La molécule se comporte donc comme un puissant inhibiteur compétitif de l'enzyme.

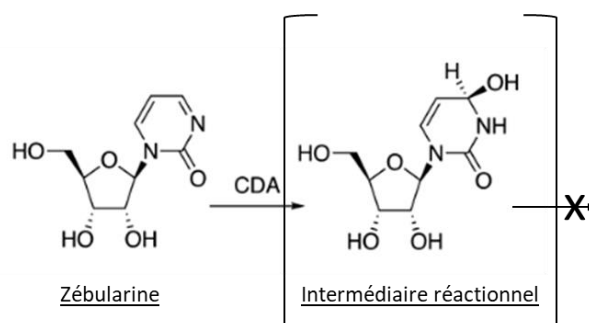


Figure 11 : Schéma réactionnel de l'inhibition de CDA par la zébularine. Adapté de O. R. Ludek et coll. 2009.

Même si d'autres inhibiteurs de la CDA, comme le 3,4,5,6-tétrahydrouridine (THU) ou le 1,3-diazépinone riboside (DR) semblent avoir des structures plus éloignées (voir figure 12), leur mécanisme d'action repose également sur le blocage de l'enzyme dans un état d'intermédiaire réactionnel non résolu.

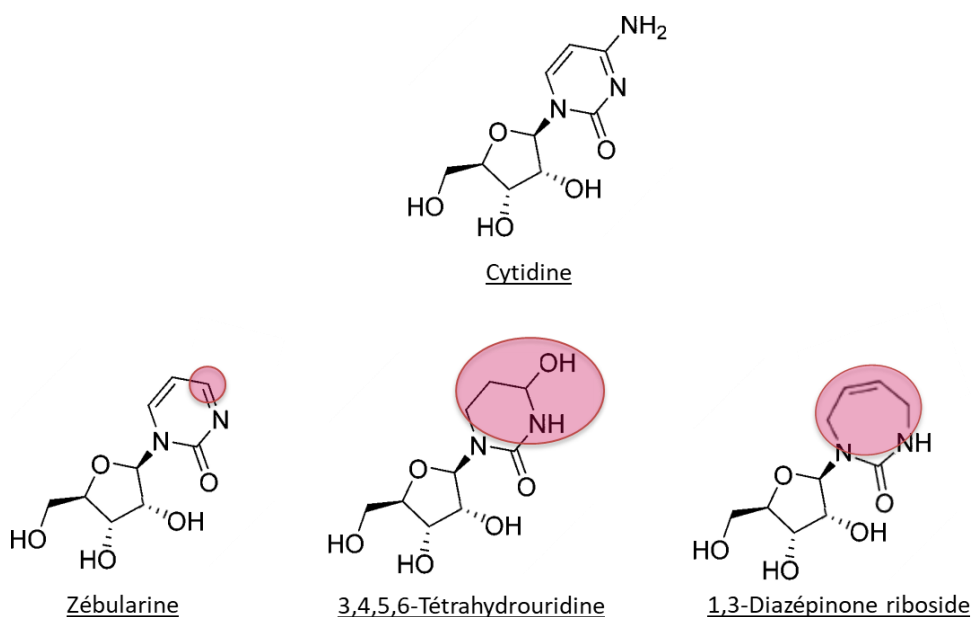


Figure 12 : Représentation moléculaire de la cytidine (substrat naturel de la CDA) et de trois inhibiteurs de la CDA : la zébularine, le THU et le DR.

L'équipe de S. Vincenzetti a réalisé un screening des inhibiteurs de la CDA (voir figure 13)¹³⁵. Parmi toutes les molécules mises en évidence, les bons inhibiteurs sont ceux dont le K_i est inférieur ou égal au K_m de la CDA pour la cytidine (soit <3,9) afin d'entrer en compétition avec les substrats naturels. On note donc le THU, la zébularine et son dérivé fluoré, comme inhibiteurs principaux de la CDA, ainsi que le DR découvert plus récemment.

Inhibiteurs	K_i (μM)
3,4,5,6-Tétrahydrouridine (THU)	0,15
5-Fluorozébularine	0,3
Zébularine	1
5,6-Dihydrouridine	40
3-Déazauridine	110
5-Fluoro-2'-désoxyuridine	180
5,6-Dihydrothymidine	280
2-Thui-6-azauridine	290
5-Bromouridine	380
Uridine	400
5-Fluorouridine	430
5-Méthyluridine	440
2'-Désoxyuridine	440
Cytidine monophosphate (CMP)	500

Figure 13 : Liste des inhibiteurs de CDA testés par l'équipe de S. Vincenzetti et constantes d'inhibition associées.
Adapté de : S. Costanzi et coll. 2011.

Le THU a été mis en évidence pour la première fois en 1967 grâce à sa co-extraction avec la CDA et sa purification¹³⁸. Il a ensuite été étudié en tant qu'inhibiteur de la CDA par R. Cohen et R. Wolfenden en 1971 chez *Escherichia coli* pour élucider son mécanisme d'action et son profil pharmacocinétique¹³⁹. Son mécanisme d'action repose sur son groupement hydroxyle en C4 du cycle pyrimidique qui se lie au zinc à la place de la molécule d'eau¹⁴⁰. Cependant, l'équipe de Y. Manome a montré que le THU aurait un effet cytostatique à 100 μM sur certaines lignées cellulaires, et ce indépendamment de leur niveau d'expression en CDA car le knock-down de la CDA par siARN dans ces mêmes lignées n'a pas d'effet cytostatique à 4 jours. Il dénonce donc un mécanisme d'action distinct de l'inhibition de CDA. Selon ses travaux de recherche, le THU diminue la phase S *via* l'inhibition du facteur de transcription E2F1¹⁴¹. La biodisponibilité du THU n'étant que de 20%¹⁴², l'équipe de T. Tsukamoto a synthétisé un nouveau composé dérivé fluoré de cette molécule, le (4R)-2'-Deoxy-2',2'-difluoro-3,4,5,6-tétrahydrouridine, de meilleure stabilité dans l'environnement gastrique, ce

qui permet une meilleure biodisponibilité orale. Ce composé a un IC50 comparable à celui du THU (0,4µM contre 0,34µM pour le THU) et un meilleur profil pharmacocinétique pour l'inhibition de CDA du fait de sa stabilité¹⁴³. Cette équipe propose donc d'utiliser ce composé en complément oral d'une chimiothérapie telle que l'Ara-C pour améliorer son efficacité, mais aucune étude clinique avec ce composé n'a été enregistrée à l'heure actuelle.

La zébularine a été décrite la première fois par l'équipe de J.S. Driscoll en 1980 comme alternative au THU¹⁴⁴. Comme expliqué plus haut, la zébularine bloque la CDA dans un état intermédiaire grâce à son proton en C4⁹². La zébularine a également été étudiée chez *Escherichia coli* afin d'élucider son mécanisme d'action et son profil cinétique¹⁴⁵. En plus de son activité inhibitrice de la CDA, il semblerait que la zébularine puisse interagir avec les cytosine-[C5]- ADN méthyl transférases (C5 MTases). Ces enzymes sont responsables de la méthylation de l'ADN. En prenant la place d'une cytidine dans l'ADN, la zébularine inhibe ces enzymes, par un mécanisme proche de celui de l'inhibition de la CDA, ce qui a pour effet une déméthylation du génome¹⁴⁶.

Le DR a été découvert en 1981¹⁴⁷, cependant son mécanisme d'action n'a été élucidé que bien plus tard. En effet, le DR ne peut pas interagir avec la CDA *via* une coordination avec le complexe eau/zinc du fait de sa structure particulière. Son mécanisme d'action est donc légèrement différent des deux premiers inhibiteurs mentionnés. S. J. Chung et ses collaborateurs ont démontré que le mode d'action de ce composé résulte de la liaison électrostatique (de type π - π) entre la double liaison du cycle du DR et le cycle aromatique de l'acide aminé Phe137 de la poche catalytique¹⁴⁸.

Aussi, plusieurs équipes de recherche se sont penchées sur l'étude d'inhibiteurs plus stables, mais souvent au détriment de leur potentiel inhibiteur. En revanche, l'équipe de S. Vincenzetti souligne la grande stabilité de la pseudoisocytidine qui, malgré un Ki de 28, ferait un candidat de choix pour une utilisation *in vitro* et *in vivo* à la place des autres inhibiteurs, beaucoup plus instables¹³⁵.

Résumé des paragraphes 2.6 et 2.7 :

Les deux **polymorphismes** de la CDA les plus étudiés sont les substitutions nucléotidiques simples **208G>A** et **79A>C** qui sont associés à une **variation de l'activité de l'enzyme**. Plusieurs **inhibiteurs pharmacologiques** de la CDA ont été développés, en particulier le **THU**, le **DR** et la **zébularine** présentent une bonne efficacité. Ce sont des **inhibiteurs catalytiques compétitifs** qui bloquent le site actif de l'enzyme.

2.8. Importance fonctionnelle de la CDA dans les pathologies

À ce jour, aucun modèle de souris knock-out pour la CDA n'a été publié. Par conséquent, nous n'avons aucune connaissance de l'importance de la CDA dans le

développement. Cependant, une pathologie a été associée à un déficit en CDA : le syndrome de Bloom¹⁴⁹.

Le syndrome de Bloom

La CDA a un rôle important dans le maintien du pool de nucléotides et il est connu qu'un déséquilibre de ce pool peut amener à un fort stress répliatif délétère pour la cellule¹⁵⁰. Le syndrome de Bloom est une maladie autosomique rare provoquée par une mutation du gène *BLM* sur les deux allèles qui résulte en une forte instabilité génétique¹⁵¹. À ce jour, plusieurs mutations du gène *BLM* ont été décrites, l'une d'entre elles en particulier notée *BLM*^{Ash} est retrouvée de façon récurrente et aboutit à une protéine tronquée¹⁵². Le gène *BLM* code pour une protéine nucléaire du même nom dont les principales fonctions, en tant qu'hélicase à ADN, sont le maintien de l'intégrité génomique¹⁵³. *BLM* est notamment relocalisé au niveau des cassures de l'ADN au sein d'un complexe contenant également RAD51, qui signale les dommages et participe ainsi à leur prise en charge par les mécanismes de réparation. Généralement, les mutations retrouvées sur le gène *BLM* sont des délétions ou des insertions de bases qui résultent en une diminution de la transcription du gène ou la terminaison de la traduction due à un non-sens de lecture de l'ARNm¹⁵³. Un défaut ou une altération de cette protéine induit donc une mal-fonction du système de réparation par recombinaison homologue. Des mutations spontanées des cellules somatiques sont ainsi beaucoup plus fréquentes que chez un individu normal. En conséquence, les patients atteints de cette pathologie présentent des rougeurs congestives de la peau, appelées érythèmes télangiectatiques, ainsi que des retards de croissance, voire d'autres malformations¹⁵⁴. Ces patients sont également prédisposés à la formation précoce de tous types de cancers, ce qui réduit considérablement leur espérance de vie¹⁴⁹. Une caractéristique systématique de l'instabilité génétique liée au syndrome de Bloom est la présence d'échanges de segments entre les chromatides sœurs d'un chromosome, ce qui a d'ailleurs longtemps constitué une méthode de diagnostic de cette maladie, aujourd'hui confirmé par séquençage¹⁵⁵.

L'équipe de M. Amor-Guérêt a montré qu'une mutation du gène *BLM* est associée à une perte d'expression de CDA. Parmi les nombreux défauts de ségrégations des chromatides, la formation de ponts chromatinien (conséquences d'une mauvaise ségrégation de chromatides sœurs) sont directement du à l'absence de *BLM*, tandis que la présence de ponts ultra-fins (UFB) (qui succèdent à une réplication incomplète de l'ADN quand les cellules entrent en mitose) résultent d'un déséquilibre du pool de pyrimidines dû à la dérégulation de CDA¹⁵⁶. Le mécanisme expliquant ce phénomène serait l'accumulation de dCTP dû à l'absence de CDA, qui induit une diminution de l'activité de PARP-1, une protéine impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN. L'équipe de C.P. Witte a complété cette hypothèse dans un autre modèle en montrant que l'accumulation d'espèces intermédiaires du catabolisme des pyrimidines dû à l'inactivation de CDA est toxique¹⁰². Il a également été proposé qu'un fort stress oxydatif, retrouvé dans les cellules de Bloom, soit en partie responsable de l'instabilité génétique présente dans ces cellules^{157,158}.

Le rôle de la CDA dans la chimiorésistance

Un aspect fonctionnel notable de la CDA est qu'elle possède également la capacité de désaminer des analogues synthétiques ou naturels de la cytidine. Ceci lui a valu d'être le centre de nombreuses études depuis les années 60 avec l'apparition des premiers anti-métabolites anticancéreux analogues de la cytidine tels que la cytosine arabinoside (Cytarabine ou Ara-C)¹⁵⁹. En effet, la CDA est reconnue comme étant un facteur clé de chimiorésistance *in vitro* aux analogues de cytidine comme la Cytarabine (Ara-C), la Gemcitabine (dFdC), ou la Décitabine (5-Aza-dC)¹⁶⁰ (voir figure 14) puisqu'elle catalyse leur transformation en des métabolites inactifs^{159,161}.

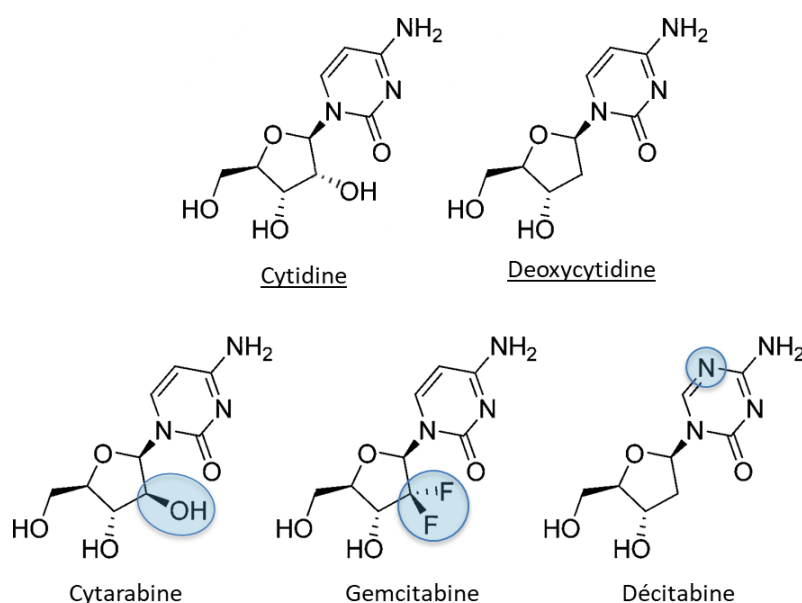


Figure 14 : Représentation moléculaire des substrats naturels de la CDA : la cytidine et la désoxycytidine et de trois analogues utilisés en chimiothérapies : la cytarabine, la gemcitabine et la décitabine.

En effet, la CDA a une affinité semblable pour ces métabolites de synthèse par rapport aux substrats naturels avec des K_m de 11 μM pour l'Ara-C contre 3,9 pour la cytidine par exemple^{135,162}. Aussi, il a été montré *in vivo* dans un modèle murin que la CDA est responsable de l'inactivation de 28% de la gemcitabine¹¹⁰. Chez l'homme, une dose d'Ara-C délivrée par intraveineuse est retrouvée à 80% éliminée dans les urines, dont 90% sous sa forme uracile, donc modifiée par la CDA¹⁶³. Une étude menée sur 40 patients atteints d'un cancer du pancréas et traités par gemcitabine a permis de corrélérer une activité élevée de la CDA (>6 U/mg) avec un cancer résistant et évolutif. Cette étude conclut que les patients présentant une activité élevée de CDA sont cinq fois plus susceptibles de régresser après un traitement par gemcitabine¹⁶⁴.

Comme indiqué précédemment, le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans la résistance aux traitements puisque la CDA est libérée dans le sérum. En effet la gemcitabine peut ainsi être inactivée avant même d'avoir pénétré dans le cytoplasme

des cellules cancéreuses. N. Weizman et ses collaborateurs ont montré que la résistance des tumeurs pancréatiques était en partie due aux macrophages associés aux tumeurs (TAM), qui surexpriment la CDA en réponse au traitement par gemcitabine et libèrent l'enzyme dans l'environnement tumoral¹⁶⁵. De plus, L. T. Geller et ses collaborateurs ont souligné que le microbiome tumoral a aussi son rôle dans la chimiorésistance. En effet, dans leur étude, 76 % des patients étaient positifs pour les gammaprotéobactéries, qui possèdent une CDA orthologue capable de désaminer la gemcitabine et de participer ainsi à la chimiorésistance¹⁶⁶.

La CDA présente donc un rôle thérapeutique important puisque sa modulation permettrait de vaincre la chimiorésistance de certains cancers. En contrepartie, il est important de noter que les patients ayant des taux ou une activité de l'enzyme plus faibles que la normale, traités par chimiothérapie (gemcitabine ou Ara-C) présentent des effets secondaires graves dus à une toxicité exacerbée du traitement^{110,167,168}. En effet J. Ciccolini et ses collaborateurs ont montré que les patients déficients en CDA (c'est-à-dire avec une activité sérique mesurée inférieure à 1,3U/mg) développent des effets indésirables graves (de grade 3 à 4) lorsque traités par gemcitabine¹¹⁰. Au contraire, la Capécitabine, un autre analogue synthétique de la désoxycytidine, doit être désaminée pour être activée. Une faible activité de CDA chez les patients traités par Capécitabine réduit donc la sensibilité à la chimiothérapie *in vitro*¹⁶⁹.

La CDA est associée à une pathologie : **le syndrome de Bloom**, une maladie autosomique rare provoquée par une mutation du gène BLM, qui est accompagnée d'une diminution de l'expression de CDA. Les cellules des patients atteints par ce syndrome sont caractérisées par une **forte instabilité génétique**, qui peut provoquer des **mutations initiatrices de cancers**. La CDA a principalement été étudiée pour son **rôle de facteur de résistance** à plusieurs chimiothérapies telles que la Gemcitabine, la Cytarabine et la Décitabine, qui sont des analogues de (désoxy-)cytidine détoxifiés par la CDA. Elle joue donc un rôle important puisque la modulation de son expression permettrait de **contrecarrer la chimiorésistance** de certains cancers.

2.9. Stratégies thérapeutiques impliquant la CDA

Etant donné la grande hétérogénéité d'expression de la CDA, plusieurs types d'opportunités thérapeutiques sont possibles. La majorité des cancers sous-expriment la CDA comparativement aux tissus sains. Cependant, certains cancers la surexpriment : cancers du poumon, du pancréas, de l'estomac, des testicules et du vagin (voir figure 15). En particulier, la CDA est un facteur de mauvais pronostic dans les cancers du pancréas et du col de l'utérus (voir figure 16)¹⁷⁰. Différentes stratégies thérapeutiques peuvent donc être envisagées selon les tissus touchés par le cancer.

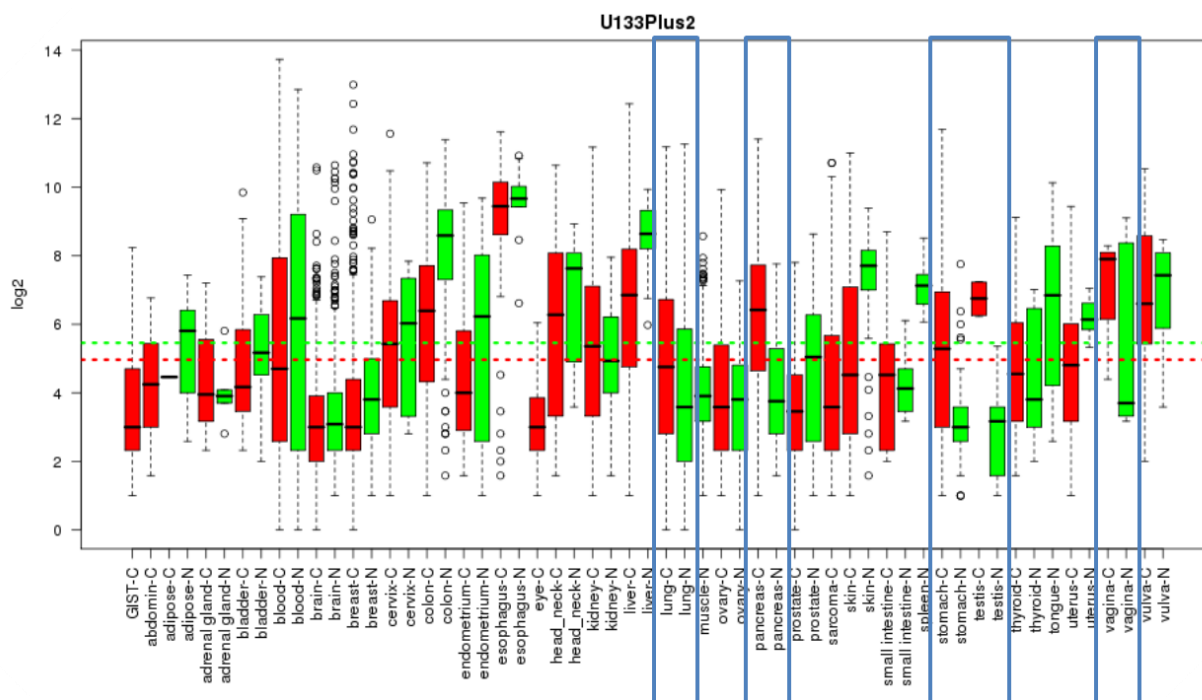


Figure 15 : Expression de l'ARN messager de la CDA dans les cancers et les tissus sains associés. Adapté de : « *GENT database* » www.medicalgenome.kribb.re.kr/GENT/

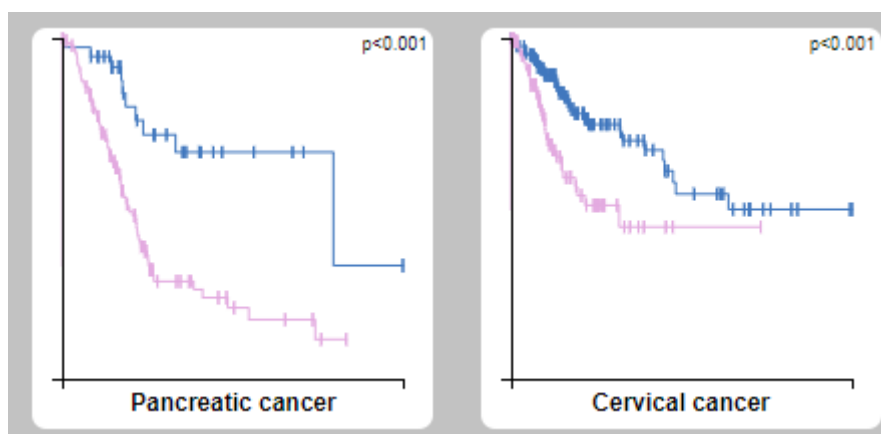


Figure 16 : Courbes de survie des patients atteints d'un cancer du pancréas ou d'un cancer du col de l'utérus selon l'expression de CDA (groupes séparés à la médiane, en bleu : groupe qui exprime le moins de CDA, en rose : groupe qui exprime le plus de CDA). Source : TCGA. De : « *the Human Protein Atlas* » www.proteinatlas.com

L'équipe de M. Amor-Gueret a montré que les tumeurs dans lesquelles le niveau d'expression de CDA est faible sont plus sensibles au dérivé d'aminoflavone AFP464¹²². Les tissus qui expriment davantage de CDA sont, à l'inverse, résistants à ces drogues, ce qui placerait la CDA comme marqueur biologique prédictif de réponse. Les tumeurs exprimant le plus de CDA devraient donc, en théorie, être plus résistantes aux traitements.

Plusieurs études combinant diverses chimiothérapies et des inhibiteurs de la CDA ont été menées jusqu'à présent^{142,171–174}. Cependant, seuls quelques essais cliniques ont été

menés avec la chimiothérapie et des inhibiteurs de la CDA. Des essais cliniques de phase I ont étudié les effets de la 5-fluoro-2'-désoxycytidine avec le THU (NCT00359606, NCT01041443, disponible sur ClinicalTrial.gov) et deux essais cliniques de phase II ont été terminés récemment en combinant la 5-fluoro-2'-désoxycytidine avec le THU et un autre combinant THU et décitabine avec nivolumab (NCT00978250, NCT02664181, disponible sur ClinicalTrial.gov) mais aucun des résultats n'a encore été publié.

Une stratégie proposée par l'équipe de Z. Gil, qui a démontré la chimiorésistance induite par les macrophages en modulant le niveau d'expression de CDA, serait de cibler les macrophages afin de réduire les niveaux de CDA et d'ainsi chimio-sensibiliser la tumeur à la gemcitabine¹²⁷. Il a également été mis en évidence que la CDA, ou d'autres enzymes de la voie de recyclage des pyrimidines, peuvent représenter des cibles intéressantes pour tuer des pathogènes tels que les trypanosomatides (des protozoaires flagellés provoquant par exemple la maladie du sommeil ou encore la leishmaniose) qui ne produisent pas certaines enzymes de la voie *de novo* et sont donc dépendants de la CDA pour leur synthèse de nucléotides¹⁷⁵.

L'équipe de M. Zauri a quant à elle développé une stratégie bien différente. Elle a montré que les cellules qui surexpriment la CDA sont capables de métaboliser des analogues synthétiques de désoxycytidine et de permettre leur insertion dans l'ADN¹⁷⁶. Ces nucléotides, une fois utilisés pour la réplication du brin, déclenchent la réponse de facteur de surveillance tel que l'uracile glycosylase, ce qui provoque de nombreuses cassures de l'ADN¹⁷⁷. Dans des cellules normales, ces nucléotides ne sont pas intégrés dans l'ADN car, bien que l'ADN polymérase ne soit pas sélective, d'autres enzymes des voies de recyclage et de métabolisation des nucléosides telles que CMPK1 (cytidine monophosphate kinase 1) font barrière à ces formes épigénétiquement modifiées afin de protéger le génome. Ces observations montrent bien que la surexpression de CDA permet la désamination d'analogues de désoxycytidine, 5hmdC et 5fdC en 5hmdU et 5fdU respectivement, qui sont reconnus par les kinases, tri-phosphorylés et incorporés dans l'ADN, ce qui déclenche l'arrêt du cycle cellulaire et enfin la mort des cellules¹⁷⁶. Cette découverte présente une opportunité thérapeutique pour traiter les cancers qui surexpriment la CDA.

Il est cependant important de noter que la CDA, par son action chimio-résistante, protège les tissus de l'effet toxique de telles drogues administrées par intraveineuse dans tout l'organisme. Une toxicité sévère est donc mesurée dans les tissus à prolifération rapide avec des niveaux faibles de CDA^{110,167,168}. Une stratégie thérapeutique développée par T. Moritz consiste dans ce sens à réaliser un transfert de gène afin de surexprimer la CDA et donc de protéger ces tissus des effets secondaires^{178,179}. Son équipe a notamment montré l'intérêt d'une telle approche dans le cas d'une leucémie aigüe traitée par Ara-C post-transplantation afin de protéger la moelle seigne.

Plusieurs stratégies thérapeutiques impliquant la CDA ont été développées. La CDA est un **marqueur biologique prédictif de réponse** à plusieurs thérapies telles que le dérivé d'aminoflavone AFP464. Son ciblage permettrait donc de **sensibiliser les tumeurs**. Plusieurs essais cliniques combinant diverses chimiothérapies et des inhibiteurs de la CDA sont actuellement à l'étude mais aucun résultat n'a encore été publié. Il peut également être proposé de **cibler les macrophages** associés aux tumeurs car ils produisent de la CDA qui participe à la chimiorésistance. D'autres stratégies consistent à **utiliser l'activité catalytique de la CDA** pour transformer des nucléosides synthétiques qui pourront être intégrer à l'ADN et provoquer la mort cellulaire. Enfin, comme la **CDA protège les tissus de l'effet toxique des chimiothérapies** administrées, il a été proposé de surexprimer localement cette protéine pour protéger ces tissus.

3. Le métabolisme énergétique tumoral

3.1. La reprogrammation énergétique tumorale

D. Hanahan et R.-A. Weinberg ont défini pour la première fois en 2000 une cellule cancéreuse d'après six caractéristiques principales : la mise en place d'une signalisation pour soutenir la prolifération, l'indépendance vis-à-vis des suppresseurs de croissance, la résistance à la mort cellulaire, l'immortalité répliquative, l'induction de l'angiogenèse et l'activation de l'invasion pour former des métastases¹⁸⁰. Une décennie plus tard, deux nouvelles caractéristiques ont ensuite été ajoutées : l'évasion immunitaire et la reprogrammation du métabolisme énergétique (voir figure 17)¹⁸¹. C'est cette dernière caractéristique qui sera détaillé dans les paragraphes suivants. En présence d'oxygène, les cellules normales réalisent le catabolisme du glucose en le transformant en pyruvate *via* la glycolyse puis en dioxyde de carbone, NADH, FADH₂ ou GTP dans les mitochondries. En condition anaérobie, le catabolisme du glucose est incomplet car le pyruvate n'est pas transporté dans les mitochondries mais transformé en lactate. Une des caractéristiques des cellules cancéreuses est qu'elles reprogramment leur métabolisme énergétique vers la glycolyse même en présence d'oxygène. Cet état énergétique de glycolyse aérobie porte le nom d'effet Warburg.

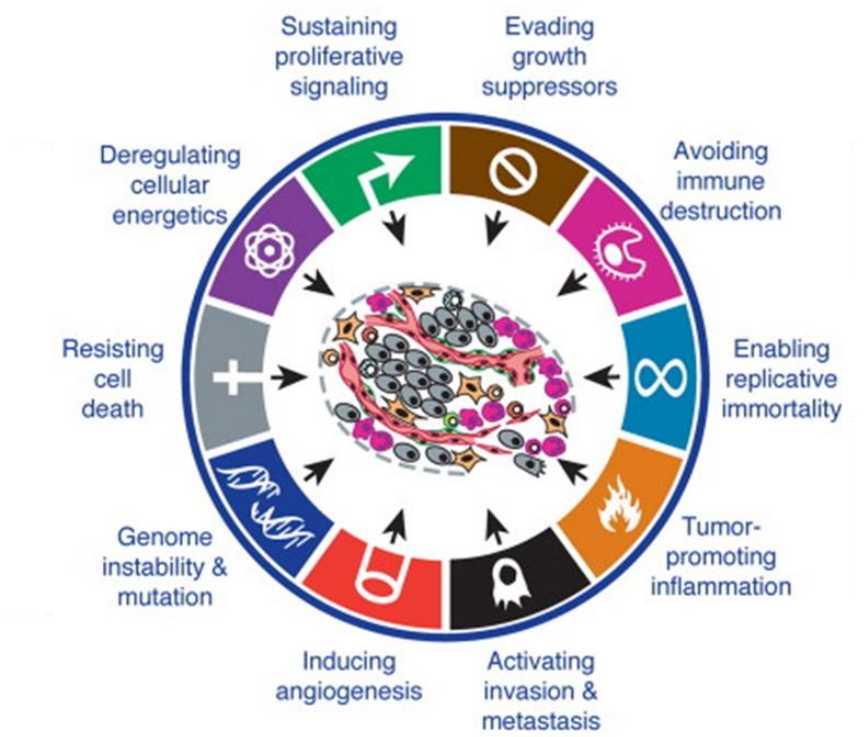


Figure 17 : Les caractéristiques des cellules cancéreuses. Adapté de : D. Hanahan & R. A. Weinberg, 2011.

3.1.1. L'effet Warburg

Dans les années 1920, Otto Warburg fait l'observation que les cellules cancéreuses consomment beaucoup plus de glucose et produisent beaucoup plus de lactate que les cellules normales, sans consommer plus d'oxygène. Cet événement, connu sous le nom d'effet Warburg¹⁸², consiste pour une cellule à passer en partie de la production d'ATP par oxydation phosphorylante (OxPhos, dans la mitochondrie) à la production d'ATP par la glycolyse, même à des concentrations normales en oxygène¹⁸² (voir figure 18). Otto Warburg propose que cette reprogrammation énergétique soit une conséquence directe de dysfonctions de la respiration mitochondriales¹⁸³. Il soutient l'idée que lorsque la respiration des cellules de l'organisme a été irréversiblement endommagée, les cellules deviennent cancéreuses en adaptant leur production d'énergie par la fermentation (ou glycolyse aérobie)¹⁸².

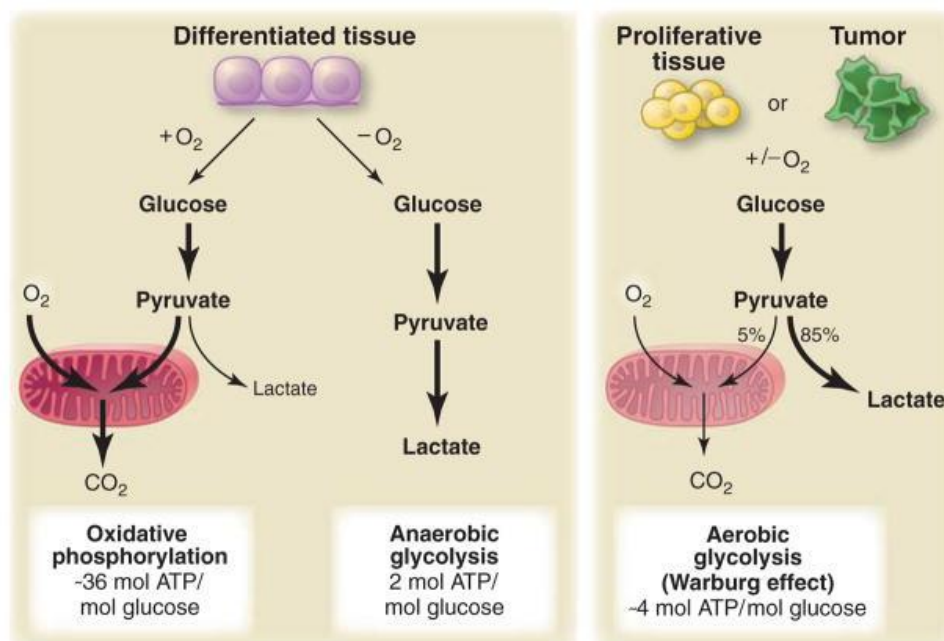


Figure 18 : (à gauche) l'utilisation du glucose par les cellules normales selon les conditions d'aérobie, (à droite) l'utilisation du glucose par les cellules cancéreuses quelque soit la concentration en oxygène. De : M. G. Vander Heinden et coll. 2009.

L'effet Warburg a été repris et cité pendant plusieurs décennies avant d'être nuancé. En effet, Otto Warburg ne s'était focalisé que sur la notion d'énergie liée à la production d'ATP¹⁸². Or, bien que l'altération métabolique des cellules cancéreuses implique généralement l'effet Warburg, la production accrue d'ATP par glycolyse aérobie est insuffisante pour supporter la répllication cellulaire¹⁸⁴. La glycolyse, qui permet le catabolisme du glucose en lactate, ne génère que 2 ATP par molécule de glucose, alors que l'oxydation phosphorylante génère jusqu'à 36 ATP par molécule de glucose. La glycolyse, bien que plus rapide que l'OxPhos pour la synthèse d'ATP, semble donc moins efficace, du moins en termes de production d'ATP. Pourtant, les cellules en prolifération rapide ont recours à ce métabolisme. La raison principale est que l'ATP n'est pas la molécule limitante pour la prolifération cellulaire. En effet, les trois besoins fondamentaux des cellules en division rapide

Les cellules cancéreuses se caractérisent par un ensemble de voies dérégulées dont une **reprogrammation du métabolisme énergétique**. **Otto Warburg** est le père fondateur de cette théorie, qui a commencé par l'observation que les cellules cancéreuses **consomment plus de glucose et produisent plus de lactate** que les cellules normales, malgré un apport en oxygène suffisant. **L'effet Warburg (ou glycolyse aérobie)** est ainsi mesuré dans la plupart des tumeurs. L'augmentation du flux glycolytique sert à soutenir les trois besoins fondamentaux des cellules cancéreuses : une **biosynthèse accrue des macromolécules** qui permet l'augmentation de biomasse, un maintien rigoureux de **l'équilibre d'oxydoréduction (RedOx)** essentiel à de nombreuses réactions cellulaires et une **production suffisante d'ATP** pour soutenir l'état énergétique.

3.1.2. Organisation et structure du métabolisme mitochondrial

Comme indiqué précédemment, la théorie énoncée par Otto Warburg que la reprogrammation énergétique des cellules cancéreuses proviendrait de dysfonctions mitochondriales, fait aujourd'hui débat. Cependant, bien que des dysfonctions mitochondriales ne suffisent pas à expliquer l'effet Warburg, de nombreux travaux de recherche montrent tout de même une accumulation de modifications mitochondriales dans les cancers¹⁹⁰. Aussi, la découverte de mutations dans les enzymes métaboliques mitochondriales, comme la fumarate hydratase (FH), la succinate déshydrogénase (SDH) ou encore l'isocitrate déshydrogénase 2 (IDH2), suggère le rôle du métabolisme mitochondrial dans la carcinogénèse. En particulier, F. Weinberg et ses collaborateurs ont montré que la génération de ROS par les mitochondries est essentielle à la carcinogénèse induite par Kras¹⁹¹.

a. Les mitochondries

Les mitochondries sont des organites dynamiques cytoplasmiques dont l'origine proviendrait de bactéries¹⁹² et qui représentent en moyenne environ 10% du volume du cytoplasme¹⁹³. Elles sont présentes chez la majorité des organismes eucaryotes¹⁹⁴. Les mitochondries ont une forme ellipsoïdale avec des tailles comprises entre 0.75µm et 3µm de long (grand diamètre) et d'environ 0.5µm de large (petit diamètre). Elles sont formées d'une membrane externe et d'une membrane interne structurée en de nombreux replis appelés crêtes mitochondriales, d'un espace inter membranaire et d'une matrice au centre. Elles contiennent leur propre ADN (ADNmt), double brin et circulaire, et leur propre système de codage¹⁹⁵ (par exemple AGA, qui code pour une arginine dans le code nucléaire, est un codon stop pour la mitochondrie chez l'homme). Cet aspect est un des arguments majeurs pour soutenir l'hypothèse d'une origine exogène à la cellule. Lynn Margulis est l'auteure de cette théorie argumentée en 1966, et actuellement admise, que les mitochondries proviendraient de l'endocytose d'une α -protéobactérie il y a environ 2 milliards d'années dans une cellule eucaryote avec laquelle elle a développé une relation symbiotique (endosymbiose). Le

génom mitochondrial a subi de nombreuses mutations au cours du temps et peut être particulièrement hétérogène entre différentes espèces. La mitochondrie aurait même transféré quelque uns de ses gènes à l'ADN nucléaire au cours du temps. Les mitochondries ont la capacité de croître, de répliquer leur ADN et de se dupliquer (uniquement par fission), ainsi que de fusionner. L'ensemble de ce processus est appelé biogénèse mitochondriale. Il semble que leur croissance soit constante et indépendante du cycle cellulaire chez les mammifères, mais que la réplication de leur ADN et la transcription soit principalement effective en fin de phase S et G2¹⁹³ où les précurseurs d'ADN et d'ARN sont synthétisés. Elles se divisent en deux groupes aléatoires lors d'une mitose et sont transmises à la descendance dans le règne animal par le gamète femelle uniquement¹⁹⁶, les mitochondries apportées par le gamète male étant ubiquitinées pour dégradation ultérieure. Cette dernière caractéristique, ajouté au fait que la fréquence de mutations sur le génome mitochondrial soit uniforme dans le temps (1.665×10^{-8} mutations par nucléotide par an)¹⁹⁷, permet de faire des datations de lignées assez précises et des études de filiation maternelle. Cependant, une certaine hétérogénéité (hétéroplasmie) peut également être observée parmi l'ensemble des mitochondries d'un même organisme, voire à l'échelle du chondriome de la cellule, notamment à un âge avancé où les mutations se sont accumulées.

L'ADNmt est composé d'environ 16kbases, qui code pour 2 ARN ribosomiaux, 22 ARN de transfert, et 13 sous-unités de la chaîne respiratoire (voir figure 20)¹⁹⁸.

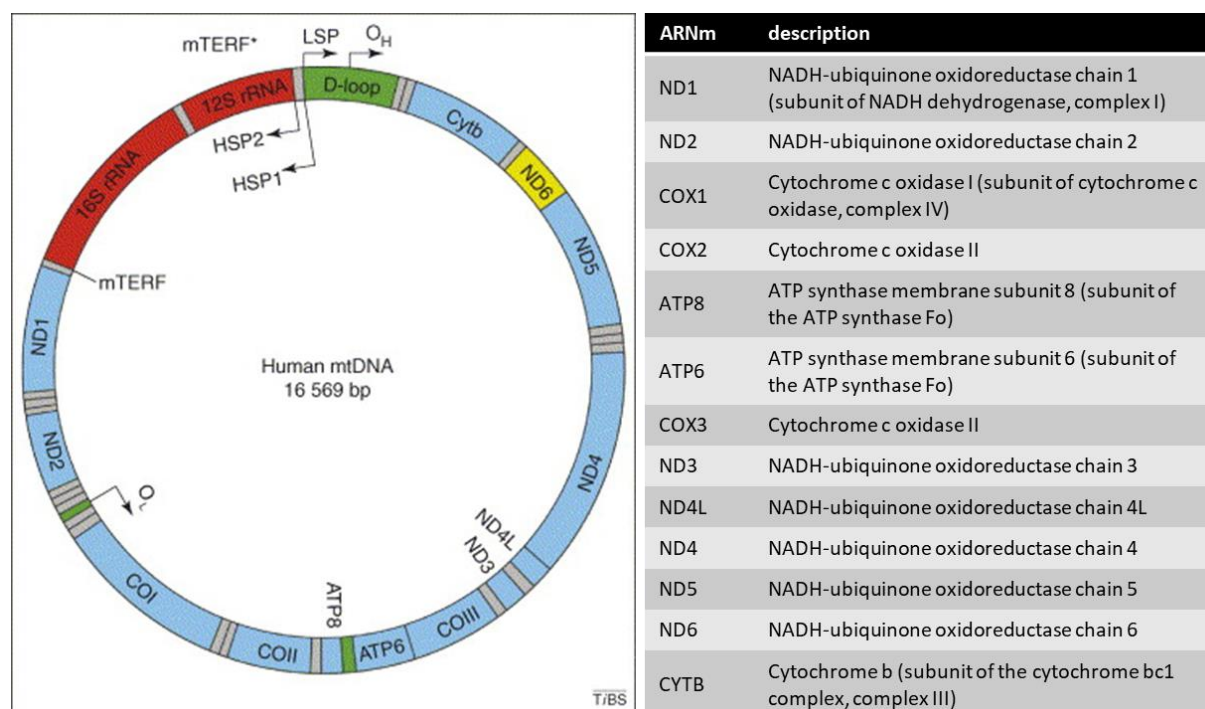


Figure 20 : (à gauche) carte de l'ADNmt humain. Les gènes codant les 13 protéines, 22 ARNt et deux ARNr sont cartographiés ainsi que les sites d'initiation de la transcription : HSP1, HSP2 et LSP. (à droite) liste des gènes mitochondriaux codant pour des protéines de la chaîne respiratoire. Adapté de : J. Asin-Cayuela et C. M. Gustafsson, 2007.

De nombreux autres gènes, codés par l'ADN génomique, sont cependant nécessaires à la formation et au fonctionnement de nouvelles mitochondries qui comprennent environ 1500 protéines différentes¹⁹⁶ (voir figure 21). Ces molécules d'ADNmt sont circulaires chez les mammifères, collées à la membrane interne et compactées en nucléoïdes par des protéines telles que TFAM (Transcription Factor A of Mitochondria)^{199,200} et peuvent être présentes en plusieurs exemplaires par mitochondrie. Ce nombre varie de 1 à 10 en fonction des tissus, selon la demande énergétique. Une cellule peut donc contenir entre 1000 et 100.000 copies d'ADNmt pour seulement 2 copies d'ADNg²⁰¹.

protein complex	mitochondrial coded subunits	nuclear coded subunits
<u><i>oxidative phosphorylation</i></u>		
complex I (NADH dehydrogenase)	7	≈ 38
complex II (succinate CoQ reductase)	0	4
complex III (cytochrome <i>b-c1</i> complex)	1	10
complex IV (cytochrome <i>c</i> oxidase complex)	3	10
complex V (ATP synthase complex)	2	≈ 13
<u><i>protein synthesis apparatus</i></u>		
rRNAs	2	0
tRNAs	22	0
ribosomal proteins	0	≈ 80
<u><i>other mitochondrial proteins</i></u>		
DNA pol, RNA pol, membrane transporters, etc.	0	≈ 1500

Figure 21 : liste récapitulative des éléments nécessaires à la structure et au fonctionnement mitochondrial. Nombre de composants codés par l'ADNmt et par l'ADNg. De : M. Ricchetti, 2018.

La biogénèse mitochondriale

La biogénèse mitochondriale (croissance d'une mitochondrie puis division) est possible grâce à la participation simultanée de l'ADN mitochondrial et de l'ADN génomique. En effet, les constituants des membranes de l'organelle sont codés uniquement par l'ADN génomique tandis que la création des complexes protéiques pour l'oxydation phosphorylante est rendue possible par la participation simultanée de l'ADNmt et de l'ADN génomique²⁰². La création d'une nouvelle mitochondrie comporte plusieurs étapes : la transcription des gènes de structure et de fonction mitochondriale, la réplication de l'ADNmt, et enfin la fission mitochondriale en deux nouvelles mitochondries.

Comme indiqué précédemment, une mitochondrie contient environ 1500 protéines différentes, dont 13 seulement codées par l'ADNmt. La participation de la transcription des gènes nucléaires est donc essentielle. La biogénèse mitochondriale est principalement régulée dans le compartiment nucléaire par le facteur de transcription PGC1α sous le contrôle de AMPK et Sirt1¹⁹⁸ et sa liaison avec des facteurs spécifiques tels que NRF1, NRF2 et ERR (voir figure 22) qui vont activer la transcription de gènes en particulier.

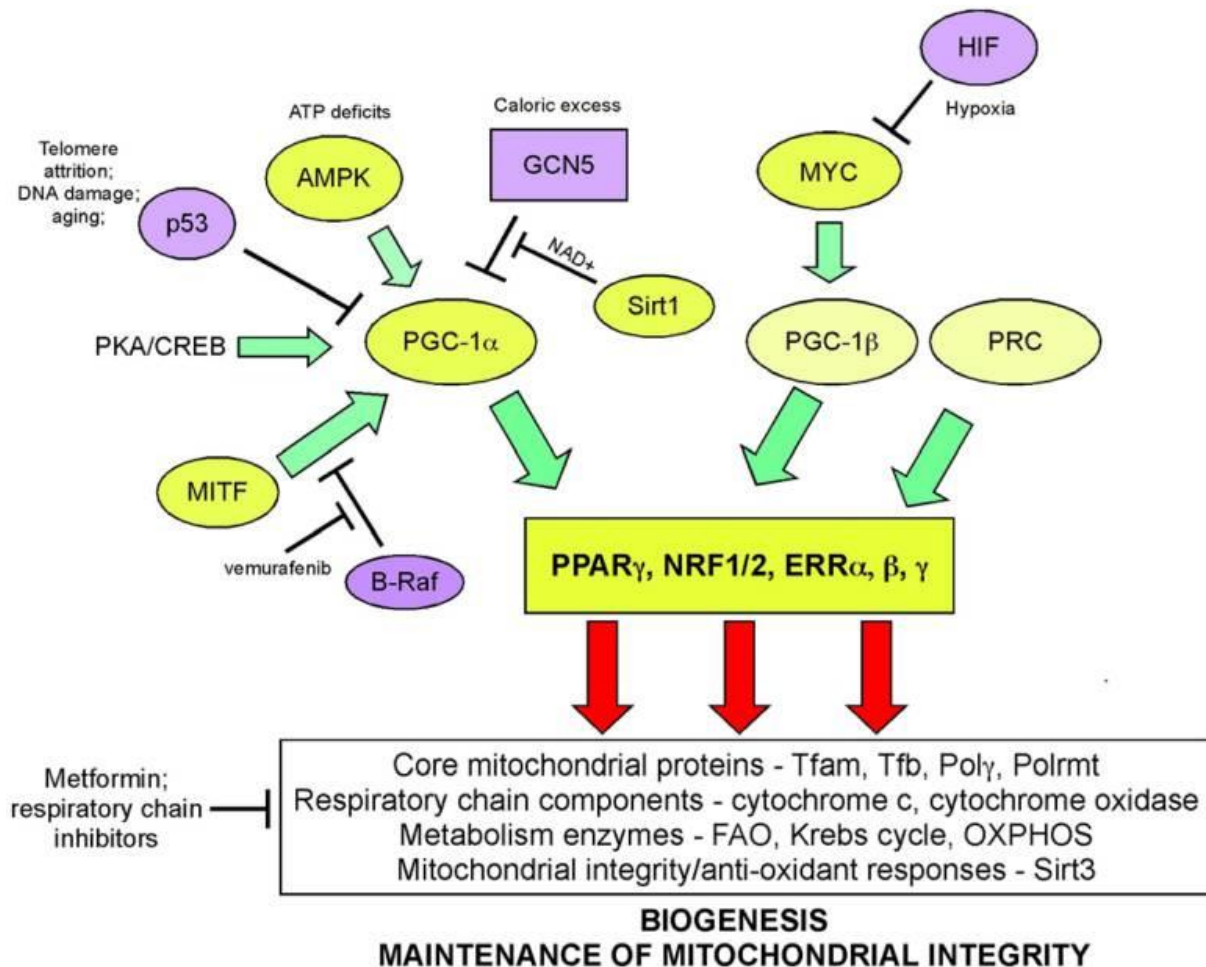


Figure 22 : voies de régulation de la biogénèse mitochondriale et du maintien de son intégrité. De : L. Boland et coll. 2013.

L'ADNmt ne contient pas d'intron, et les zones codantes sont contiguës. La seule séquence longue non codante correspond au point de départ de la réplication. Les deux brins de l'ADNmt sont nommés brin lourd (HS, heavy strand) et brin léger (LS, light strand). La transcription du brin lourd est initiée soit au niveau de HSP1 et aboutit à la transcription des deux ARNr, soit au niveau de HSP2 et aboutit à la formation d'un ARN polycistronique contenant les deux ARNr et 12 ARNm sur les 13 que contient le génome mitochondrial (sauf ND6). Les ARNm sont séparés par les ARNt qui permettent la maturation des transcrits une fois excisés. Ce mode de maturation est appelé modèle de ponctuation par ARN de transfert. La transcription du brin léger est initiée au niveau de LSP et permet la transcription de ND6

ainsi que la production d'amorces pour la réplication²⁰³. La transcription des gènes mitochondriaux est donc synchronisée et équimolaire.

La transcription des gènes mitochondriaux est rendue possible grâce à l'interaction de POLRMT (l'ARN polymérase), TFAM (le facteur de transcription A qui compacte l'ADNmt en nucléoïdes) et TFB1M ou TFB2M (deux autres facteurs de transcription B)²⁰³. Le mécanisme d'initiation de la transcription mitochondriale est peu connu, cependant il semblerait que ce soit TFAM qui se lie en premier au promoteur et qui permette le recrutement de TFB2M/POLRMT²⁰⁴.

La réplication de l'ADNmt

L'ADNmt possède un mécanisme de réplication distinct de celui de l'ADN nucléaire et dirigé par un complexe protéique différent. Une polymérase spécifique assure la réplication du brin d'ADNmt : POLG (polymérase gamma, composée d'une sous unité A et de deux sous-unités B) et progresse au sein d'un ensemble protéique appelé réplisome mitochondrial composé d'une hélicase de réplication Twinkle¹⁹⁸, d'une protéine se liant à l'ADNmt simple brin mtSSB (mitochondrial single-stranded DNA binding protein), de POLRMT qui sert de primase²⁰⁵ et d'un facteur de terminaison de transcription mTERF²⁰⁶. POLRMT permet d'initier la réplication en synthétisant un ARN amorce d'environ 100 nucléotides ; en parallèle, il initie la transcription d'un brin long qui forme une structure stable avec l'ADNmt, appelé D-loop, essentiel à la progression de la réplication²⁰⁵. Il est admis que la réplication des deux brins d'ADNmt est asynchronisée, mais le mécanisme précis fait cependant débat. Plusieurs modèles sont actuellement à l'étude (voir figure 23). D'après le premier modèle, la protéine mtSSB se lie à l'ADN simple brin du brin non parental afin d'éviter son repliement tant que la réplication n'est pas terminée et protège des attaques nucléophiles²⁰⁵. D'après le second modèle, des morceaux d'ARN complémentaires au brin non parental se lient à celui-ci, afin de protéger le brin des dommages le temps que la réplication de ce brin commence, et seraient ensuite détruits pour laisser place à la réplication. La réplication de l'ADNmt est bien plus lente que celle de l'ADN nucléaire, avec seulement deux origines de réplication asynchronisées : la vitesse de réplication de l'ADNmt est de seulement 3 à 4,5 paires de base par seconde (soit 60 à 90 min pour répliquer le génome mitochondrial) contre 33 bases par seconde par fourche (plusieurs origines en simultané) pour l'ADN nucléaire (soit environ 1heure pour répliquer l'ensemble du génome de 3,4 milliards de paires de bases)²⁰⁷.

L'expression de TFAM est positivement corrélée au nombre de copies d'ADNmt, ce qui démontre son rôle essentiel dans le maintien de l'ADNmt. Cependant, une augmentation de l'expression de TFAM n'est pas forcément corrélée à une augmentation de la masse mitochondriale ou de sa capacité énergétique²⁰⁸. La réplication mitochondriale étant fortement dépendante de la transcription, le rôle de TFAM dans la réplication peut s'expliquer de façon indirecte par son implication dans la transcription.

Lors de la fission qui donnera deux nouvelles mitochondries, les nucléoïdes sont repartis le long de la mitochondrie afin que chaque nouvelle organelle hérite d'une ou plusieurs copies d'ADNmt²⁰⁶.

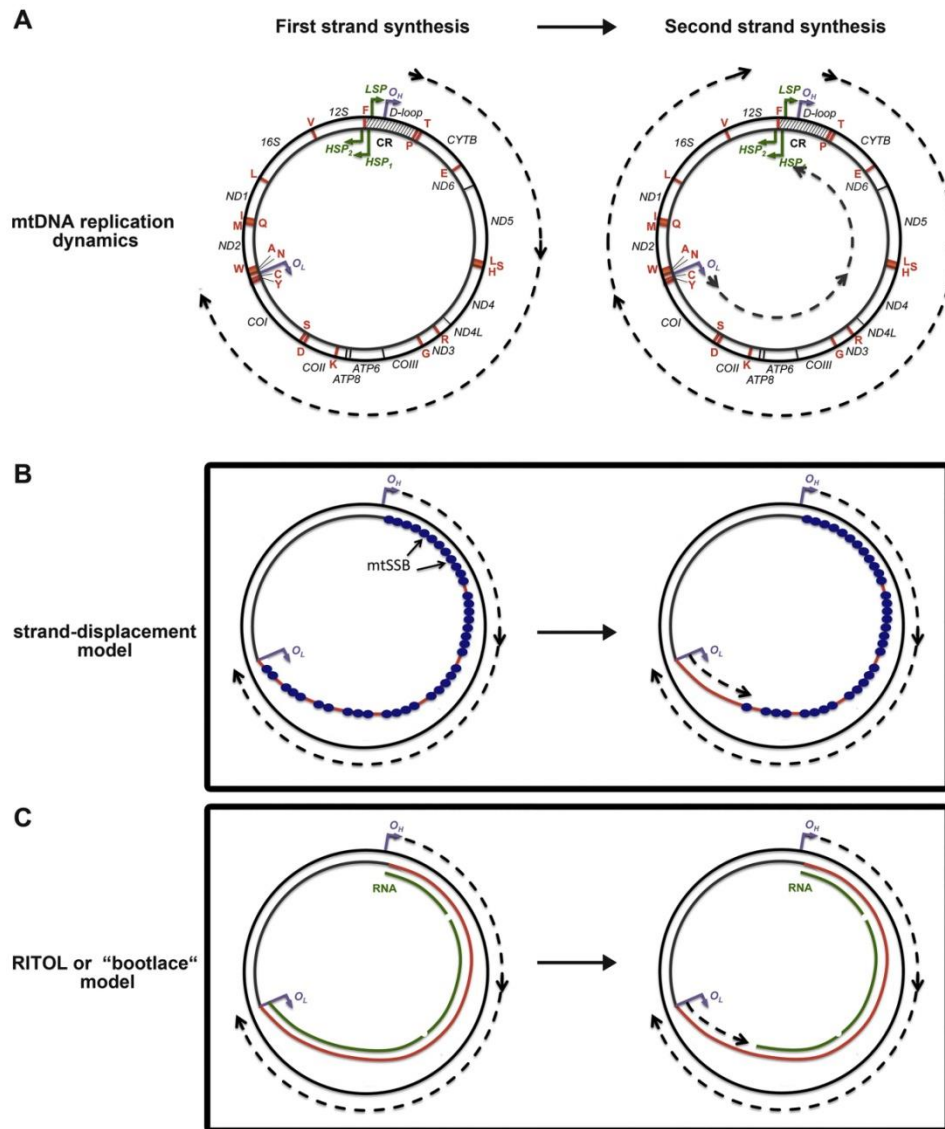


Figure 23 : Modèles de réplication de l'ADNmt. A : processus général de réplication. B : mécanisme de réplication selon le premier modèle « strand-displacement ». C : mécanisme de réplication selon le second modèle « bootlace ». Adapté de : M. Ricchetti, 2018.

b.L'oxydation phosphorylante

Les mitochondries ont de nombreuses fonctions dans les cellules, telles que la synthèse d'acides gras et de précurseurs d'acides aminés, le déclenchement de la mort cellulaire programmée, l'homéostasie cellulaire du calcium, la génération de ROS, l'activation du réticulum endoplasmique¹⁹⁶ et la production d'énergie. Les fonctions mitochondriales utiles à l'introduction de mon travail de thèse seront détaillées au fur et à mesure des paragraphes, cette partie étant consacrée à la présentation de l'oxydation phosphorylante (OxPhos).

L'OxPhos a lieu dans la membrane interne mitochondriale, au niveau des quatre complexes protéiques qui permettent le transfert des électrons et la consommation de l'oxygène couplée à la régénération d'ADP en ATP par le complexe V. C'est un processus de transfert d'électron qui démarre aux complexes I et II par le don d'électrons par NADH

(complexe I) ou FADH_2 (au complexe II) et qui se termine par la réduction de dioxygène en eau. Des transporteurs d'électrons mobiles (coenzyme Q ou cytochrome c) apportent les électrons d'un complexe à l'autre afin de permettre une série de réactions d'oxydation, ce qui libère des protons H^+ dans l'espace inter membranaire. Ces protons forment un gradient entre la matrice et l'espace inter membranaire mitochondrial et créent ainsi une force qui engendre un flux de protons au travers de l'ATP synthase afin de rétablir l'homéostasie. Cette action permet l'activation de l'ATP synthase et ainsi la phosphorylation d'ADP en ATP (voir figure 24). Les complexes de la chaîne respiratoire sont les suivants :

I : Le complexe I est appelé NADH déshydrogénase. Il est composé de 46 sous unités pour un total de 850kDa.

II : Le complexe II, appelé succinate déshydrogénase, est entièrement codé par le génome nucléaire et est le seul à ne pas fournir de protons dans l'espace inter membranaire. Il est composé de 4 sous unités seulement pour un total de 140kDa.

III : Le complexe III, ou coenzymeQ-cytochrome c réductase, est composé de 11 sous unités pour un total de 250kDa.

IV : Le complexe IV, ou cytochrome c réductase, est composé de 13 sous unités pour un total de 160kDa

V : Le complexe V, appelé aussi FOF1-ATP Synthase, est composé de 8 sous unités notées a, b, c, α (3 fois), β (3 fois), γ , δ , et ϵ qui constituent le « stator » et le « rotor » dont la rotation transfère l'énergie du flux de proton à la synthèse de l'ATP. Le complexe V n'est pas directement impliqué dans la chaîne de transfert des électrons.

Bien que représentés individuellement, les complexes I, III et IV peuvent former des super complexes appelés respirasomes. Le complexe II ne fait pas partie de ces super complexes mais fait le lien avec le cycle de Krebs¹⁹⁶. Les respirasomes ont été mis en évidence pour la première fois par H. Schägger & K. Pfeiffer en 2000²⁰⁹ grâce à la technologie d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide bleu natif (BN-PAGE) qui permet de séparer les complexes multi-protéiques dans une conformation native. Ils ont observé que le complexe IV est souvent associé au complexe III, et que le complexe I est systématiquement associé à une ou plusieurs copies des complexes III et IV. Plus tard, S. Cogliati et ses collaborateurs ont démontré que le long isoforme de SCAF1 (supercomplex assembly factor 1) était responsable de l'association du complexe III avec le complexe IV²¹⁰. L'organisation des complexes de la chaîne respiratoire est hétérogène au sein d'une mitochondrie. Les complexes sont retrouvés individuellement et sous forme de supercomplexes dont la composition peut varier. En revanche, le complexe I semble instable sous sa forme libre et plusieurs études montrent qu'il est donc essentiellement retrouvé sous forme de supercomplexes²¹¹. L'avantage de ces respirasomes est que le transfert d'électrons est facilité, et la production de ROS diminuée, permettant ainsi une respiration plus efficace.

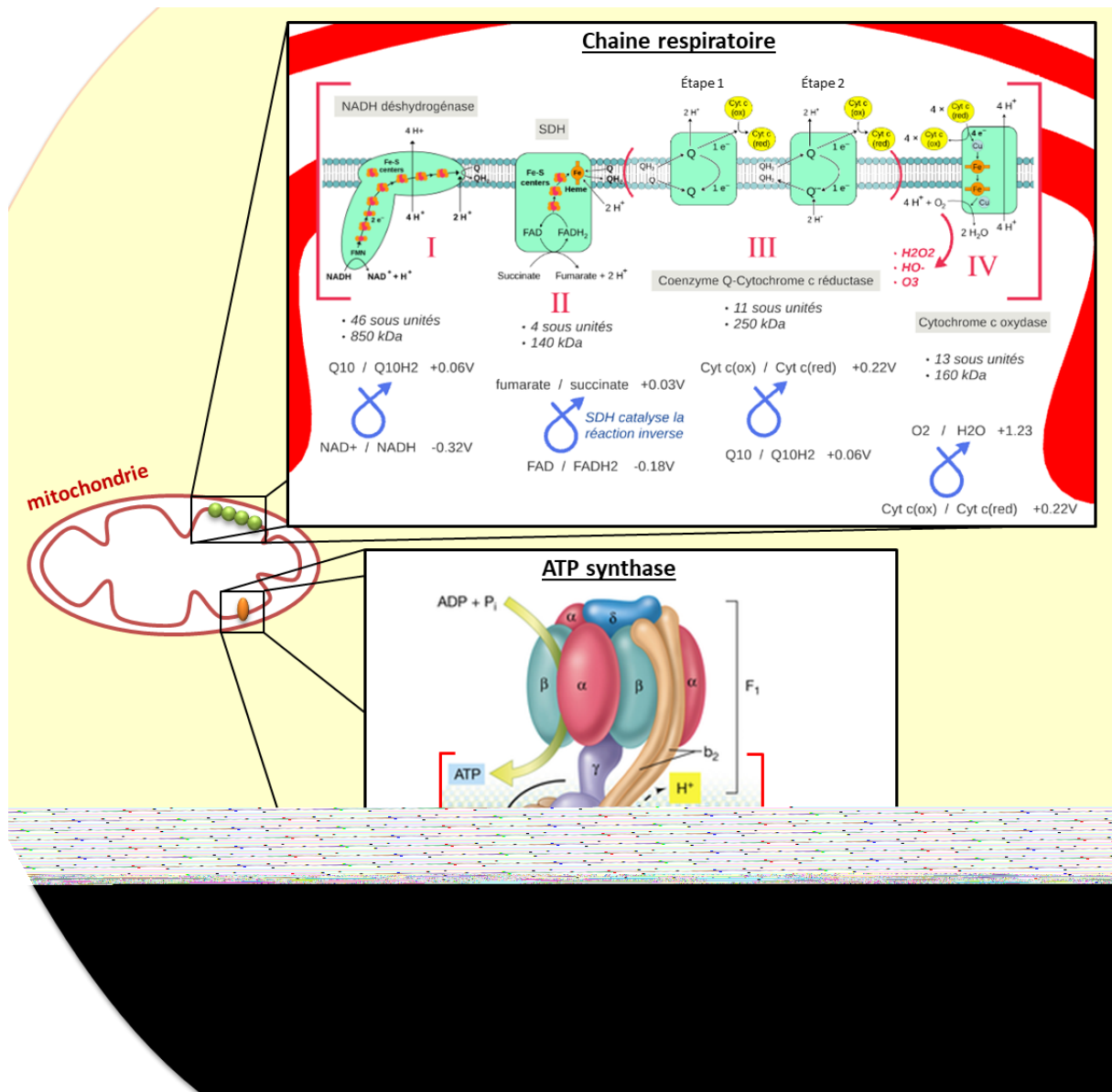


Figure 24 : Schéma mécanistique de la chaîne respiratoire mitochondriale. (en haut) les complexes I à IV sont représentés en vert et les réactions d'oxydoréduction sont détaillées dans chaque complexe. (en bas) l'ATP synthase est représentée de façon schématisée avec la partie F_0 ancrée dans la membrane interne mitochondriale et la partie F_1 dans la matrice. Adapté de : « *Biology 441 journal club* » www.biology441.wordpress.com

c. Les modifications mitochondriales dans les cancers

Mutations des gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales

Etant donné que la majorité des protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire, des mutations sur ces gènes nucléaires peuvent engendrer des modifications de la fonction mitochondriale. En effet, les mutations sur les gènes nucléaires SDH et FH provoquent une accumulation des oncométabolites succinate et fumarate intra-mitochondriaux, qui inhibent les prolyl hydroxylases (PHDs)^{212,213}. Ces enzymes sont

responsables de la dégradation μ (š μ $\mathbb{E}$]v μ š] o o – Z $\mathbb{C}$ présence $\dot{\imath}$ r ~, / & [} $\mathbb{E}$ $\mathbb{C}$ $\mathbb{P}$ Lev W, • • }v š • Z $\mathbb{C}$ $\mathbb{E}$ } $\mathbb{E}$ $\mathbb{C}$ o • • U % v v š • - } $\mathbb{E}$ $\mathbb{C}$ $\mathbb{P}$ v š } $\mathbb{P}$ o μ š $\mathbb{E}$ š v • μ]v š U v u! u š u % • < μ [o o • Z $\mathbb{C}$ $\mathbb{E}$ } $\mathbb{E}$ $\mathbb{C}$ $\mathbb{P}$ v reconnu par VHL3 (Von Hippel-Lindau E3 Ubiquitin Ligase) et est ubiquitylé puis dégradé par le protéasome. / & $\dot{\imath}$ v [• š }v v } $\mathbb{E}$ u o u v š • š] o] • < μ [v }v] š } v • u o $\mathbb{E}$] š < μ [μ v μ u μ o š } } v •]v š $\mathbb{E}$ u] } $\mathbb{E}$ v •] μ μ [$\mathbb{C}$ v o accumulation de ROS déclenche, par un mécanisme encore discuté, une réponse semblée appelée «pseudohypoxie»²¹⁴. Par conséquent, même en présence de niveaux normaux d'oxygène U, / & $\dot{\imath}$ r • š š] $\mathbb{A}$ u v] $\mathbb{E}$ i p a r t i c i p e à l a c a r c i n o g e n e s e . O r , l a c a r c i n o g e n e s e d é p e n d , e n t r e a u t r e s , d e l a c a p a c i t é d e s c e l l u l e s c a n c é r e u s e s à m o d u l e r l e u r u š } o] • u v $\mathbb{E}$ $\mathbb{P}$ š] < μ $\mathbb{A}$ $\mathbb{E}$ • o $\mathbb{P}$ o $\mathbb{C}$ } a n g i o g e n e s e . P a r e x e m p l e]v μ] $\mathbb{E}$ certaines tumeurs mutées sur VHL présentent une activité HIF élevée même en condition normoxique, et ceci est associé à un mauvais pronostic pour le patient^{215,216}.

Aussi, o [v • u o • % $\mathbb{E}$] š] v • $\mathbb{E}$ • % } v • o • a r a t i o n d u $\mathbb{E}$ % o] : g é n o m e m i t o c h o n d r i a l e s t c o d é p a r l e g é n o m e n u c l é a i r e . D e s m u t a t i o n s s u r c e s g è n e s o n t p v $\mathbb{E}$ o u v š % } μ $\mathbb{E}$ } v • < μ v • μ v % $\mathbb{E}$ š [] v (} $\mathbb{E}$ u š } } v $\mathbb{P}$ v } u f o r m e d e m u t a t i o n s p o n c t u e l l e s d e % $\mathbb{E}$ š o $\mathbb{E}$ $\mathbb{P}$ • ($\mathbb{E}$ $\mathbb{P}$ u v š • [$\mathbb{E}$ u š % } u] š } Z } v $\mathbb{E}$] o } μ v } $\mathbb{E}$ (μ] š u } o μ o p e l é d e p l é t i o n • [$\mathbb{E}$ u m i t o c h o n d r i a l e . E n p a r t i c u l i e r , c e s m u t a t i o n s s u r l e s g è n e s n u c l é a i r e s c o d a n t p o u r l e r é p l i s o m e m i t o c h o n d r i a l , t e l s q u e W i n k l e ^{217,218} o u P o C ^{219,220} o u d e s e n z y m e s d e m é t a b o l i s a t i o n d e s n u c l é o t i d e s c o m m e l a t h y m i d i n e k i n a s e (T K 2) , s o n t u n e c a u s e m a j e u r e [$\mathbb{E}$ $\mathbb{E}$ b a r r e s (m i t o c h o n d r i a l e s š [μ u μ o š } } v • [$\mathbb{E}$ $\mathbb{E}$ μ $\mathbb{E}$ • < μ] u v % $\mathbb{E}$ μ v % $\mathbb{E}$ š [] v (} $\mathbb{E}$ u š } } v $\mathbb{P}$ v } u . A u s s i , u n d é f a u t i n v e n t a i r e X o u d e • $\mathbb{P}$ $\mathbb{E}$ $\mathbb{P}$ š } } v d ũ à u n e m u t a t i o n d u g è n e T F A M , p a r e x e m p l e , p e u t a m e n e r à u n e f μ] š [$\mathbb{E}$ u š v • o . $\mathbb{C}$ š } % o • u

Enfin, E4F1, un facteur de transcription nucléaire qui régule un ensemble de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire, semble également contrôler des gènes impliqués dans les fonctions mitochondriales. En effet, le knock down de E4F1 dans des cellules murines fibroblastiques embryonnaires provoque un stress énergétique caractérisé par l'altération du rapport AMP/ATP et l'activation } v • μ š] $\mathbb{A}$ o n e d e m e t a b o l i s a t i o n d e l a c o n s o m m a t i o n d ' o x y g è n e , u n e s u r p r o d u c t i o n d e R O S] v •] < μ a l t é r a t i o n d e l a s y n t h è s e d e n o u v e a u x p y r i m i d i n e s v i a l a D H O D H ²²². Or, un déséquilibre d pool de v μ o } š] • % μ š $\mathbb{P}$ o u v š ! š $\mathbb{E}$ • } μ $\mathbb{E}$ e r t e d e f o n c t i o n d e T K 2 , d G K ((š U μ (d é o x y g u a n o s i n e k i n a s e) e t S C S (A d p m i n g S u c c i n y l C o A S y n t h a s e) p r o v o q u e u n • < μ] o] $\mathbb{E}$ μ % } } o v μ o } š] • < μ] (²⁰¹. E n p a r t i c u l i e r , š i Z • [• u o $\mathbb{E}$] š < μ [μ v (μ š d d W • } } š o] u] š v š % } μ $\mathbb{E}$ o • $\mathbb{C}$ v š Z d é p l é t i o n s m i t o c h o n d r i a l e s ²⁰¹.

Mutations des gènes mitochondriaux

W $\mathbb{E}$ u] o • u μ š š } } v • $\mathbb{E}$ š $\mathbb{E}$ } μ $\mathbb{A}$ • v • o [$\mathbb{E}$ u š • o o μ o mutations se trouvent dans les régions codant des protéines ou des ARN. Parmi seulement 33% [Z š $\mathbb{E}$ } % d a n s c e s r é g i o n s d a n s l e s c e l l u l e s n o r m a l e s ²²³] u } v š $\mathbb{E}$ < μ [μ v

SOD neutralise O_2^- en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), beaucoup moins réactif, qui est ensuite pris en charge par le glutathion (GSH). En dehors de l'effet directement toxique des ROS sur l'ADN, ces molécules très réactives ont des rôles de messagers au sein d'une cellule et influencent plusieurs aspects de l'homéostasie cellulaire. À de faibles niveaux de concentration, les ROS augmentent la prolifération et la survie des cellules grâce à la modification post-traductionnelle des phosphatases et des kinases²³⁰. D'une part, les protéines tyrosine phosphatases peuvent être oxydées sur les cystéines de leur site actif par H_2O_2 de façon réversible. L'inhibition ainsi exercée par les ROS sur les tyrosine phosphatases aide donc les kinases à propager leurs signaux médiés par la phosphorylation des tyrosines²³¹. D'autre part, les ROS régulent la phosphorylation des tyrosines des kinases par oxydation spécifique des groupes SH cystéine, induisant ainsi un changement conformationnel nécessaire à leur activation. En effet, il a été démontré que H_2O_2 agit comme médiateur de l'activation de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) dans les cellules HeLa²³².

Le stress répliatif mitochondrial

L'ADNmt, du fait de sa proximité avec la chaîne respiratoire, est particulièrement affecté par la production de ROS, et donc susceptible de présenter de nombreuses cassures. De plus, la réplication de l'ADNmt n'est pas synchronisée sur le cycle cellulaire, et peut avoir lieu en dehors de la phase S, où les nucléotides libres sont moins nombreux et l'environnement RedOx plus oxydant²³³. En effet, plusieurs enzymes associées au métabolisme des nucléotides sont cytoplasmiques et liées au cycle cellulaire, dont CAD (carbamoyl-phosphate synthétase 2, aspartate transcarbamylase, et dihydroorotase) relocalisée au noyau en phase S ou la RNR (ribonucléotide réductase) surexprimée en S pour assurer la production des précurseurs nécessaires à la réplication de l'ADN nucléaire. En outre, la quantité de dNTP est trois à quatre fois plus importante en phase S qu'en G1²³⁴. En particulier, la RNR est essentielle car elle permet la réduction de ribonucléotides en désoxyribonucléotides. Elle régule le pool de précurseurs d'ARN vs d'ADN, et son invalidation a été associée à une déplétion d'ADNmt²³⁵.

En outre, la présence de ROS, le manque de nucléotides ou encore des erreurs de polymérase peuvent conduire à la présence de cassures simple brin de l'ADNmt. Le système de réparation majeur de l'ADNmt est la réparation par excision de base (BER) qui repère et répare les cassures simple brin et les dommages oxydatifs tels que les 8-oxo-G²³⁶. La présence de dommages plus graves menant à des cassures double brin de l'ADNmt est en revanche plus difficile à réparer. En effet, une cassure double brin de l'ADNmt mène à sa linéarisation, ce qui rend sa prise en charge plus difficile. Aussi, au contraire de l'ADN génomique qui compte une copie à proximité sur laquelle peuvent s'appuyer les systèmes de réparation par recombinaison homologue, l'ADNmt n'est généralement présent qu'en une copie par nucléoïde (1,4 copies en moyenne)²³⁷, ce qui limite ce genre de système de réparation. Cependant, certaines études montrent que RAD51 et XRCC3 seraient également localisés au niveau des nucléoïdes et recrutés en particulier lors d'un stress répliatif²³⁸ ou pour répondre à une demande importante en ADNmt, par exemple lors d'une rapide division cellulaire²³⁹. Le

recrutement de RAD51 après des dommages de type oxydatif montre donc également son engagement dans des processus de réparation de type recombinaison homologue dans la mitochondrie²³⁹. De plus, des études récentes ont mis en évidence une deuxième polymérase, PrimPol, qui serait susceptible de faire redémarrer la réplication lors d'une réponse de dommage à l'ADNmt²⁴⁰. Cependant, les mécanismes de réparation de l'ADNmt sont moins performants que ceux présents pour l'ADN génomique, et sont donc susceptibles de faire de nombreuses erreurs, menant soit à des mutations ponctuelles fréquentes et des délétions (ceci explique l'hétéroplasmie du chondriome retrouvée dans une même cellule) soit à des déplétions importantes de l'ADNmt, susceptibles de provoquer de nombreuses pathologies.

Problèmes de dynamique mitochondriale

Les mitochondries sont des organelles dynamiques en constant renouvellement. La fusion et la fission mitochondriales sont les deux principaux processus qui permettent le maintien de l'activité mitochondriale. Une sorte de contrôle qualité permanent permet d'équilibrer les fusions et les fissions mitochondriales afin de restaurer ou de détruire les mitochondries qui le nécessitent et ainsi maintenir un apport suffisant en énergie à la cellule hôte²⁴¹ (voir figure 26).

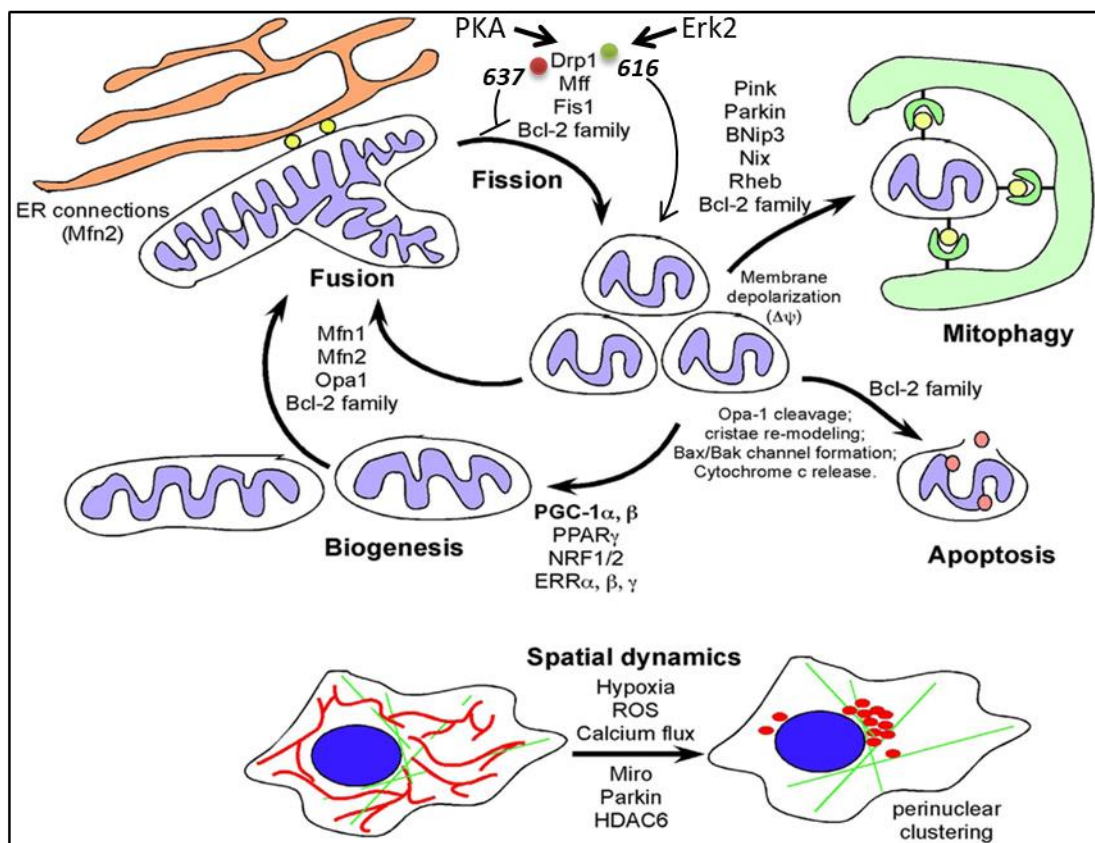


Figure 26 : Schéma représentatif de la dynamique mitochondriale et des principales protéines actrices du remodelage des réseaux mitochondriaux. Adapté de : L. Boland et coll. 2013.

La fusion d'une mitochondrie fonctionnelle avec une mitochondrie qui présente une défaillance permet le maintien de son activité tandis que la fission permet soit d'augmenter la capacité respiratoire du chondriome en augmentant le nombre de mitochondries actives, soit de permettre le recyclage d'une mitochondrie défaillante par autophagie (appelée mitophagie)²⁴².

La fusion de deux mitochondries est un processus complexe qui comprend la fusion des deux membranes internes et la fusion des deux membranes externes. Les protéines principales impliquées dans ce phénomène sont des GTPases appelées mitofusine 1 (MFN1), mitofusine 2 (MFN2) localisées à la membrane externe et Optic atrophy 1 (OPA1) localisé à la fois dans l'espace inter membranaire et inséré dans la membrane interne²⁴³. Il existe plusieurs isoformes (des formes courtes et des formes longues) de la protéine OPA1 qui ont des localisations et des propriétés différentes. La forme longue (L-OPA1) est ancrée dans la membrane interne de la mitochondrie, tandis que la forme courte (S-OPA1) est soluble dans l'espace inter membranaire. S-OPA1 est obtenue par clivage de la forme longue par deux peptidases, OMA1 et la protéase i-AAA YME1L, tandis que la prohibitine PhB2 stabilise OPA1²⁴⁴. La fusion mitochondriale n'est effective que lorsque les deux formes sont présentes. Lorsqu'OPA1 n'est présente que sous la forme courte, on observe une fragmentation importante des mitochondries qui conduit à la mort cellulaire. L-OPA1 et S-OPA1 interagissent en oligocomplexes et permettent également la création des crêtes mitochondriales²⁴⁵.

La fusion mitochondriale est équilibrée par un phénomène de fission⁶⁰, également finement régulé. Ce processus est contrôlé par la protéine Drp1²⁴⁶ dont l'action est antagoniste aux protéines de fusion. La phosphorylation de Drp1 sur la serine 616 induit la délocalisation de Drp1 vers la membrane externe de la mitochondrie afin d'être recrutée sur les futurs sites de fission^{247,248}. Ces sites semblent pouvoir être marqués par le réticulum endoplasmique, dont les tubules viennent en contact du réseau mitochondrial²⁴⁹. Ce phénomène, pourtant peu compris, porte le nom de ERMD (ER-associated mitochondrial division)¹⁹⁸. La protéine Mff, contenue dans la membrane externe mitochondriale, est le principal recruteur de Drp1. Plusieurs protéines Drp1 s'enroulent sur ces sites, permettant ainsi l'interaction entre leurs sites GTPases qui catalysent l'hydrolyse de GTP, ce qui provoque des changements conformationnels afin de resserrer la mitochondrie et de forcer sa scission²⁴⁶. La phosphorylation de Drp1 en S616 induit donc la fission mitochondriale tandis qu'une phosphorylation en S637 inhibe la fission mitochondriale. Aussi, il semblerait que des membres protéiques de la superfamille de Bcl-2, normalement impliqués dans le processus d'apoptose, interagissent avec Drp1 pour favoriser la fission mitochondriale¹⁹⁰.

La mitophagie est un processus qui permet à la cellule d'éliminer des mitochondries défaillantes, ou contenant un ADN avec des mutations délétères et de renouveler son pool de mitochondries²⁵⁰. C'est un mécanisme essentiel dans la régulation du pool de mitochondries qui permet de rétablir la balance fusion/fission. Une mitochondrie défaillante dépolarisée est marquée par le facteur PINK1, qui s'accumule sur la membrane externe. En condition normale, ce facteur est transporté dans la mitochondrie, où il est dégradé. L'accumulation de PINK1 sur la surface externe mitochondriale provoque le recrutement de Parkin, une E3-ubiquitine ligase soluble cytosolique, qui ubiquitine la protéine Miro²⁵¹, située dans la membrane externe

mitochondriale. Miro est une protéine essentielle à l'attachement des mitochondries aux microtubules pour assurer leur mobilité. En effet, les mitochondries peuvent migrer le long des microtubules afin de se relocaliser dans les zones les plus gourmandes en énergie ou de se rapprocher d'autres mitochondries pour fusionner. Le transport antérograde des mitochondries est possible grâce à l'action des kinésines, tandis que le transport rétrograde est organisé par des dynéines¹⁹⁶. Les mitochondries peuvent également être ancrées dans le cytosol par leur liaison avec l'actine grâce à ANC-1²⁵². Ainsi, la dégradation de Miro induit un détachement des mitochondries, ce qui conduit à leur dégradation par mitophagie. Parkin ubiquitine également MFN1/2 et VDAC1, entraînant ainsi leur dégradation par le protéasome. Ces mitochondries ne peuvent donc plus fusionner et se dépolarisent puis sont enveloppées dans un autophagosome qui se charge de leur dégradation²⁵⁰.

Ainsi, les mitochondries permettent aux cellules de résister à d'importants stress i) en fusionnant pour compléter leurs activités, ii) en fissionnant pour créer de nouvelles mitochondries et permettre la division cellulaire, iii) en fragmentant les mitochondries défaillantes pour les recycler et enfin iv) en fragmentant pour accélérer le phénomène de mort cellulaire par apoptose²⁴¹. La dynamique mitochondriale est donc essentielle au bon fonctionnement mitochondrial (et cellulaire par extension).

La dynamique mitochondriale est fréquemment dérégulée dans les cancers, mais cet aspect est en général une conséquence de modifications fonctionnelles des mitochondries. Un dysfonctionnement mitochondrial peut être défini comme une perte du potentiel de membrane, une respiration défectueuse, une production élevée de ROS, une production réduite d'ATP ou de NADH, un changement d'activité des kinases mitochondriales ou d'autres enzymes dépendant de l'état RedOx, un déséquilibre des métabolites, une fuite de calcium ou encore le déclenchement de l'UPRmt (unfolded protein response), autant de phénomènes qui modifient la structure et le fonctionnement normal d'une mitochondrie. Cependant, dans le cadre du cancer, les dysfonctionnements mitochondriaux ne sont pas nécessairement délétères pour la cellule cancéreuse, qui au contraire s'est adaptée et croît exponentiellement. Il est important de noter que les cellules cancéreuses possèdent une certaine plasticité de leur métabolisme mitochondrial, qui peut subir des modifications majeures et adapter ses flux métaboliques en conséquence.

Parmi les problèmes de dynamique mitochondriale menant à la carcinogénèse, on note par exemple une surexpression des membres de la famille Bcl-2 dans certains cancers, ce qui favoriserait la fission mitochondriale, limitant ainsi l'OxPhos¹⁹⁰. D'autres travaux ont démontré que *PGC-1α* est réprimé transcriptionnellement par p53, ce qui pourrait expliquer la reprogrammation énergétique mitochondrial et l'élévation des ROS dans les cancers lorsque p53 est muté. E. Sahin et ses collaborateurs ont notamment montré que des tumeurs ALT (alternative lengthening of telomeres) présentent une production accrue de ROS, peut-être en raison de l'inhibition transcriptionnelle de *PGC-1α* par p53²⁵³. Récemment, M. Yu et ses collaborateurs rapportent que les cellules cancéreuses pancréatiques présentent des mitochondries anormalement fragmentées. En stimulant le processus de fusion mitochondriale de ces cellules, par inhibition de Drp1 ou par surexpression de MFN2, les auteurs arrivent à normaliser les mitochondries fragmentées et ainsi réduire l'OxPhos de ces

cellules. Ceci a pour conséquence dans leur modèle de réduire la croissance tumorale *in vivo* et d'améliorer la survie des souris traitées²⁵⁴. Pour répondre à la forte consommation en glucose de la cellule, les mitochondries adoptent un profil très fragmenté et hyper polarisé pour augmenter leur capacité oxydative. Ce phénomène s'accompagne néanmoins d'une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène par la chaîne respiratoire mais est réversible en une heure²⁵⁵, ce qui souligne encore une fois la plasticité mitochondriale. Aussi, l'administration orale de Leflunomide, un médicament utilisé contre l'arthrite, reproduit les résultats de surexpression de MFN2 et permet d'améliorer la survie médiane des souris de 50%. Le mécanisme reliant l'utilisation de Leflunomide à la fusion mitochondriale avait déjà été étudié par L. Miret-Casals et ses collaborateurs. En effet, la fusion mitochondriale est un mécanisme de défense contre le stress²⁵⁶. M. Yu et ses collaborateurs montrent également que l'augmentation de la fusion mitochondriale est accompagnée par l'augmentation de la mitophagie, et que ce mécanisme serait à l'origine de la perte de masse mitochondriale et la diminution d'ATP²⁵⁴. Ces travaux sont complémentaires à ceux de M. N. Serasinghe et ses collaborateurs qui montrent que les cancers présentant la mutation *KRAS*^{G12V} nécessitent une augmentation de l'expression de Drp1 pour la carcinogénèse. La perte de Drp1 prévient les modifications structurelles et fonctionnelles mitochondriales induite par *KRAS*^{G12V} et rend les cellules résistantes à la transformation oncogénique²⁵⁷.

Les mitochondries sont des organites cytoplasmiques qui représentent environ 10% du volume cellulaire. Elles contiennent leur propre ADN (noté **ADNmt**) et entretiennent une relation symbiotique avec la cellule. En effet elles sont responsables d'un ensemble de fonctions, telles que la synthèse d'acides gras, le déclenchement de la mort cellulaire programmée, l'homéostasie cellulaire du calcium, la génération d'espèces réactives de l'oxygène, l'activation du réticulum endoplasmique et la production d'énergie, **essentiels au bon fonctionnement cellulaire**. En particulier, elles abritent les complexes de la chaîne respiratoire et sont **responsables de la production de la majeure partie de l'ATP cellulaire**. Les mitochondries se **répliquent** grâce à plusieurs étapes : la transcription des gènes de structure et de fonction mitochondriale (localisés en partie sur l'ADN génomique et en partie sur l'ADNmt), la réplication de l'ADNmt (dont le mécanisme est bien différent de celui du noyau), et enfin la fission mitochondriale en deux nouvelles mitochondries. Les mitochondries ont des **structures très dynamiques** qui évoluent selon les besoins de la cellule. Des **mutations sur les gènes codant des protéines mitochondriales** peuvent induire du stress réplcatif mitochondrial ou provoquer des pertes de fonction qui **modifient les flux métaboliques** à l'échelle de la cellule.

3.1.3. La glutaminolyse

Les cellules sont en grande partie composées de protéines, d'acides ribonucléiques, de lipides et de carbohydrates. Ces molécules organiques comportent toutes des atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène qui peuvent provenir du glucose. Cependant, les atomes d'azote doivent être apportés par une autre source. Lors de la prolifération cellulaire accrue caractéristique des cellules cancéreuses, d'autres voies métaboliques que la glycolyse sont donc stimulées pour fournir les éléments nécessaires à la biosynthèse des macromolécules.

La glutaminolyse est la transformation de glutamine en glutamate, aspartate, alanine ou encore citrate, entre autres. Comme le glucose *via* la glycolyse, la glutamine n'est que partiellement oxydée et cette voie a donc été appelée glutaminolyse¹⁸⁶. La glutamine transporte deux groupements amine, un en α (du côté du groupement carboxylique) qui est conservé dans les molécules de glutamate, d'aspartate ou de glycine, et un en γ (du côté du groupement cétone) qui est facilement libéré (sa libération du squelette carboné donne la molécule de glutamate) (voir figure 27). Le groupement γ ammonium libéré est utilisé par de nombreuses réactions de l'anabolisme et le groupement α est à l'origine de nombreuses molécules essentielles à la cellule, telles que les métabolites du cycle de Krebs, le glutathion, les bases nucléiques ou les acides aminés, détaillées ci-après (voir figure 28).

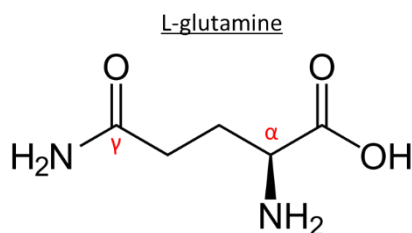


Figure 27 : représentation de Cram de la molécule de L-glutamine.

donneurs d'électrons principaux de l'oxydation phosphorylante pour la production d'ATP²⁵⁹. Le cycle de Krebs des mitochondries est donc central pour la cellule car il fait le lien entre la synthèse d'acides gras, de protéines et la production d'énergie. Grâce à la glutaminolyse dans les mitochondries des cellules cancéreuses, les concentrations des intermédiaires du cycle de Krebs restent constantes et propices à la prolifération cellulaire. Ces métabolites sont donc des molécules hybrides provenant des carbones de glucose et de carbones de glutamine.

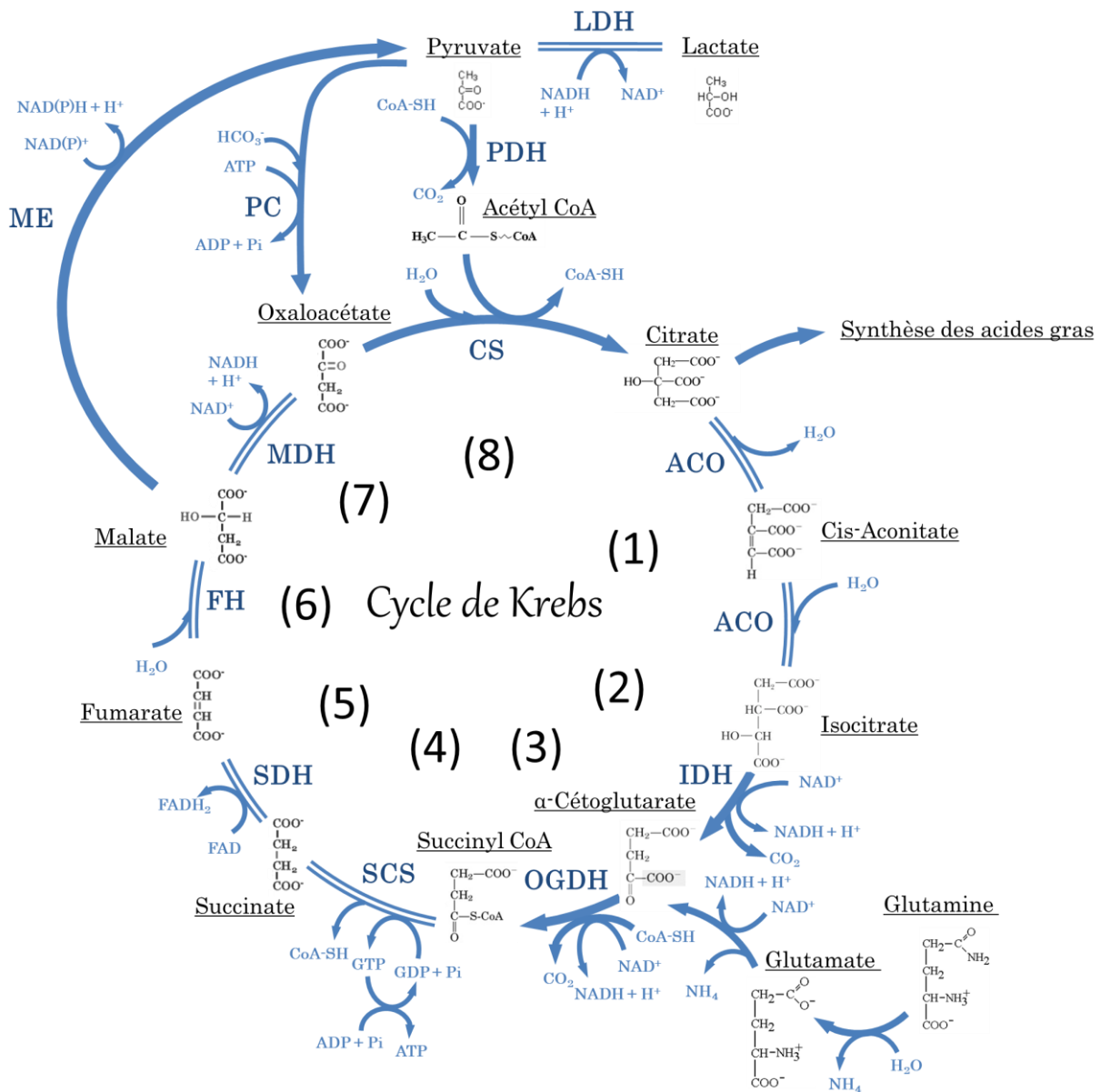


Figure 29 : (1) : Schéma réactionnel du cycle de Krebs. Aconitase (ACO); (2) : isocitrate déshydrogénase (IDH); (3) : 2-oxoglutarate déshydrogénase (OGDH); (4) : succinyl-CoA synthétase (SCS); (5) : succinate déshydrogénase (SDH); (6) : fumarate hydratase (FH); (7) : malate déshydrogénase (MDH); (8) : citrate synthase (CS); enzyme malique (ME); pyruvate carboxylase (PC); pyruvate déshydrogénase (PDH); lactate déshydrogénase (LDH).

La synthèse de glutathion

L'apport de glutamine sert également à la synthèse de glutathion (GSH), principal antioxydant endogène. En effet le GSH est essentiel à la survie cellulaire car il permet aux cellules de prévenir un stress oxydatif trop important en neutralisant les ROS. Les ROS sont des radicaux libres ou des ions très réactifs dérivés de l'oxygène qui sont capable de réagir avec un grand nombre d'autres molécules telles que les protéines ou l'ADN et d'induire ainsi des modifications de leur structure qui va impacter leur fonction. Le GSH est un tripeptide formé de glutamate, de cystéine et de glycine. Il comprend un groupement thiol aux propriétés réductrices sur la cystéine. D'une part, le glutamate et la glycine sont issus de la glutaminolyse. D'autre part, l'apport de cystéine est réalisé grâce à l'import de cystine et l'export coordonné de glutamate par le transporteur X_c^- . La cystine peut alors être convertie en cystéine à l'intérieur de la cellule et utilisée dans la synthèse de GSH.²⁵⁸ Enfin, le glutathion existe sous deux formes, correspondant à la forme oxydée (GSSG) et la forme réduite (GSH). Seule la forme réduite a le pouvoir d'inhiber les ROS, la cellule doit donc constamment régénérer du GSH à partir de GSSG. L'enzyme responsable de cette transformation est la glutathion réductase, dépendante de NADPH (voir figure 30). Or la génération de NADPH est aussi dépendante de la glutamine dans les cellules cancéreuses pancréatiques (discuté dans la partie « particularités métaboliques du cancer du pancréas »). La formation de GSH dépend donc fortement de la glutamine.

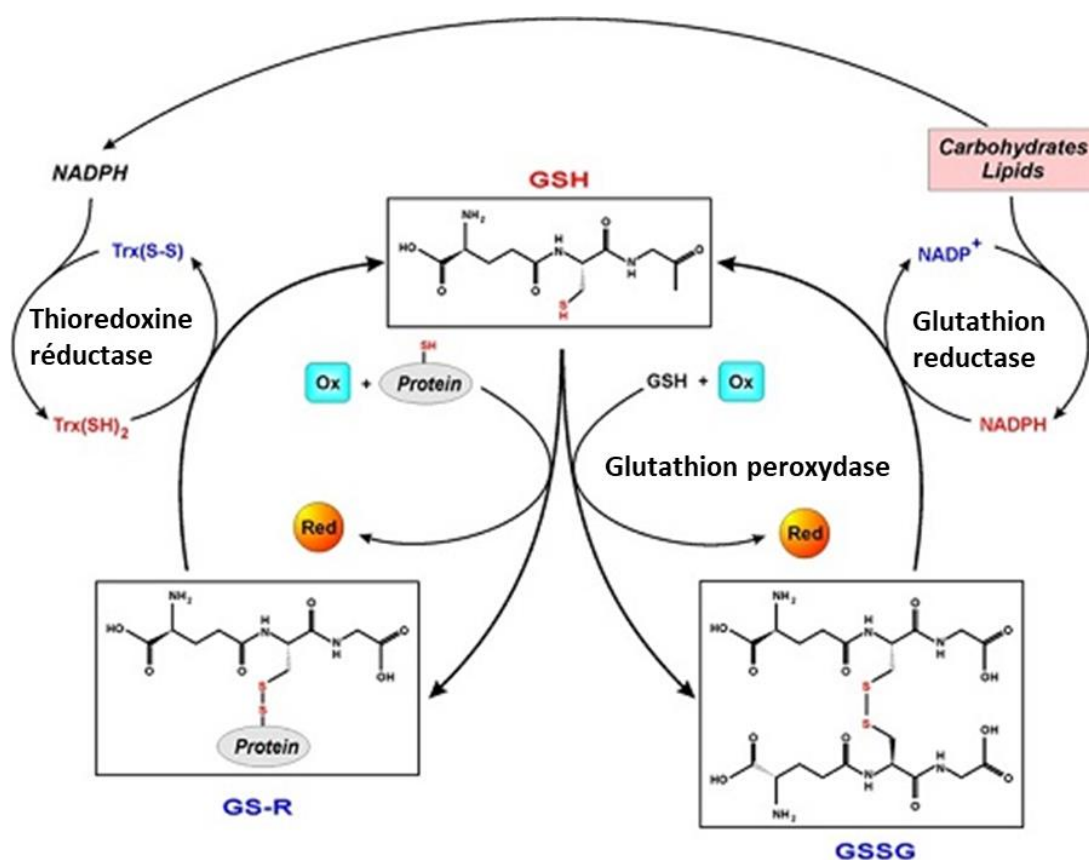


Figure 30 : Schéma réactionnel représentant le mécanisme d'action de neutralisation des ROS et des protéines oxydées par le glutathion et la régénération de la forme réduite du glutathion. Adapté de : « Nutralica » www.nutralica.eu/dossiers-scientifiques/

La synthèse de nucléotides

La glutamine est un donneur d'azote indispensable à la synthèse *de novo* des purines et pyrimidines. Pour les purines, deux molécules de glutamine, une molécule de glycine et une molécule d'aspartate sont nécessaires à l'apport d'azote pour la formation du double cycle. Puis une dernière molécule de glutamine est ensuite nécessaire à la transformation du monophosphate de xanthine en monophosphate de guanosine. Les pyrimidines nécessitent une molécule de glutamine et une molécule d'aspartate pour l'apport d'azote dans le cycle, puis une glutamine supplémentaire pour transformer l'UTP en CTP²⁵⁸. La glycine est synthétisée à partir de sérine, qui elle-même nécessite l'apport d'azote grâce au glutamate. L'aspartate est quant à elle dérivée du cycle de Krebs à partir de l'oxaloacétate et l'apport d'azote est une fois de plus assurée par le glutamate. On comprend donc bien l'avidité des cellules cancéreuses vis-à-vis de cet acide aminé pour soutenir la production accélérée des précurseurs d'ADN.

Autres utilisations du groupement amine γ de la glutamine

Le groupe amine γ de la glutamine est utilisé pour former du glucosamine-6-phosphate à partir du fructose-6-phosphate, un précurseur des réactions de O- et N-glycosylation. Ces réactions servent, entre autres, à modifier les protéines et les lipides en vue de transmettre un signal cellulaire²⁵⁸.

Autres fonctions de la glutamine

En plus de ses nombreux rôles dans le métabolisme *via* le transport d'azote, la glutamine a divers autres rôles. En effet, le transport bidirectionnel de glutamine par SLC1A5 et SLC7A5 permet l'import de divers acides aminés essentiels. En plus de leur utilisation pour la synthèse de protéines, ces acides aminés, en particulier la leucine, activent la voie mTOR, stimulant ainsi la croissance cellulaire. Il semblerait également que la glutamine puisse activer la voie ERK, mais le mécanisme n'est pas connu. Aussi, la relation entre c-MYC et la glutamine pourrait être bidirectionnelle. Tandis que c-MYC active la consommation de glutamine, à l'inverse, une forte concentration de glutamine activerait c-MYC^{258,260}.

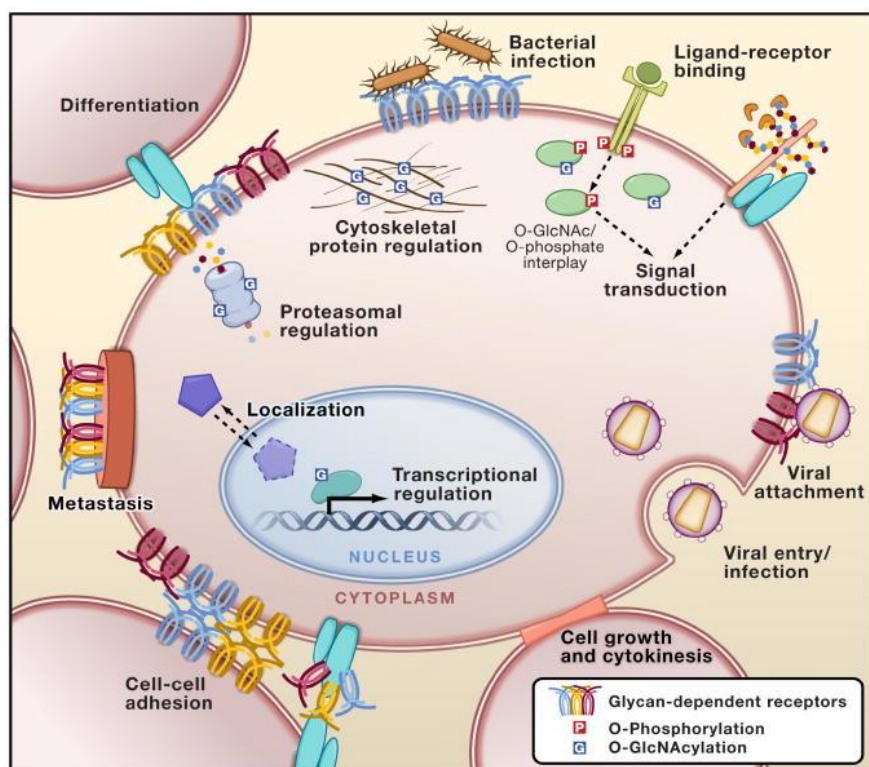
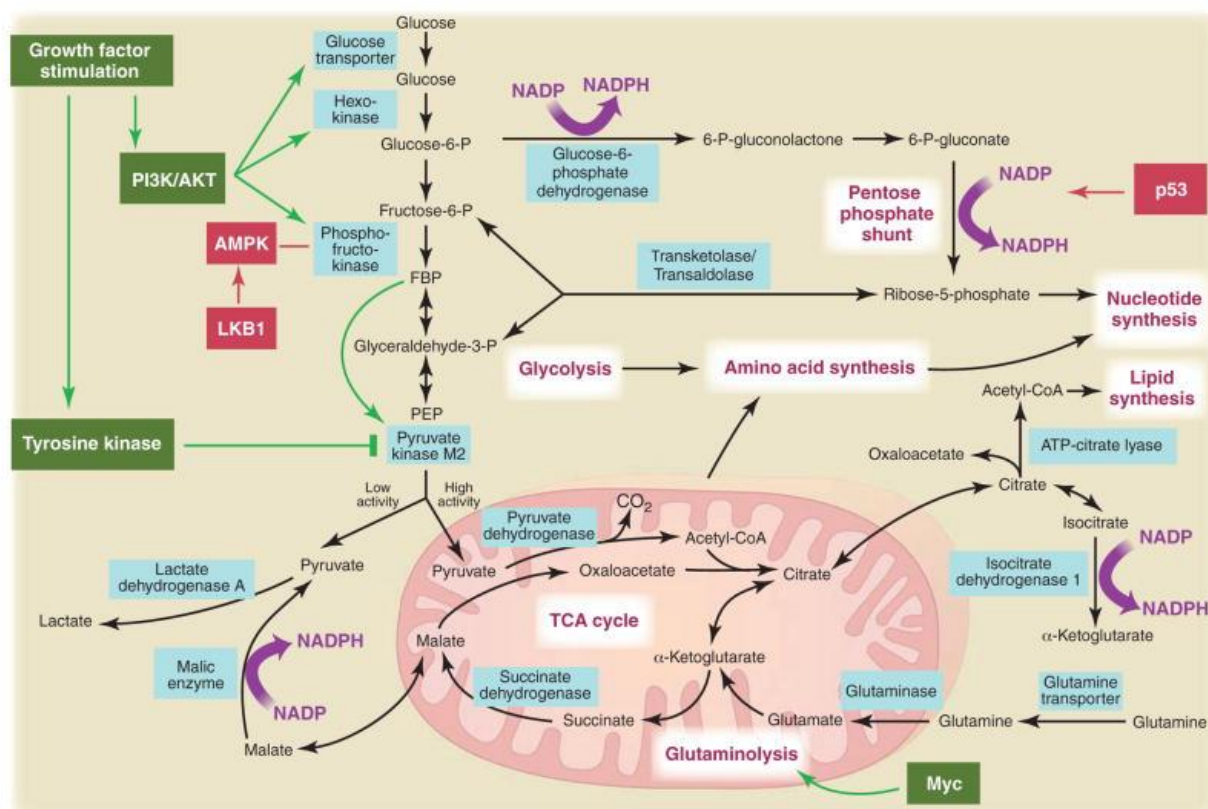
Les cellules cancéreuses ont généralement une **consommation accrue en glutamine**, et l'utilisent dans de nombreuses voies métaboliques. La **glutaminolyse** a notamment pour buts : le **maintien du cycle de Krebs** qui est un carrefour de nombreuses voies anaboliques, la **synthèse de glutathion** pour combattre le stress oxydant, la **synthèse de nucléotides** pour assurer la réplication de l'ADN et la transcription, les **réactions de glycosylation** pour la signalisation cellulaire, ou encore le transport d'acides aminés.

3.1.4. Activation des voies anaboliques

La redirection du flux glycolytique vers les voies anaboliques est associée à la surexpression de la pyruvate kinase M2 (PKM2)¹⁸⁷, de la phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH) ou de la phosphoglycérate mutase 1 (PGAM1). En effet PKM2, surexprimée dans les cancers, dirige le flux de carbone préférentiellement dans les voies de biosynthèse plutôt que vers le catabolisme complet du glucose pour la production d'ATP. Ceci permet d'une part la synthèse de précurseurs pour les macromolécules cellulaires mais également la réduction de NADP⁺ en NADPH, un cofacteur RedOx essentiel des cellules. H. R. Christofk et ses collaborateurs ont montré que la redirection du flux glycolytique par PKM2 est réalisée grâce à sa liaison à des peptides tyrosine phosphorylés.²⁶¹ De plus, l'activité de PKM2 est régulée de façon allostérique par de nombreux acides aminés. En effet la phenylalanine, l'alanine, le tryptophane, la methionine, la valine, et la proline induisent un changement conformationnel de PKM2 vers un état fermé tandis que l'histidine et la sérine agissent en tant qu'activateurs²⁶². Aussi, PKM2 contribue à la synthèse *de novo* de sérine à partir d'intermédiaires glycolytiques. La production croissante de sérine participe alors à l'activation de PKM2, ce qui restaure le flux glycolytique²⁶³. De plus, la sérine est un précurseur pour la synthèse d'autres acides aminés, comme la glycine et la cystéine qui participent à la synthèse de glutathion. Aussi, la présence élevée de ROS cellulaires induit une inactivation de PKM2 par oxydation qui déstabilise le tétramère en dimère moins actif, ce qui provoque une accumulation des intermédiaires du cycle de Krebs. Ces intermédiaires sont donc redirigés vers les voies anaboliques, telles que la synthèse de sérine. PKM2 est donc un senseur des ROS et permet la redirection du flux glycolytique vers la synthèse de glutathion qui permet de neutraliser les ROS²⁶⁴. En outre, PHGDH détourne également le flux glycolytique vers la biosynthèse de sérine et de glycine²⁶⁵. Enfin, PGAM1 régule le flux de la voie des pentoses phosphates (PPP) grâce à son substrat 3-phosphoglycérate (3-PG) qui interagit avec la 6-phosphogluconate déshydrogénase de la voie des PPP²⁶⁶.

Les cellules contrecarrent les effets néfastes des ROS en produisant des molécules antioxydantes, telles que le glutathion réduit (GSH) et la thioredoxine (TRX)²⁶⁷. Ces systèmes antioxydants sont régénérés grâce au pouvoir réducteur du NADPH. Le NADPH est également un antioxydant et participe à la défense contre les ROS. La production de NADPH est donc essentielle pour les cellules cancéreuses, et elle est réalisée grâce à la redirection du flux glycolytique vers la voie des pentoses phosphates, l'enzyme malique 1 (ME1, mitochondriale) ainsi que l'isocitrate déshydrogénase 1 ou 2 (IDH1 cytoplasmique, IDH2 mitochondriale) (voir figure 31).

Bien que sa fonction pendant la carcinogénèse soit encore peu comprise, des études récentes indiquent que la voie HBP (hexosamine biosynthetic pathway) est importante pour l'absorption des nutriments tels que le glucose et la glutamine, en modulant la glycosylation et la localisation membranaire des récepteurs aux facteurs de croissance²⁶⁸. La glycosylation des récepteurs est une modification post-traductionnelle fréquente qui joue un rôle fondamental dans la prolifération des cellules tumorales, l'invasion et les métastases, l'angiogénèse ou encore l'évasion immunitaire²⁶⁹ (voir figure 32).



De plus, les cellules en prolifération génèrent des déchets et des sous-produits toxiques tels que le lactate et l'alanine dont l'élimination est nécessaire pour qu'elles maintiennent leur homéostasie RedOx et continuent de se répliquer efficacement. Ces déchets sont généralement pris en charge par l'environnement tumoral (voir partie « le rôle de l'environnement tumoral »). Cependant, les cellules cancéreuses produisent d'autres déchets, pour lesquels des voies spécifiques de nettoyage sont mises en place. Les hydrolases NUDIX (noncanonical nucleoside diphosphate linked to some other moiety X) agissent sur le pool de nucléotides pour éliminer les nucléotides triphosphates non canoniques. Lorsqu'ils sont incorporés à l'ADN, ces nucléotides aberrants peuvent entraîner des discordances, des mutations et éventuellement la mort cellulaire. Par exemple, la dUTP pyrophosphatase hydrolyse le dUTP en dUMP et empêche l'incorporation d'uraciles dans l'ADN²⁷⁰. Ces enzymes constituent donc un exemple d'enzymes "de nettoyage". Aussi, le méthylglyoxal (MG) est un aldéhyde dicarbonylique très réactif produit pendant la glycolyse à partir du fructose par l'aldolase B, à partir du glycéraldéhyde-3-P, ou peut provenir du métabolisme des lipides par peroxydation. En présence de concentrations élevées en MG, les résidus d'arginine, de lysine et de cystéine des protéines peuvent être modifiés, ce qui provoque des modifications fonctionnelles des protéines et affecte de nombreuses voies essentielles à l'homéostasie cellulaire. L'accumulation de MG peut induire de nombreuses pathologies allant du diabète aux maladies neurodégénératives telles que Parkinson. La détoxification du MG est possible grâce à l'enzyme GLO1 (glyoxalase 1) dont l'activité nécessite du GSH²⁷¹. La régénération de GSH est donc essentielle pour la détoxification de MG. La détoxification de MG produit du D-lactate, qui peut être pris en charge par l'environnement tumoral grâce à un isoforme spécifique de LDH.

La reprogrammation énergétique des cellules cancéreuses passe inévitablement par la modification des flux métaboliques vers les **voies anaboliques** pour soutenir la **demande accrue en biomasse**. **PKM2** est une enzyme de la glycolyse essentielle à la **régulation du flux**. Selon sa conformation, dimérique ou tétramérique, elle est plus ou moins active et provoque **l'accumulation d'intermédiaires de la glycolyse qui sont alors redirigés vers les voies anaboliques** de synthèse des précurseurs de nucléotides, de sérine ou encore des hexosamines. La régénération des cofacteurs RedOx, tels que **NADP⁺/NADPH**, notamment *via* la voie oxydative des pentoses phosphates et l'enzyme malique, est aussi essentielle pour assurer un ensemble de réactions enzymatiques telles que la réduction de glutathion pour neutraliser les ROS. Enfin, la modification des flux métaboliques provoque la **production de déchets** que la cellule ou son environnement tumoral doivent retraiter.

3.2. La régulation du métabolisme énergétique

3.2.1. Le rôle des oncogènes et des suppresseurs de tumeur dans la modulation du métabolisme énergétique

Il existe des milliers de mutations ponctuelles, de translocations, d'amplifications et de délétions qui peuvent contribuer à la reprogrammation énergétique d'un cancer. La régulation métabolique des tumeurs est principalement effectuée par les voies Kras, c-Myc, PI3K/AKT, HIF, p53, et AMPK.

Oncogènes

Le type de reprogrammation énergétique survenant au cours de la carcinogénèse est dépendant de l'oncogène impliqué. L'oncogène *KRAS* est l'un des plus fréquemment activé dans le cancer du pancréas, du poumon et de l'intestin grêle. En effet, une activation constitutive de Kras provoque une dépendance au glucose²⁷², tandis que l'oncogène *HRAS* provoque plutôt une dépendance à l'oxydation phosphorylante pour la production d'énergie²⁷³. Kras facilite l'importation de glucose par activation du transporteur de glucose GLUT1 et permet ainsi aux cellules cancéreuses de survivre dans un environnement pauvre en glucose.²⁷⁴ D'ailleurs, il semblerait qu'une privation en glucose puisse favoriser l'acquisition d'une mutation sur *KRAS* afin de permettre aux cellules de survivre²⁷⁴. F. Weinberg et ses collaborateurs montrent que l'augmentation du flux glycolytique dirigé par Kras est principalement mise en place afin de soutenir la voie des pentoses phosphate pour la régénération de NADP⁺ et la biosynthèse de nucléotides et de phospholipides. De plus, ils indiquent que Kras induit une augmentation des ROS par les mitochondries pour contrôler la prolifération cellulaire¹⁹¹. Aussi, on note une dérégulation des sous-unités du complexe I de la chaîne respiratoire dans les tumeurs mutées sur *KRAS*²⁷⁵.

Des mutations sur *BRAF* surviennent couramment dans les mélanomes ainsi que dans les tumeurs colorectales et induisent la même reprogrammation énergétique que *KRAS*. Cependant, les mutations sur *BRAF* et *KRAS* sont mutuellement exclusives, c'est-à-dire qu'elles ne surviennent pas dans la même cellule, car elles sont redondantes. En effet, Kras se lie à Braf pour l'activer, activant ainsi les voies de signalisation MAPK²⁷⁶.

L'oncogène *C-MYC* est amplifié ou surexprimé dans plus de 70%¹⁹⁰ des cancers humains tous confondus, où il agit comme régulateur transcriptionnel des gènes impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires. C-Myc active de nombreux gènes glycolytiques tels que LDHA, PKM2 ainsi que le transporteur de glucose GLUT1^{277,278} et organise la mise en place de la glutaminolyse²⁷⁹. C-Myc se lie transcriptionnellement aux régions promotrices du transporteur de glutamine SLC1A5 et favorise l'expression de la GLS *via* la répression transcriptionnelle de miR-23a et miR-23b²⁸⁰. En outre, les cellules tumorales sous le contrôle de l'oncogène *C-MYC* sont particulièrement sensibles à un déficit en glutamine²⁸¹. En effet, M. Yuneva et ses collaborateurs rapportent que la déplétion en glutamine du milieu de cellules

humaines fibroblastiques dans lesquelles *C-MYC* est activé par 4-hydroxytamoxifen entraîne une diminution des intermédiaires du cycle de Krebs et la mort cellulaire. C-Myc cible aussi directement les gènes impliqués dans le métabolisme des nucléotides, tels que la thymidylate synthétase (TS), ce qui augmente le pool de nucléotides, favorisant alors la croissance cellulaire^{260,282}.

A. Cadoret et ses collaborateurs ont montré que l'oncogène *CTNNB1* (β -caténine) augmente l'expression de la glutamine synthétase (GS) et du transporteur de glutamate SLC1A2 dans les cancers du foie²⁸³. La glutamine synthétase (GS) permet de produire de la glutamine à partir du glutamate et d'ammoniac, elle permet donc de rendre les cellules cancéreuses indépendantes de la glutamine extracellulaire. Cependant, ces résultats sont controversés car d'autres équipes de recherche montrent que l'expression de la GS semble principalement être une caractéristique des cellules non cancéreuses puisque son expression est inversement corrélée à l'expression de GLS qui permet la réaction inverse, et qui est généralement activé dans les cancers sous le contrôle de *C-MYC*. En effet, d'après T. Matsuno et ses collaborateurs la GS est diminuée de deux tiers dans les carcinomes hépatocellulaires (HCC) alors que GLS est élevée de 6 à 20 fois²⁸⁴.

Suppresseurs de tumeurs

Le gène suppresseur de tumeur *TP53* est le gène le plus couramment muté dans les cancers (50% tous types de cancers confondus¹). Des mutations de son domaine de liaison à l'ADN entraînent une perte de ses fonctions transcriptionnelles. La protéine p53 a un rôle dans la régulation transcriptionnelle du métabolisme énergétique. Elle stimule la respiration mitochondriale, notamment *via* l'activation de SCO2 (cytochrome c oxydase assembly), qui régule l'assemblage du complexe cytochrome c oxydase (complexe IV de la respiration)²⁸⁵ (voir figure 33). Bien que p53 semble réguler positivement la glycolyse en se liant notamment au promoteur de l'hexokinase 2 (HK2), qui transforme le glucose en glucose-6-phosphate (G6P)²⁸⁶, p53 inhibe la glycolyse aérobie *via* la répression de la transcription des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4 en se liant à leurs promoteurs²⁸⁷, la dérégulation de la phosphoglycérate mutase (PGAM)²⁸⁸ et de la phosphofructokinase (PFK) afin de rediriger le flux vers les voies de biosynthèses annexes à la glycolyse. P53 induit également l'expression de TIGAR (*TP53*-induced glycolysis and apoptosis regulator), qui inhibe la glycolyse en diminuant les niveaux de fructose-2,6-bisphosphate, dont une concentration élevée stimule la glycolyse et inhibe la gluconéogenèse. TIGAR entraîne aussi l'inhibition de la phosphofructokinase afin de rediriger le flux glycolytique vers la voie des pentoses phosphates pour produire du NADPH²⁸⁹. D'autres travaux suggèrent que la régulation du métabolisme par p53 est essentiellement indirecte et pourrait dépendre du facteur de transcription NF- κ B ou encore d'une communication avec HIF^{290,291}. Aussi, Dans les cancers où *TP53* n'est pas muté, de nombreux facteurs peuvent inhiber son expression. L'un d'entre eux est MDM2 (murine double minute 2), qui est un inhibiteur majeur de la voie p53 grâce à son activité E3 ubiquitine ligase qui cible la protéine p53 pour induire sa dégradation par le protéasome. Cependant, G. Arena et ses collaborateurs ont montré que MDM2 a un rôle sur le contrôle du métabolisme

indépendant de p53. En effet, sa relocalisation mitochondriale lui permet d'inhiber la transcription de la sous-unité MT-ND6 du complexe I, ce qui a pour conséquence une dysfonction de la respiration et la production de ROS²⁹². Ce mécanisme peut être activé en condition hypoxique ou en réponse à un stress oxydatif. Enfin, comme énoncé précédemment, TP53INP1 est un partenaire privilégié de p53 pour médier la réponse à un stress oxydatif. En particulier, TP53INP1 est le médiateur clé du rôle antioxydant du p53, il permet de limiter l'accumulation de ROS et favorise la mitophagie pour le recyclage des mitochondries défailtantes. Cependant, il est fréquemment sousexprimé dans le cancer du pancréas, induisant alors une perte de l'homéostasie mitochondriale, se traduisant par un déséquilibre de l'état RedOx cellulaire²⁹³.

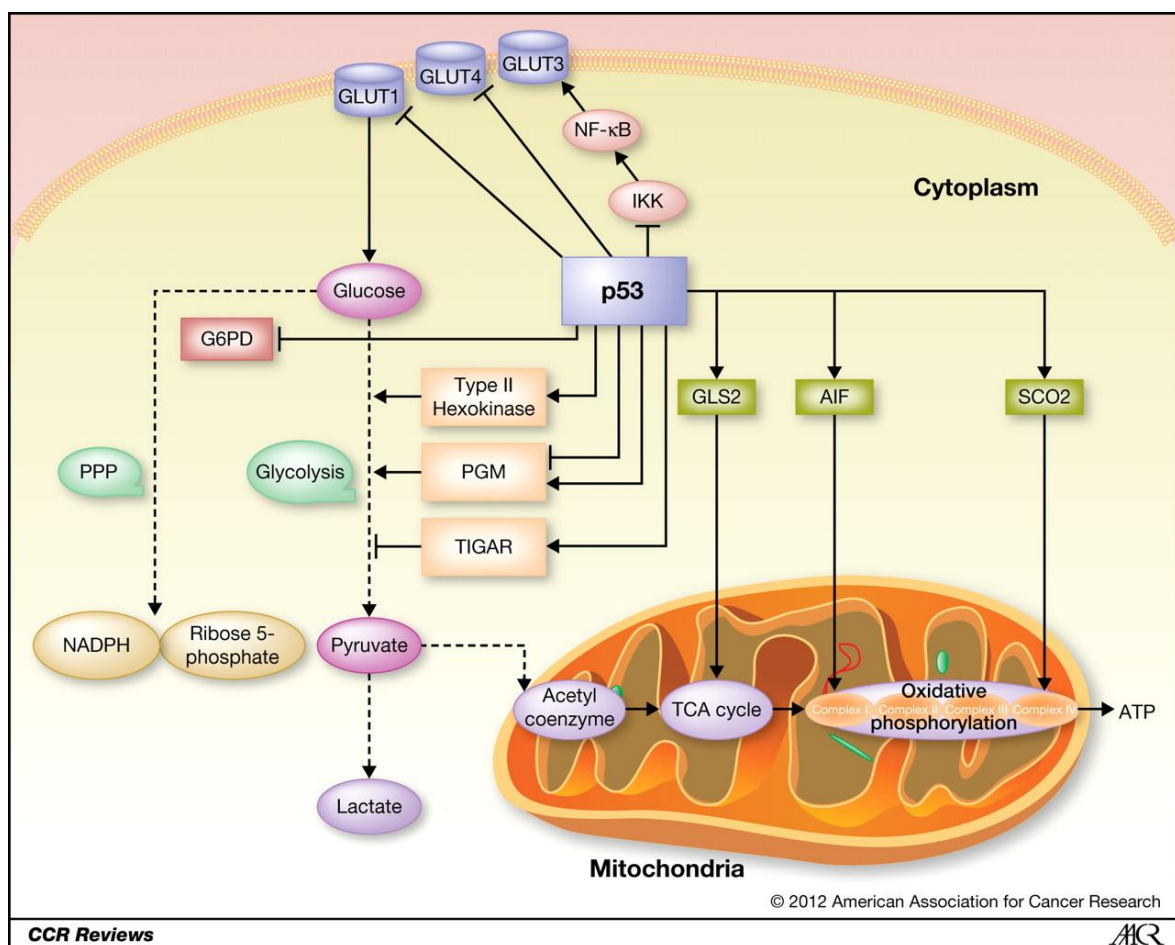


Figure 33 : Schéma récapitulatif des rôles de p53. De : L. Shen et coll. 2012.

La voie PI3K est l'une des voies de signalisation les plus fréquemment altérées dans les cancers (jusqu'à 65% dans les carcinomes utérins)²⁹⁴. Cette voie est activée par des mutations dans le gène suppresseur de tumeur *PTEN*, des mutations dans les composants du complexe PI3K lui-même ou par la signalisation aberrante des récepteurs tyrosine kinases^{295,296}. La voie PI3K régule l'absorption et l'utilisation du glucose *via* AKT qui stimule la glycolyse en augmentant l'expression et la translocation membranaire des transporteurs de glucose, et en phosphorylant les enzymes glycolytiques clés, comme l'hexokinase et la phosphofructokinase

2^{297,298}. AKT modifie donc de façon post-traductionnelle les protéines glycolytiques¹⁸³ (voir figure 34) mais pas les protéines mitochondriales²⁹⁹.

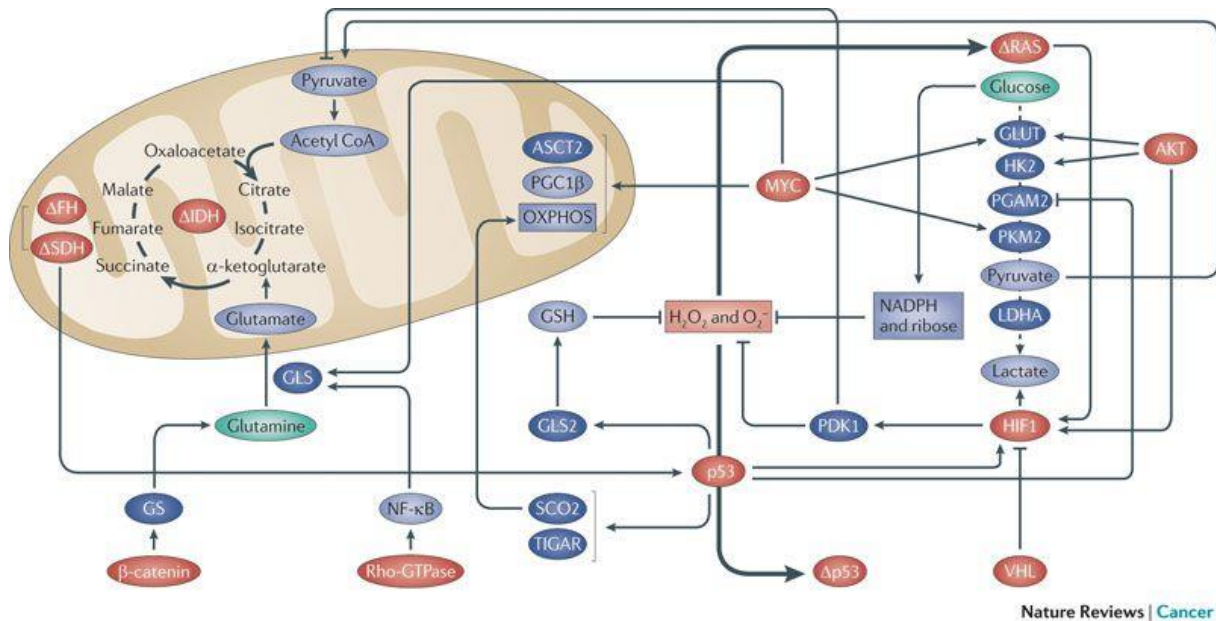


Figure 34 : Schéma récapitulatif des enzymes métaboliques (en bleu foncé) régulées par Ras, AKT, MYC, p53 et HIF et autres protéines régulatrices (en rouge). De : W. H. Koppenol et coll. 2011.

AKT active également la kinase mTOR³⁰⁰, qui stimule la biosynthèse des protéines et des lipides et la croissance cellulaire en stimulant directement la traduction de l'ARNm et la biogénèse des ribosomes. mTOR fait partie du complexe mTORC (mammalian target of rapamycin complex), régulée par la rapamycine, l'insuline, et des facteurs de croissance, ou encore par le stress oxydatif³⁰¹ et est souvent constitutivement activé dans les cancers³⁰². Son rôle est d'activer la traduction de protéines impliquées dans la croissance cellulaire. L'activation de la voie mTORC1 favorise l'utilisation de la glutamine grâce à la modulation de l'activité de GLUD1, qui transforme le glutamate en α-cétoglutarate. En effet, mTORC1 réprime la transcription de SIRT4, une protéine mitochondriale de la famille des sirtuines NAD-dépendantes qui jouent un rôle clé dans le métabolisme, et qui est un inhibiteur de GLUD1. MTORC1 contrôle négativement SIRT4 en favorisant sa dégradation par le protéasome, ce qui favorise la glutaminolyse. Les taux de SIRT4 sont diminués dans de nombreux cancers, ce qui pourrait expliquer la dépendance des tumeurs à la glutamine³⁰³. De plus, l'équipe de B. D. Manning a montré qu'un déficit en purines cellulaires, mais pas en pyrimidines, inhibe mTORC1. Il semblerait donc qu'en plus de la capacité de mTORC1 à détecter la disponibilité des nutriments intracellulaires tels que les acides aminés et de l'énergie nécessaires à la synthèse macromoléculaire, le complexe soit un senseur de l'équilibre des précurseurs de l'ADN³⁰⁴ (voir figure 35). D'autres études ont montré que l'activation de mTORC1 favorise alors la synthèse *de novo* des pyrimidines *via* l'activation de CAD³⁰⁵ et des purines *via* la stimulation du cycle mTHF (cycle du tétrahydrofolate, mitochondrial)³⁰⁶, afin de rétablir l'équilibre des nucléotides.

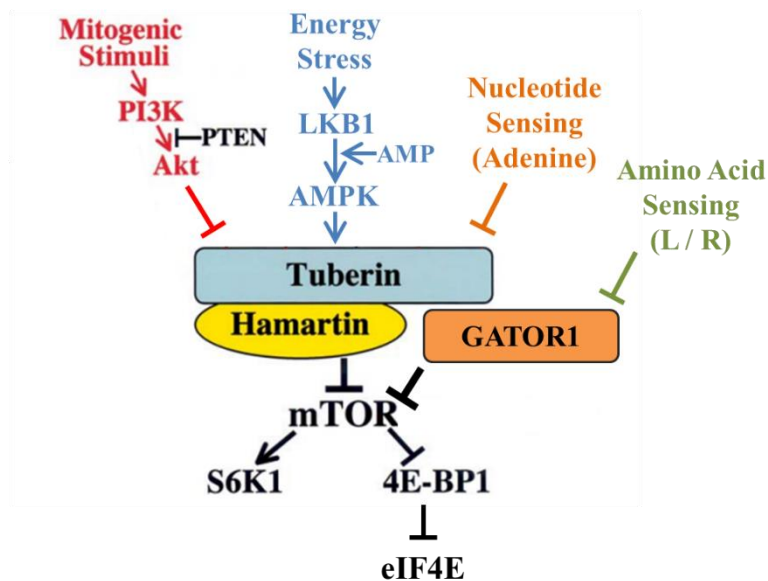


Figure 35 : Schéma récapitulatif des voies qui régulent mTOR. Adapté de : B.D. Manning & L.C. Cantley, 2003, de R. J. Shaw et coll. 2004 et de G. Hoxhaj et coll. 2017.

STK11 est un suppresseur de tumeur codant l'enzyme LKB1 (Liver kinase B1) qui active AMPK (la protéine kinase activée par l'AMP), un senseur de l'état énergétique cellulaire qui joue un rôle important dans la réponse au stress métabolique. L'accumulation d'AMP suite à une surconsommation ou une production insuffisante d'ATP active AMPK, qui induit l'activation et l'inhibition d'un ensemble de voies pour rétablir l'équilibre AMP/ATP³⁰⁷ via l'inhibition de la voie mTORC1. L'inactivation de mTOR en réponse à un stress énergétique est réalisée via la tubérine (TSC2), un composant du complexe mTORC1 qui inhibe son activité³⁰⁸. Les tumeurs déficientes en LKB1 présentent donc une hyper-activation de la mTOR. En particulier, grâce à l'analyse du flux métabolique dans des cellules cancéreuses de poumon, S. J. Parker et ses collaborateurs ont mis en évidence que les cellules déficientes en LKB1 présentent un flux plus faible vers les voies mitochondriales oxydatives. La ré-expression du LKB1 permet de rétablir la capacité des cellules à oxyder les principaux substrats mitochondriaux comme le pyruvate, les acides gras ou la glutamine et favorise une croissance en suspension. LKB1 est donc un régulateur majeur de la plasticité du métabolisme mitochondrial en réponse à un stress énergétique³⁰⁹. Aussi, les cellules déficientes en LKB1 expriment l'enzyme carbamoyl phosphate synthétase-1 (CPS1), une voie alternative à la synthèse du carbamoyl phosphate dans les mitochondries à partir d'ammoniac et de bicarbonate, un précurseur des pyrimidines. L'invalidation de CPS1 dans ces cellules induit la mort cellulaire et réduit la croissance de la tumeur, ce qui suggère une dépendance des cellules à la voie CPS1 lorsque LKB1 est muté. En effet, la perte de CPS1 induit un déséquilibre du rapport pyrimidines/purines, ce qui induit le blocage de l'ADN-polymérase³¹⁰.

L'activation de HIF

Les complexes HIF1 et HIF2 sont les principaux facteurs de transcription responsables de la régulation des gènes en hypoxie. Il s'agit d'hétérodimères composés de la sous-unité HIF1 β exprimée de façon constitutive, et des sous-unités HIF1 α ou HIF2 α , qui sont rapidement stabilisées en cas d'hypoxie. En normoxie, les sous-unités HIF α sont reconnues par le suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL), une ubiquitine ligase E3, et dégradées. Cependant, HIF1 peut également être activé dans des conditions normoxiques si VHL est mutée³¹¹, par la voie PI3K, ou encore par des mutations sur SDH ou FH comme indiqué précédemment. HIF1 et C-Myc ont de nombreuses cibles communes dans le métabolisme glycolytique et coopèrent pour réguler le métabolisme du glucose. Comme Myc, HIF-1 favorise la glycolyse en induisant l'expression des enzymes glycolytiques. Cependant, HIF1 induit la glycolyse en anaérobie tandis que MYC stimule la glycolyse aérobie^{312,313}. De plus, HIF1 active la pyruvate déshydrogénase kinase (PDHK) qui inactive la pyruvate déshydrogénase (PDH, mitochondriale) et réduit ainsi le flux de pyruvate dans le cycle de Krebs. Ceci induit une diminution de l'oxydation phosphorylante et de la consommation d'oxygène, ce qui renforce le phénotype glycolytique³¹⁴.

Les mutations d'enzymes métaboliques responsables de la reprogrammation énergétique

Certaines mutations sur des enzymes métaboliques sont fréquemment retrouvées dans les cancers, et semblent diriger le métabolisme des cellules cancéreuses vers un nouvel état ou de nouvelles fonctions oncogéniques. Certains gènes codant ces enzymes sont alors qualifiés d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs s'ils entraînent seuls la transformation des cellules. Plusieurs de ces enzymes ont déjà été abordées dans les paragraphes précédents et ne seront par conséquent pas détaillées à nouveau ici.

En particulier, IDH1 et IDH2, deux isoformes de l'isocitrate déshydrogénase qui catalysent de façon réversible la transformation d'isocitrate en α -cétoglutarate sont fréquemment retrouvées mutées dans les leucémies, les glioblastomes et de façon plus générale dans les gliomes de façon précoce. Ces deux isoformes sont dépendant du cofacteur d'oxydoréduction NADP⁺, dont l'équilibre RedOx est essentiel à l'homéostasie cellulaire. Une mutation d'IDH1/2 induit donc un remodelage du métabolisme énergétique de ces cellules. De plus, les hydroxylases qui suppriment HIF-1 en condition aérobie nécessitent l' α -cétoglutarate comme substrat. Les déficiences sur IDH1/2 peuvent donc également stabiliser HIF-1, qui à son tour remodèle le métabolisme énergétique³¹⁵.

FH et SDH peuvent être qualifiés d'oncogènes puisque leur mutation semble suffire à induire une reprogrammation énergétique causée par l'accumulation des oncométabolites fumarate et succinate qui induisent la stabilisation de HIF1 α , détaillée dans le paragraphe « Mutations des gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales ».

3.2.2. Le rôle de l'environnement tumoral

Outre les mutations génétiques qui façonnent le métabolisme des cellules tumorales, l'environnement tumoral, comme l'hypoxie, l'acidification du milieu ou encore de faibles concentrations de glucose, joue un rôle majeur dans la modulation du métabolisme énergétique. En effet, les tumeurs pancréatiques, denses, sont généralement confrontées à une pauvre vascularisation tumorale. L'environnement est donc fortement hypoxique, et la disponibilité des ressources limitée. Des voies se mettent donc en place pour recycler l'excès de lactate afin de limiter la perte de carbone *via* l'excrétion de lactate. En effet, il a été montré que le métabolisme cellulaire au sein d'une tumeur est hétérogène. Tandis que certaines cellules utilisent le glucose et le transforment en lactate, qui sera excrété de la cellule, d'autres recyclent le lactate généré par leurs voisines comme combustible pour l'oxydation phosphorylante mitochondriale. Ces deux populations fonctionnent alors en symbiose : les cellules cancéreuses hypoxiques dépendent du glucose comme combustible et sécrètent le lactate comme déchet, qui est importé et utilisé de préférence comme combustible par leurs voisines mieux oxygénées³¹⁶⁻³¹⁹. De même, il a été démontré qu'une symbiose équivalente s'établit avec les cellules stromales, elles aussi capables d'utiliser le pyruvate pour la respiration^{316,320}. Ce phénomène permet d'une part de mieux gérer les ressources disponibles mais également de limiter l'acidification du milieu, qui à terme est délétère pour la tumeur et favorise la migration des cellules cancéreuses³²¹. Aussi, les niveaux d'oxygène varient au sein de la tumeur et dans le temps. Une cellule cancéreuse qui s'appuie davantage sur la glycolyse a donc un avantage prolifératif certain pour prévenir les fluctuations d'oxygène. Ce mode de fonctionnement n'est pas exclusif aux tumeurs. En effet, c'est un mécanisme physiologique normal dans les muscles. Le lactate peut également influencer la consommation de glucose par les cellules tumorales en stabilisant HIF1³²².

Les réseaux métaboliques des cellules cancéreuses sont modulés non seulement par les mutations génétiques décrites dans les paragraphes précédents, mais aussi par l'hypoxie. HIF, dont les rôles ont été détaillés dans la partie « l'activation de HIF », est actif en absence d'oxygène et participe donc à l'activation de nombreuses voies métaboliques. HIF stimule aussi l'angiogenèse (la formation de nouveaux vaisseaux sanguins) en régulant plusieurs facteurs, dont le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF). Cependant, les vaisseaux sanguins recrutés dans le microenvironnement tumoral sont souvent désorganisés, et ne soulagent donc pas complètement l'hypoxie³²³, mais permettent de favoriser les phénomènes d'invasion *via* la circulation sanguine.

3.2.3. Les traitements ciblant le métabolisme énergétique

La dérégulation énergétique due aux oncogènes et suppresseurs de tumeurs crée une demande bioénergétique spécifique et des dépendances caractéristiques des cellules cancéreuses qu'il est possible de cibler. Ce paragraphe mentionne quelques médicaments utilisés en clinique ciblant le métabolisme énergétique et mitochondrial qui présentent un intérêt pour le traitement des cancers.

Un certain nombre d'études cliniques rétrospectives ont montré que la Metformine, un médicament utilisé chez les patients atteints de diabète, a des effets bénéfiques pour la prévention des cancers et permet d'obtenir de meilleurs résultats lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec d'autres thérapies contre le cancer. Chez les patients diabétiques, la metformine réduit l'hyperglycémie en inhibant la production de glucose dans le foie. Cependant, son mécanisme d'action a longtemps été discuté et c'est finalement l'équipe de Xavier Leverve qui l'a partiellement élucidé³²⁴. En effet, ils montrent que cette molécule inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et inhibe donc le transfert d'électrons. Une conséquence serait l'augmentation du rapport AMP/ATP dans les cellules, ce qui active l'AMPK. Cependant, M. Foretz et ses collaborateurs montrent que la diminution de la gluconéogenèse serait une conséquence directe d'une diminution d'ATP et indépendante de l'activité de l'AMPK³²⁵.

L'Atovaquone est un médicament utilisé en clinique en complément du proguanil dans le cadre d'un traitement anti-paludique. C'est un inhibiteur spécifique de la chaîne de transport des électrons des mitochondries par inhibition du complexe cytochrome bc1 (complexe III). M. Fiorillo et ses collaborateurs ont montré que l'Atovaquone a également des effets anti-cancéreux sur des cellules cancéreuses du sein³²⁶. Le traitement des cellules par l'Atovaquone permet de réduire significativement la progression voire d'induire la mort par apoptose des cellules sans affecter les fibroblastes normaux.

Le Leflunomide est utilisé en clinique pour traiter la polyarthrite rhumatoïde. C'est un inhibiteur de la dihydroorotate déshydrogénase (DHODH), une enzyme mitochondriale bifonctionnelle qui fait le lien entre le transfert d'électrons à la mitochondrie et la synthèse *de novo* des pyrimidines. Des études récentes ont suggéré que la modification de la biosynthèse des pyrimidines affecte l'OxPhos dans les tumeurs pancréatiques²⁵⁴.

Les niveaux élevés de ROS dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales ont été exploités expérimentalement (doxorubicin, trioxide d'arsenic, et taxol) pour tuer les cellules cancéreuses en poussant les niveaux de ROS au-dessus du seuil tolérable pour leur survie. Aussi, plusieurs agents génotoxiques actuellement utilisés en clinique, comme le cisplatine ou le β -phényléthyl isothiocyanate (PEITC) et certains alcaloïdes, dépendent de la production de ROS pour leur efficacité^{327,328}. De plus, A. Luengo et ses collaborateurs ont répertorié les médicaments ciblant le métabolisme qui sont actuellement en essai clinique pour traiter des cancers (voir figure 36)³²⁹. On retrouve notamment le méthotrexate et le pemetrexed, qui sont des analogues du folate et qui inhibent les réactions de transfert du métabolisme à un carbone nécessaire à la synthèse des purines. Aussi, les analogues de purines, la 6-mercaptopurine et la 6-thioguanine, inhibent la PRPP amidotransférase, la première enzyme de synthèse *de novo* des purines. Le CB-839 inhibe la transformation de glutamine en glutamate par la glutaminase, tandis que PEG-BCT-100 et AEB1102 sont des iminohydrolases qui s'attaquent directement à l'arginine et la L-asparaginase à l'asparagine. TVB-2640 inhibe l'assemblage du palmitate à partir de malonyl-CoA. Un ensemble de composés ciblant spécifiquement les formes mutées d'IDH1/2 (AG-120, AG-221, etc...) sont également à l'essai. AZD3965 cible un transporteur du lactate, tandis que CPI-613 inhibe l'utilisation du pyruvate par la mitochondrie en bloquant la PDH.

Drug	Target Enzyme
Methotrexate	Dihydrofolate reductase (DHFR)
Pemetrexed	DHFR Thymidylate synthase (TS) Glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GARFT)
6-Mercaptopurine 6-Thioguanine	PRPP amidotransferase
Capecitabine 5-Fluorouracil	Thymidylate synthase (TS)
Gemcitabine Cytarabine	DNA polymerase/ribonucleotide reductase (RnR)
Leflunomide	Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)
CB-839	Glutaminase (GLS)
PEG-BCT-100 (ADI-PEG20) AEB-1102	Depletion of circulating arginine
L-Asparaginase	Depletion of circulating asparagine
TVB-2640	Fatty-acid synthase (FASN)
AG-120 (Ivosidenib) IDH305 BAY1436032 FT-2102	mutant IDH1
AG-221 (Enasidenib) AG-881	mutant IDH2 mutant IDH1/2
AZD3965	Monocarboxylate transporter 1 (MCT1)
CPI-613	Pyruvate dehydrogenase (PDH)/ α -ketoglutarate dehydrogenase
Metformin	Mitochondrial complex I

Figure 36 : liste des agents chimiques, actuellement utilisés en clinique ou faisant l'objet d'études cliniques, qui ciblent le métabolisme. De : A. Luengo et coll. 2017.

Il existe des milliers de mutations ponctuelles, de translocations, d'amplifications et de délétions qui peuvent contribuer à la **reprogrammation énergétique** d'un cancer. La régulation métabolique des tumeurs est principalement effectuée par **les oncogènes KRAS, C-MYC et PI3K/AKT**, ainsi que le **suppresseur de tumeur TP53**, qui régulent un ensemble de fonctions cellulaires. La **kinase AMPK**, un senseur de l'état énergétique des cellules joue également un rôle central dans la régulation énergétique, de même que **HIF** activé en présence de faibles concentrations d'oxygène. Certaines enzymes mutées ou dont l'expression est dérégulée dans les cancers peuvent aussi participer à la reprogrammation énergétique, notamment par **l'activation de HIF**. Enfin, **l'environnement tumoral** participe à la régulation du métabolisme tumoral en permettant l'apport exogène de substrats et en prenant en charge certains déchets cellulaires tels que le lactate. Les modifications énergétiques ainsi mises en place créent des **dépendances spécifiques qu'il est possible de cibler par des médicaments**. La Metformine, l'Atovaquone ou le Leflunomide sont des exemples de médicaments qui ciblent le métabolisme, utilisés en clinique pour d'autres pathologies, qui pourraient représenter un intérêt pour la recherche contre le cancer.

3.3. Particularités métaboliques du cancer du pancréas

La mutation quasi-systématique de Kras dans le cancer du pancréas provoque son activation constitutive et est liée à la reprogrammation du métabolisme tumoral pancréatique caractérisé par une augmentation du flux glycolytique et une diminution de la respiration (détaillé dans la partie « rôle des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs dans la modulation du métabolisme énergétique »). Entre autres, les tumeurs pancréatiques mutées sur *KRAS* ont donc une consommation de glucose exacerbée et redirigent le flux glycolytique vers des voies anaboliques telles que la production de nucléotides, de lipides ou encore vers la voie des hexosamines (HBP) pour la glycosylation des protéines²⁷². En contrepartie, des voies annexes telles que la glutaminolyse se mettent en place pour compenser un apport de carbone suffisant au niveau du cycle de Krebs et assurer toutes les fonctions décrites dans la partie « La glutaminolyse ». Cette reprogrammation métabolique est commune à de nombreux cancers, et se caractérise par un ensemble d'altérations mitochondriales³³⁰ (voir figure 37). L'activation constitutionnelle de Kras entraîne également la stabilité de c-Myc³³¹, qui régule de nombreuses voies métaboliques (détaillées dans la partie « rôle des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs dans la modulation du métabolisme énergétique »), ce qui suggère que certaines altérations de la fonction mitochondriale associées à l'activation de Kras sont en fait dues à une activation de c-Myc.

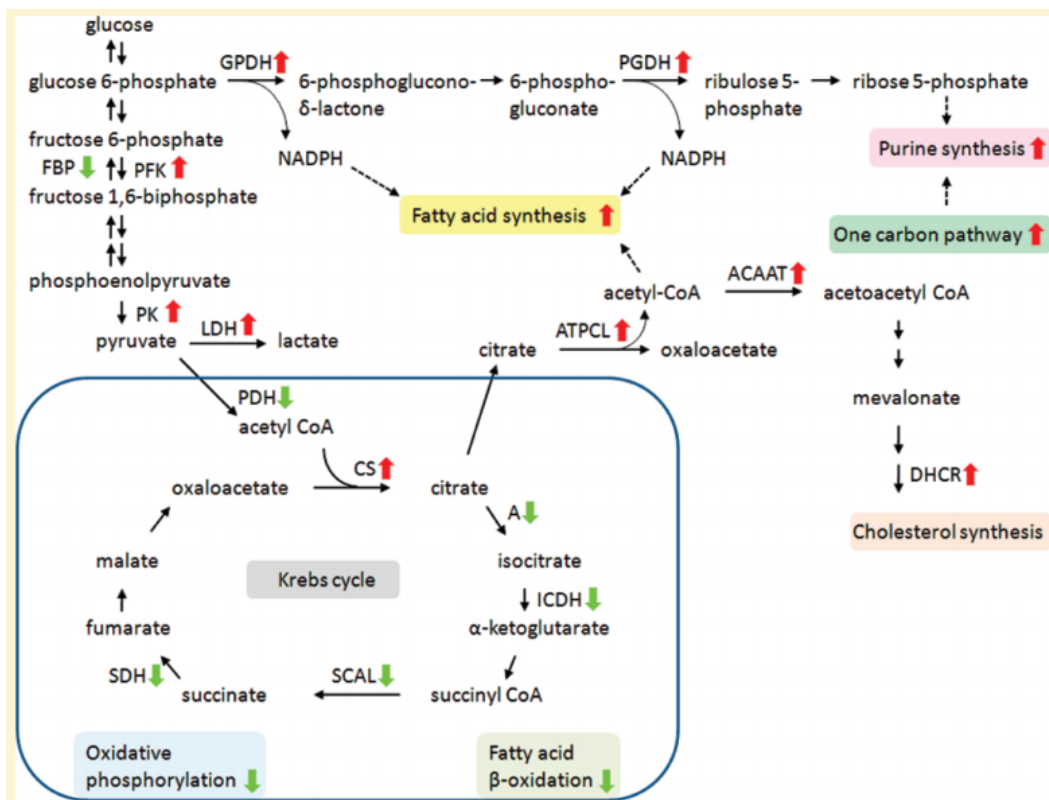


Figure 37 : Schéma récapitulatif des altérations métaboliques retrouvées dans les tumeurs pancréatiques. De : W. Zhou et coll. 2011.

De façon surprenante, H. Ying et ses collaborateurs ont montré que les cellules cancéreuses pancréatiques utilisent préférentiellement la partie non oxydative de la voie des pentoses phosphates pour la synthèse de phosphoribosylpyrophosphate (PRPP), précurseur des nucléosides²⁷². En redirigeant le flux de la sorte, la voie oxydative, qui permet normalement le recyclage de NADPH, est contournée. Sans la mise en place d'une voie annexe de recyclage de ce cofacteur essentiel de la cellule, l'équilibre RedOx serait perdu, et la prolifération tumorale rendue impossible. L'équipe de C. Kimmelman a alors mis en évidence que les tumeurs pancréatiques utilisent la glutamine principalement *via* la voie des transaminases GOT1 et GOT2. GOT2 est une aspartate aminotransférase mitochondriale qui permet la conversion simultanée de glutamate en α -cétoglutarate et d'acide oxaloacétate en aspartate, transporté dans le cytoplasme. Une deuxième aminotransférase GOT1, cytoplasmique cette fois-ci, permet la transformation inverse, ce qui produit de l'oxaloacétate cytoplasmique qui peut être transformé en malate puis en pyruvate par l'enzyme malique ME1. Cette nouvelle voie permet donc de maintenir l'homéostasie RedOx cellulaire en régénérant alors NADPH grâce à ME1^{332,333} (voir figure 38). Des études de traçage métabolique réalisées par R. J. DeBerardinis et ses collaborateurs ont montré que plus de 60% du carbone dérivé de la glutamine est libéré par la cellule sous forme de lactate ou de CO_2 ³³⁴, ce qui implique que le cycle de Krebs est principalement dérivé *via* GOT1 et GOT2 vers l'enzyme malique pour fournir le NADPH nécessaire à la cellule pour maintenir l'équilibre RedOx. En outre, seulement 5% de la glutamine est incorporé dans les acides gras et 15% dans les protéines²⁷⁹. Dans les cellules normales, la glutamine est plutôt utilisée *via* la glutamate déshydrogénase GLUD1 pour ravitailler le cycle de Krebs³³⁵.

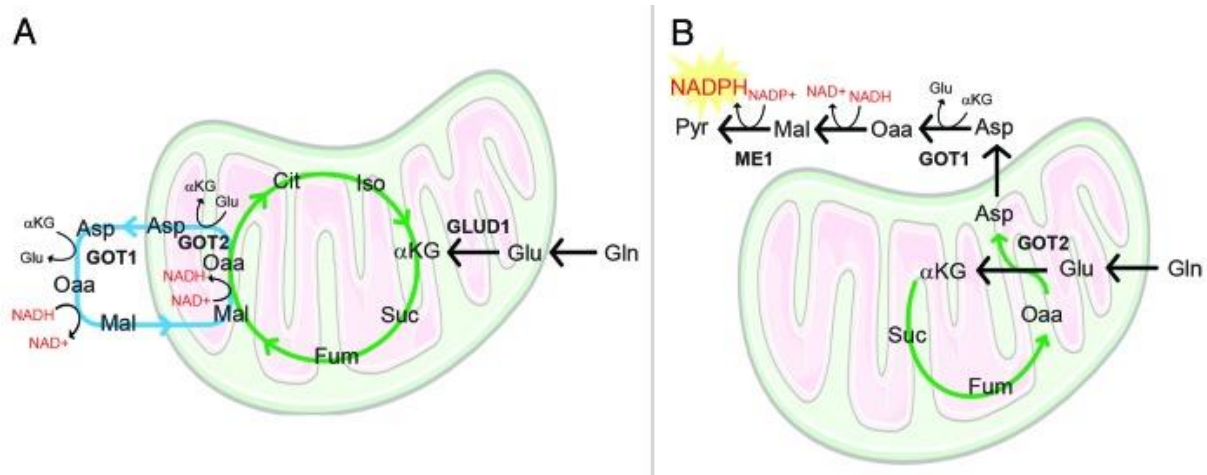


Figure 38 : A. l'utilisation de la glutamine par le cycle de Krebs des cellules tumorales. B. l'utilisation de la glutamine par le cycle de Krebs des cellules tumorales pancréatiques. De : C. A. Lyssiotis et coll. 2013.

Aussi, il a été montré chez les patients atteints de cancer du pancréas une dérégulation de la méthylation en R248 de MDH1 (malate déshydrogénase 1, cytoplasmique), ce qui activerait la consommation de glutamine par les cellules tumorales³³⁶. Selon les auteurs, une activation de Kras et/ou un fort stress oxydatif peuvent être responsables de l'inhibition de CARM1 (Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1) qui méthyle MDH1, ce qui a pour conséquence une surconsommation de glutamine. Ces résultats suggèrent que les tumeurs pancréatiques sont quasiment indépendantes du métabolisme mitochondrial

puisque la glycolyse et l'utilisation alternative de la glutamine ont lieu dans le cytoplasme. En accord avec cette théorie, Viale et ses collaborateurs ont montré dans un modèle expérimental *KRAS* ON/OFF que les cellules cancéreuses pancréatiques survivantes à l'ablation de *KRAS* ont à nouveau les caractéristiques d'un état énergétique OxPhos³³⁷.

Comme énoncé dans la partie « activation des voies anaboliques », PKM2 est une enzyme centrale dans la régulation du flux métabolique et sa redirection vers les voies anaboliques. Cependant, l'équipe de M. G. Vander Heiden a montré que PKM2 n'est pas essentiel à carcinogénèse pancréatique. En effet, son invalidation dans un modèle murin de cancer du pancréas n'affecte pas l'induction ni la progression tumorale et ne modifie pas la survie des souris. En revanche, PKM1 est retrouvé surexprimé dans ces tumeurs, suggérant que les fonctions spécifiques de l'isoforme 2 de la pyruvate kinase ne sont pas requises dans le cancer du pancréas³³⁸.

Les tumeurs pancréatiques sont caractérisées par un microenvironnement dense qui limite la disponibilité des nutriments et de l'oxygène. En conséquence, les cellules développent des moyens de dégrader la matrice afin d'en récupérer des éléments essentiels à leur croissance. Par exemple, la synthèse de l'aspartate est généralement réalisée dans les cellules cancéreuses à partir de glutamine *via* le cycle de Krebs. Cependant, cette voie implique plusieurs étapes d'oxydation qui sont limitantes pour les tumeurs pancréatiques. Les tumeurs pancréatiques piègent alors les acides aminés des protéines extracellulaires telles que l'albumine et réalisent leur catabolisme, limitant ainsi leur besoin de synthétiser elles-mêmes l'aspartate³³⁹. Aussi, O. Olivares et ses collaborateurs ont montré que les tumeurs pancréatiques dégradent le collagène afin d'en récupérer de la proline, qui représente un quart de la composition en collagène et dont le catabolisme initié par la proline déshydrogénase (PRODH1, mitochondriale) est essentiel à la progression tumorale pancréatique *in vitro* et *in vivo*³⁴⁰. La dégradation de la proline génère, entre autres, du glutamate et de l'alpha-cétoglutarate afin de permettre un apport anaplérotique dans le cycle de Krebs.

La signalisation en aval de l'oncogène *KRAS* active également Drp1 et favorise la fission mitochondriale dans les cancers pancréatiques³⁴¹. Ainsi, M. Yu et ses collaborateurs ont montré que l'expression de *Kras* induite dans un modèle cellulaire inductible par la

Le cancer du pancréas présente des **caractéristiques métaboliques particulières**. En effet, les cellules cancéreuses pancréatiques **utilisent préférentiellement la partie non oxydative de la voie des PPP**, ce qui empêche la régénération de NADPH. Les tumeurs pancréatiques utilisent alors la glutamine principalement *via* la voie des **transaminases GOT1 et GOT2 afin d'alimenter l'enzyme malique pour régénérer NADPH** et assurer l'équilibre RedOx. La **glutamine est donc indispensable** aux cellules cancéreuses pancréatiques, qui se montrent particulièrement gourmandes pour cet acide aminé. Par contre, **PKM2 n'est pas essentiel à la carcinogénèse pancréatique**, alors que c'est un régulateur central du flux glycolytique dans d'autres cancers. Enfin, les mitochondries des cellules tumorales pancréatiques mutées sur *KRAS* sont **particulièrement fragmentées** du fait de l'activation de Drp1 par *Kras*.

doxycycline quadruple le nombre de mitochondries fragmentées²⁵⁴. Ils ont aussi constaté que les cellules HPNE (des cellules épithéliales pancréatiques humaines utilisées dans cette étude pour contrôler la morphologie des tissus normaux) présentent des mitochondries allongées, de même que la lignée issue d'un patient *KRAS* WT alors que les lignées cancéreuses pancréatiques issues de patients avec *KRAS* muté ont des mitochondries fragmentées.

4. Hypothèses initiales et objectifs de la thèse

Historiquement, la CDA a principalement été étudiée dans un contexte de chimiosensibilisation. Pourtant, M. Zauri et ses collaborateurs ont montré que la CDA est retrouvée surexprimée dans le cancer du pancréas par rapport au tissu pancréatique normal alors qu'elle est principalement sousexprimée dans de nombreux autres cancers par rapport aux tissus sains appariés¹⁷⁶. Ceci suggère un rôle particulier de la protéine dans la carcinogénèse pancréatique. Mon équipe s'est donc intéressée au rôle de la CDA dans le cancer du pancréas en absence de chimiothérapie. Des travaux préliminaires à mon arrivée dans l'équipe ont confirmé que la CDA est surexprimée dans les tumeurs des patients atteints d'un cancer du pancréas par rapport au tissu sain adjacent et qu'elle est un marqueur de mauvais pronostic. Aussi, son invalidation dans un modèle murin orthotopique a démontré que la CDA est essentielle à la croissance tumorale *in vivo*. Ces travaux préliminaires ont alors fait naître plusieurs questions auxquelles j'ai tenté de répondre pendant ma thèse :

- Quelles sont les conséquences phénotypiques de l'invalidation de la CDA dans des modèles expérimentaux de cancer du pancréas ?
- Par quels mécanismes moléculaires la CDA exerce-t-elle ses fonctions sur la carcinogénèse pancréatique ?
- Quel est l'intérêt pour une tumeur de surexprimer la CDA ?

II. Résultats

Ce chapitre résultat est présenté sous la forme d'un article en cours de préparation intitulé « *Cytidine deaminase regulates mitochondrial biogenesis and aggressivity of pancreatic cancer* ».

1. Contexte de l'étude

En 2015, mon équipe a publié un article relatant les résultats d'un essai clinique de phase I (TherGAP)⁶⁹ portant sur la thérapie génique par transfert du gène de fusion dCK::UMK et du récepteur de somatostatine SSTR2, associé à un traitement par gemcitabine chez des patients atteints d'un cancer du pancréas. Cette étude avait pour but de chimiosensibiliser les patients à la gemcitabine grâce à la surexpression de gènes impliqués dans l'activation intracellulaire du médicament. Mon équipe a obtenu des résultats très encourageants quant à la sécurité de cette approche et une phase II est en cours afin de déterminer l'efficacité de l'approche. Dans la continuité de ce travail, mon équipe a exploré d'autres pistes de chimiosensibilisation des tumeurs pancréatiques, notamment concernant la protéine cytidine désaminase (CDA), dont le rôle a été étudié de façon plus approfondie par Marion Gayral, étudiante en thèse de 2012 à 2015. Elle a notamment réalisé les études *in vivo* qui ont mis en évidence le rôle fonctionnel de la CDA dans la carcinogénèse pancréatique en absence de traitement par chimiothérapie, et a commencé les études fonctionnelles d'invalidation de la CDA dans un modèle *in vitro* de cancer du pancréas. Ses résultats préliminaires, menés à partir d'approches de transcriptomique, protéomique et métabolomique ont permis de révéler le rôle original de la CDA sur le métabolisme énergétique cellulaire. Ma thèse a donc été consacrée à l'étude phénotypique approfondie des conséquences du ciblage de la CDA dans des modèles *in vitro* de cancer du pancréas et à la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu. J'ai également mis en place un modèle expérimental de surexpression de la CDA afin d'étudier son rôle dans un contexte proche de celui retrouvé dans la pathologie et de comprendre les avantages fonctionnels procurés par la CDA dans une tumeur pancréatique.

2. Résultats

Cytidine deaminase regulates mitochondrial biogenesis and aggressivity of pancreatic cancer

Audrey Frances¹, Lucille Stuaní², Marion Gayral¹, Audrey Lumeau¹, Estelle Saland², Delphine Pagan¹, Hubert Lulka¹, Alix Vignolle-Vidoni¹, Naima Hanoun¹, Anthony Lemarié³, Nathalie Saint-Laurent⁴, Frédéric Lopez⁴, Nelson Duseti⁶, Juan Iovanna⁶, Marlène Dufresne¹, Jérôme Torrisani¹, Jean-Charles Portais⁷, Sophie Vasseur⁶, Louis Buscail^{1,5}, Jean-Emmanuel Sarry^{2†} and Pierre Cordelier^{1†}.

Affiliations : Université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées, Université Toulouse III Paul Sabatier, INSERM, CRCT team 10¹, 11³, 18² and technological cluster⁴, Toulouse France.

⁵Service de Gastro entérologie et de Nutrition, CHU Toulouse. ⁶Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Team « pancreatic cancer ». INSERM Stromalab / INSA Metatool⁷

[†]: co-corresponding authors

ABSTRACT

Cytidine deaminase (CDA) is a cytoplasmic enzyme, which known function is to convert cytidines and deoxycytidines into uridines and deoxyuridines and therefore to maintain the pyrimidine pool equilibrium for RNA and DNA synthesis *via* the pyrimidine salvage pathway. In cancer, CDA has long been associated with resistance to pyrimidine-based therapies, but to date, its role *per se* during oncogenesis has been largely neglected. During this study, we found that CDA is over-expressed in pancreatic adenocarcinoma (PDAC) at the time of diagnosis, in patients naïve of treatment and is an independent factor of worse prognosis in several patient cohorts. Silencing CDA in experimental models of PDAC induces cell death by apoptosis and prevents tumor growth and spread *in vivo*. High throughput, multi-omics investigations revealed that CDA loss results in major rewiring of the energetic metabolism of PDAC cells towards glycolysis for energy production. Indeed, CDA targeting provokes mitochondrial DNA depletion and a decrease in PDAC cells chondrioma; mitochondrial respiratory capacity and coupling are massively diminished in these cells, leading to poor ATP production and mitochondrial oxidative stress through reactive oxygen species (ROS) production. In gain of function studies, CDA overexpression increases mitochondrial biogenesis, and migration of cancer cells, both *in vitro* and *in vivo*, echoing our finding that in patients, CDA overexpression is associated with a transcriptomic signature indicative of high metastatic potential, and with the very aggressive basal-like phenotype in patient-derived xenografts (PDX). Remarkably, CDA-overexpressing cells are resisting to inhibition of cancer cell migration using drugs targeting mitochondrial function. Taken together, this study demonstrates for the first time that CDA *per se* has an unforeseen and critical role in PDAC. As CDA facilitates mitochondrial biogenesis and energetic metabolism of pancreatic cancer cells, and is associated with PDAC aggressivity, our results suggest that CDA can be considered as a novel and promising onco-metabolic candidate for the development of targeted therapies for the management of patients with PDAC.

INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a disease with no cure that will become soon one of the deadliest malignancies worldwide (Siegel *et al*, 2016). Poor prognosis is primarily due to the late detection of the disease, when patients are no longer candidates for surgical resection (Kleeff *et al*, 2016). Even though, 80% of patients will relapse within five years following surgery (Neoptolemos *et al*, 2018). As almost ninety percent of patients with PDAC are diagnosed with advanced or metastatic tumors, current treatments, mainly chemotherapies, are ineffective, as they increase survival times of patients only in weeks to months, while inducing detrimental side effects (Neoptolemos *et al*, 2018). Until very recently, molecular-targeted therapies have, so far, largely failed to improve patient survival. Pancreatic tumors rapidly acquire resistance, or tolerance, to most conventional treatments, and pre-existing functional heterogeneity also stems for PDAC chemoresistance (Bian *et al*, 2017). Recent advances in PDAC management include PARP inhibitor administration to patient with germline BRCA-mutated metastatic PDAC that responded to first-line platinum-based chemotherapy (Golan *et al*, 2019). Also, neoadjuvant chemotherapy associated with surgery improves patient survival (Conroy *et al*, 2018). Nevertheless, novel therapies are urgently needed to alleviate the dismal prognosis of PDAC.

High throughput, multilevel analysis revealed that tumors are highly heterogeneous between patients (Bian *et al*, 2017) and that PDAC development is mostly driven by successive catastrophic genetic events in the early stage and by epigenetic modifications in the metastatic stage (Kleeff *et al*, 2016). While this inter-individual tumoral heterogeneity may jeopardize the search for a universal tumor marker or cure, this particular trait may offer, at least for some patients, new therapeutic opportunities.

There are currently many proteins associated with treatment resistance in PDAC, with potential for PDAC therapy. One of the most promising candidate is cytidine deaminase (CDA), that recycles free pyrimidines, and generates uridine and deoxyuridine, from cytidine and deoxycytidine, respectively, for the synthesis of DNA and RNA. However, CDA can also deaminate deoxycytidine analogues with chemotherapeutic activity such as Ara-C, Gemcitabine, or Decitabine (Neff & Blau, 1996), that becomes inactive metabolites

(Camiener & Smith, 1965; Ebrahim *et al*, 2012). In patients with PDAC, high CDA activity correlates with progression under gemcitabine-based therapy (Serdjebi *et al*, 2013), and gemcitabine treatment results in increased CDA expression (Amit & Gil, 2013). Very recently, commensal CDA was identified as a key player of chemoresistance from PDAC microbiome (Geller *et al*, 2017). Interestingly, CDA expression also drives therapeutic decision in PDAC experimental tumors, to incorporate epigenetically modified forms of deoxycytidine to kill tumor cells (Zauri *et al*, 2015). However, the role of CDA *per se* in cancer has never been investigated to date.

In the present work, we demonstrate that CDA is over-expressed in PDAC tissues compared to matching normal parenchyma and, for the first time, that CDA is associated with a worse prognosis in several patient cohorts. Remarkably, genetic targeting of CDA strongly impairs experimental PDAC cell proliferation and tumor growth, in the absence of chemotherapy. We conducted a large-scale, unbiased molecular and metabolomic analysis and identified a major rewiring of PDAC cells metabolism, with failure of the mitochondrial function in CDA depleted cells. We found that CDA stimulates mitochondrial biogenesis, and protects PDAC cells from drugs targeting mitochondrial function. In patients, high CDA levels are associated with invasion, migration and epithelial to mesenchymal transition (EMT) signatures, and CDA is overexpressed in advanced compared to local tumors, is maintained during the metastatic process in PDX cohorts, and stimulates PDAC cell migration *in vitro* and *in vivo*. Collectively, this work demonstrates for the first time that CDA, previously known for protecting cells from chemotherapy, has a new and unforeseen role in PDAC tumors *per se*, as it favors mitochondrial biogenesis, cancer cell migration and dissemination *in vivo*, and is associated with very aggressive PDAC tumors. Thus, CDA can be considered as a new and promising therapeutic target to help improve the prognosis of patients with PDAC.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture conditions

MiaPACA2, BxPC3 and CAPAN2 human cancer cells were obtained from ATCC and cultured in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) 4.5g/L glucose (for MiaPACA2) or in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) (for BxPC3 and CAPAN2) containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 IU/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 250ng/mL fungizone (AB), 2mM glutamine (L-Gln) and 100 IU/mL plasmocin. Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂. MiaPACA2 cells were used in all experiments unless stated otherwise.

Suppliers: DMEM, RPMI, FBS, AB (ThermoFisher Scientific), L-Gln (Sigma), plasmocin (Invivogen).

Mice model

MiaPACA2 GLUC F1 cells expressing luciferase were invalidated for CDA or control and engrafted 2 days after transduction into SCID CB17 mice (2×10^6 cells per mouse) by orthotopic injection into pancreas, as previously described (Sicard *et al*, 2013). Tumor progression was monitored once per week by luminescence after intra peritoneal injection of coelenterazin H (15µg/mouse). Measurement of luminescence was assessed with IVIS Spectrum (Perkin Elmer).

Patient cohorts and clinical sample processing

For CDA expression analysis in normal adjacent tissue vs PDAC, we used two cohorts. The first one included pancreatic tissue samples obtained from patients receiving pancreatic surgery following the policies and the practices of the facility's ethical committee at the *Centre Hospitalo-Universitaires* (CHU) of Toulouse and Bordeaux, and the *Cancéropole Grand Sud-Ouest* (France), as stated before (du Rieu *et al*, 2010). All patients gave their informed written consent. Histopathology faculty selected cancerous pancreatic tissue with matched adjacent tissue. RNA was extracted and processed as stated before (du Rieu *et al*, 2010). The second cohort was established from pancreatic carcinoma tissues and normal adjacent pancreatic parenchyma collected from 48 patients who had undergone surgical resection for ductal adenocarcinoma of pancreas between 2003 and 2011 at the Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (Diaz-Riascos *et al*, 2019). The study was approved by the Ethical Committee of University Hospital of Bellvitge CEIC 02/04 and written informed consent was obtained from all patients for the use of their tissues.

For CDA expression analysis in locally advanced and metastatic PDAC, we analysed by custom biomark qPCR array total RNA from 108 patients with histologically proven PDAC included in four French referral centres (Clichy, Marseille, Montpellier and Toulouse) from January 2005

to April 2007, obtained following fine needle aspiration of locally advanced and metastatic primary tumors (Bournet *et al*, 2012).

Informed written consent for analysis was obtained for all patients.

Details regarding the PDX cohorts used in this study are available here (Bian *et al*, 2017; Diaz-Riascos *et al*, 2019).

Knock Down and overexpression strategies

Lentiviral vectors encoding for shRNAs sequences targeting CDA were cloned into pLKO.1 puromycin vector and obtained from Sigma. The shRNA sequences are the following

CCGGGCCAGTGACATGCAAGATGATCTCGAGATCATCTTGCATGTCACTGGCTTTTTG (shCDA1),

CCGGCATGAGAGAGTTTGGCACCAACTCGAGTTGGTGCCAACTCTCTCATGTTTTTG (shCDA2)

CCGGGCCGGATGGTACGTATATTGTCTCGAGACAATATACGTACCATCCGGCTTTTTG (shCDA3).

Vectors encoding for random shRNA (Sigma) were used as a control. We generated an open reading frame (ORF) for CDA that is resistant to shCDA2 targeting (CDAshRes), by changing by mutagenesis 360G into T, 363T into C, and 366T into A, while preserving CDA amino acids sequence. Lentiviral expression constructs were obtained by cloning CDA SHres or GFP ORF (as control) into pCMV blasticidin DEST 706-1 vectors (Addgene). All constructs were sequence verified. Lentiviral particles were produced in 293FT cells as previously described (Sicard *et al*, 2013) and quantified for p24 presence using INNOTEST HIV Antigen mAb (Fujirebio). For lentiviral transduction of shRNAs and ORF-expressing constructs, 250ng p24/50,000cells were used in Opti-MEM medium (ThermoFisher Scientific) containing 4µg/mL protamin sulfate, as previously described (Sicard *et al*, 2013). Transductions were performed on day 0 in the evening, cells were refed with fresh medium on day 1 in the morning and selected with 5µg/mL puromycin on day 2 in the morning and experiments were performed from day 2 in the evening and onwards as stated for each experiment. To silence CDA expression by siRNA, cells were transfected with a pool of siRNA purchased from Dharmacon. Scrambled siRNAs were used as controls. Cells were transfected with 10nM siRNA using SiPORT NeoFx following the manufacturer recommendations (ThermoFischer).

Proliferation

Proliferation was quantified with the IncuCyte Zoom (Essen BioScience) in 96-well plates, with 6,000 cells initially seeded in 100µl of complete medium. Medium was changed and cells were treated 24h after seeding. Daily proliferation fold change was determined by cell counting with a Cell Counter (Beckman Coulter) every 3 or 4 days over a month period.

Colony formation assays were performed in 6-well plates, with 250 cells initially seeded. Colony presence was revealed at day 10 by cold methanol staining and Crystal violet coloration. Density was measured with Image lab software (BioRAD).

Migration assay

65,000 cells were seeded in a 96-well plates 24 hours before experiment. Cells were scratched using Incucyte WoundMaker tool, washed with PBS then allowed to migrate for 24hours in complete medium 0.1% FBS without antibiotics. Migration was measured with the IncuCyte software.

Transcriptomic analysis

Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen) from Mia PACA-2 cells expressing CDA hairpins or control hairpins, 2 weeks following transduction. Transcriptomic analysis was performed using Affymetrix 3'IVT arrays following the manufacturer recommendations (Affymetrix). Data analysis (quality controls, scatterplots, boxplots, normalization, differential genes identification, functional enrichments, statistical analysis) was performed by expert bioinformaticians from the Biopuce platform (GET Genome and transcriptome, Toulouse, France).

Proteomic analysis

Total proteins were extracted from Mia PACA-2 cells expressing CDA hairpins or control hairpins, 2 weeks following transduction, as stated above, and subjected to two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE, pH 4-7). Briefly, cell proteins were solubilized using UTC buffer (urea-thiourea-CHAPS) and precipitated using the 2D clean-up kit (GE Helthcare). Quality controls included Instant blue 10% PAGE (Euromedex). Strips were labelled with CY3, CY5 and CY2, respectively, and first dimension migration was performed at pH4-7. Second dimension was performed with 10% PAGE, gels were scanned with Typhoon (GE Healthcare), and analyzed with Decyder software (GE Helthcare) using the DIA module. Sixty spots with variation >1.5 or <-1.5 (t -test <00.5) were picked and analyzed by mass spectrometry (ESI-IonTrap-MS, Bruker Amazon ETD) and identified using the MASCOT software and the SwissProt database as a reference.

Metabolomic analysis

500.000 cells were seeded in 6-well plates with 2mL medium 24h before the extraction. Metabolites were quenched and extracted in a one-step process as described previously (Martano *et al*, 2015). C^{13} IDMS standards added into the quenching solution were used to quantify metabolites, and samples were analysed by Metatoul (Toulouse).

Metabolite consumption rate

30,000 cells were seeded in 48-well plates with 500µL medium. Medium was changed at time 0 with DMEM A14430 (no glucose, no glutamine, no phenol red, ThermoFisher Scientific) containing 1% SVF, 4.5g/L glucose, 5mM L-Gln, 1mM pyruvate. Medium was collected, filtered on 0.2µm filters, and quenched in liquid nitrogen at hour 3, hour 6, hour 12, hour 24 and hour 48 while cells were counted at each time to normalize data. Glucose, glutamine, pyruvate and lactate content were measured with NMR by Metatoul (Toulouse). Consumption/production rate was calculated using Dr. Pierre Millard's algorithm Physiofit in R software (available at <http://metasys.insa-toulouse.fr/software/physiofit/>).

RNA isolation and gene expression analysis

Total RNA was extracted with RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions; quality and quantity were measured on a Nanodrop (Thermo Scientific). cDNA synthesis was performed with Revertaid H minus kit (Thermo Scientific). cDNA expression analysis was performed by Sybr Green (Bio-RAD) quantitative real time PCR on a StepOne (ThermoFisher Scientific).

DNA extraction for mtDNA/gDNA relative quantitation

DNA was extracted with QIAamp DNA mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions; quality and quantity were measured on a Nanodrop (Thermo Scientific). mtDNA relative quantity was measured based on real time PCR as described previously (Rooney *et al*, 2015).

Protein extraction and immunoblot analysis

Total cell lysate protein extraction for immunoblot analysis was performed using RIPA buffer (Biotech) (Tris-HCl 50mM pH=8, NaCl 150mM, NP40 0,5%, sodium deoxycholate 0,5%, SDS 0,1%) in the presence of protease inhibitors (Sigma). Extracts were separated by SDS-PAGE under reducing conditions, transferred to a nitrocellulose membrane and analyzed by immunoblotting. Appropriate HRP conjugate secondary antibodies were from Promega. Signal was detected using the ECL system (BioRAD) according to the manufacturer's instructions. Densitometry of the blots was done using Chemidoc (BioRAD) and image Lab software.

Cytoplasmic/nuclear extract isolation was performed as following: cell pellet was resuspended in 10mM TRIS, pH 7.4 containing 1.5mM MgCl₂, 5mM KCl, 0.5mM dithiothreitol, 0.5%NP40 and 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride complemented with protease inhibitors and incubated on ice for 10min. The mixture was centrifuged for 15min at 4°C at 2000 rpm. Supernatant was collected (cytoplasmic fraction) and the pellet was washed and centrifuged twice with the same buffer as previously. The pellet was then resuspended in 20mM TRIS,

0.025% glycerol, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.2mM EDTA, 0.5mM dithiothreitol and 0.4M NaCl complemented with protease inhibitors and incubated on ice for 15min. The mixture was centrifuged 20min at 4°C at 12000rpm and supernatant was collected (nuclear fraction).

Mitochondrial isolation was performed as described previously (Kappler *et al*, 2016). The pellet containing the mitochondrial fraction was solubilized in RIPA buffer as described for total cell lysate.

Flow cytometry

Cells were collected by trypsinisation and resuspended in PBS for the time of treatment (no treatment or 200μM CCCP for 15 min (for TMRE negative control), then 10μM DCF or 20μM MitoSox, or 200nM TMRE, or 100nM MTG for 20min). After wash, cells were resuspended in ABB buffer and 1μL/mL anti-annexin V antibody was added to measure cell viability. Intracellular ROS levels were measured by flow cytometry using the DCF-DA dye (total ROS) and MitoSox (mitochondrial ROS), mitochondrial membrane potential and mitochondrial mass were measured with TMRE and MTG respectively in alive cells (AnV negative cells).

Suppliers: carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) (Sigma), TMRE, MitoTracker Green (MTG) and DCF-DA (Invitrogen) and, MitoSox (Thermofisher), ABB (BD), anV antibody (BD).

ATP production

ATP was measured using the Cell Titer Glo kit (Promega). 8,000 cells were plated into a 96 well white plate for 24hours. Then medium was changed and cells were treated with water/PBS (control) or 100μM sodium iodoacetate (IA) (to block glycolysis ATP) both alone or in combination with 30μM FCCP (to block mitochondrial ATP), 100μL total per well. Following 1hour incubation, 100μL of Cell Titer Glo reaction mix solution was added to each well for a final volume of 200μL. Plates were then analyzed for luminescence with a Clariostar (BMG LABTECH). By comparing the different conditions, total ATP and percentages of both glycolytic and mitochondrial ATP were determined with the following formula:

$$\% \text{ATP from Glycolysis} = 100 * (\text{ATP}_{\text{PBS/water}} - \text{ATP}_{\text{IA}}) / (\text{ATP}_{\text{PBS/water}} - \text{ATP}_{\text{IA+FCCP}})$$

Oxygen consumption and ECAR

Cells were seeded at 40,000 cells per well on Seahorse XF24 tissue culture plates (Seahorse Bioscience Europe) the day before the assay. The sensor cartridge was placed into the calibration buffer medium supplied by Seahorse Biosciences to hydrate overnight. Before the assay, medium was changed with 500μL of XF base minimal DMEM medium containing 10mM glucose, 1mM pyruvate and 2mM glutamine at pH 7.4. After one hour incubation at 37°C in CO₂ free-atmosphere, basal oxygen consumption rate (OCR, as a mitochondrial respiration

indicator) and extracellular acidification rate (ECAR, as a glycolysis indicator) were performed using the XFp analyzer, according to the manufacturer's instructions.

The data were normalized to protein content, determined by Bradford assay upon lysis of the cells (using 0.1N NaOH) immediately after the assay.

Transmission electronic microscopy

Cells were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen phosphate buffer (pH = 7.4), then washed with the Sorensen phosphate buffer (0.1 M) for 12 hours. Then were postfixed with 1% OsO₄ in Sorensen phosphate buffer (Sorensen phosphate 0.05 M, glucose 0.25 M, OsO₄ 1%) for 1 hour, washed twice with distilled water and prestained with 2% uranyl acetate aqueous solution for 12 hours. Samples were dehydrated in an ascending ethanol series and embedded in epoxy resin (Epon 812, Electron Microscopy Sciences). After 24 hours of polymerisation at 60°C, ultrathin sections (70nm thick) were mounted on 150 mesh collodion-coated copper grids and poststained with 3% uranyl acetate in 50% ethanol and with 8.5% lead citrate before being examined on a HT 7700 Hitachi electron microscope at an accelerating voltage 80 KV. Number of mitochondria per cell (and number of cristae per mitochondria) were measured by counting the visible mitochondria (and cristae) and by correction for the number of cells (of mitochondria). Length and width of mitochondria was measured by imageJ.

Quantification and statistical analysis

Unless otherwise indicated, data represent mean $\pm$ SEM of at least 3 experiments from different transductions as stated in description of each figure, statistical significance between values was calculated by student test, unless otherwise stated. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

We first analyzed the expression of CDA in two independent cohorts of patients with PDAC, at the time of diagnosis, in absence of treatment. Using qRT-PCR, we found that CDA mRNA is significantly overexpressed in resected tumor tissue compared to matching, normal adjacent parenchyma (Figure 1A, 5.1 +/- 1.5 fold, $p < 0.001$). Notably, patients with tumors with high CDA levels had shorter median survival (5 months) compared to those with lower mRNA levels encoding for the enzyme (median survival of 10 months, Figure 1B, $p < 0.0321$, hazard ratio = 2.021). Both findings were comforted by *in silico* exploration of the TCGA cohort (Supplementary Figure 1A and 1B). These results demonstrate that CDA is overexpressed in PDAC and indicative of worse prognosis, strongly suggesting a role for CDA in PDAC oncogenesis.

To address this question, we transduced human PDAC-derived cell lines with lentiviral vectors encoding for three small harpins (sh) RNA specific for CDA (Supplementary Figure 2). For the rest of the study, we selected shRNA #2 as this hairpin results in robust and steady decrease in CDA mRNA and protein levels, compared to cells expressing a control hairpin (Supplementary Figure 2A and 2B). We next investigated the functional consequences of CDA inhibition in PDAC cell lines. Remarkably, CDA targeting provokes a profound and long-term inhibition of PDAC cell proliferation, monitored non-invasively using the Incucyte Zoom (Figure 2A and Supplementary Figure 2C), and a reduced ability for PDAC cells to form colonies (Figure 2B). We measured a similar antiproliferative effect following CDA targeting in another PDAC cell line using shRNA (Supplementary Figure 2D). Deeper investigations revealed that CDA inhibition results in loss of mitochondrial membrane potential, cell death, and PARP and Caspase-3 cleavage in PDAC cells (Figure 2C, 2D and 2E). PDAC cells were engineered to express firefly luciferase, engrafted in the pancreas of athymic mice, and tumor growth was monitored non-invasively. We found that all mice engrafted with PDAC cells expressing control hairpins formed tumors and grew aggressively *in vivo*; on the other hand, targeting CDA in PDAC cells resulted in 50% mice not developing experimental tumors, and significantly decreased tumor growth (Figure 2F and 2G). Thus, these results demonstrate for the first time that CDA is overexpressed in PDAC and is essential *per se* to cell proliferation and *in vivo* growth.

We next performed differential transcriptomic analysis on PDAC cells expressing hairpins specific for CDA or control hairpins to identify the molecular mechanisms consecutive to CDA targeting in PDAC cells. The approach was validated as CDA is the most down regulated gene in this study (19.55-fold decrease, Supplementary Figures 3A and 3B). We found that 169 additional genes are downregulated in CDA-depleted cells (mean 2.9 ± 1.1 -fold, adjusted p-value 0,0001- 0,049), while 70 genes are up-regulated (mean 2.6 ± 0.7 -fold, adjusted p-value 0,006- 0,047). Ontology analysis of these lists of genes revealed an unexpected enrichment for genes involved in energetic metabolism cellular homeostasis, and more specifically within canonical glycolysis and glycolytic process pathways (Figure 3A, Supplementary Figure 3A and 3B). Elevated glycolytic activity of CDA-depleted cells was confirmed at the protein level by the upregulation of hexokinase II (HKII) and phosphofructokinase (PFKP) expression, activation of lactate dehydrogenase A (LDHA) by phosphorylation (Figure 3B) and the increase of ATP from glycolysis (Figure 3C). We performed metabolomic studies and found that Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) and 2-phosphoglycerate (2-PB) levels are significantly elevated in CDA depleted cells (Figure 3D and 3E). On the other hand, the pentose phosphate pathway and in particular phosphoribosyl diphosphate (PRPP), purine and pyrimidine syntheses are crippled in CDA-depleted cells (Supplementary Figure 3C). Collectively, our data indicate that glycolysis is altered following CDA inhibition in PDAC cells.

We adopted a similar strategy and performed proteomic analysis on the same set of cells; again, data enrichment analysis identified major defects in energy pathways and protein metabolism, with a focus on mitochondrial structure and function (Supplementary Figure 3D and 3E). In CDA-depleted cells, the expression of mitochondrial isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha (IDH3 α) and succinate dehydrogenase (SDHA) are significantly downregulated (-50% and -40%, respectively, Figure 4A) compared to control cells, with a decrease in ATP production from the mitochondria (-33% $\pm$ -16%, Figure 4B). We next explored mitochondrial respiration using Seahorse XF analyzer and found that CDA targeting diminishes basal and maximal respiration, and annihilates spare respiratory capacity of PDAC cells, compared to control cells (Figure 4C). Such decrease in oxygen consumption rate was accompanied by a significant decrease in medium acidification rate, classifying CDA-depleted cells into quiescent with minimal mitochondrial respiration (data not shown). We further

scrutinized mitochondrial condition in CDA-depleted PDAC cells and found that mitochondrial ROS production is significantly increased in these cells ($+40\% \pm 12\%$, $p < 0.05$, Figure 4D). Next, we found that mitochondrial mass and mitochondrial DNA (mtDNA) content (Figures 4E and 4F), and the levels of tricarboxylic acid cycle (TCA) intermediates such as citrate, cis-aconitate and succinate (Figures 4G, 4H and 4I) are significantly lower following genetic targeting of CDA in PDAC cells, compared to control cells. This was accompanied by the appearance of autophagy markers such as microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-II, Figure 4J). Collectively, these results demonstrate for the first time that targeting CDA results in major alterations of the mitochondrial population and function in PDAC cells.

We next asked whether mitochondrial failure accounts for, or is a consequence of the antiproliferative effect and the induction of apoptosis following inhibition of CDA expression in PDAC cells. Thus, we performed short-term experiments in cells expressing or not hairpins against the enzyme for 48 hours, when cell viability is not impacted yet. We verified that CDA expression is inhibited in these cells at this time point (Supplementary Figures 4A and 4B). We found that CDA depletion induces an early decrease in mtDNA content ($-35\% \pm 10\%$, $p < 0.05$, Figure 5A) and in mitochondrial membrane potential ($-34\% \pm 13\%$, $p < 0.05$, Figure 5B). At the protein level, CDA inhibition causes a decrease in SDHA, IDH3A (Figure 5C), respiratory chain complex 4 (Figure 5D), and mitochondrial transcription factor A (TFAM, Figure 5E) expression, compared to control cells. We also measured a slight increase in mitochondrial ROS production and a slight decrease in mitochondrial mass in CDA-depleted cells, which fails to reach significance (Supplementary Figure 4C and 4D). Notably, ATP production from glycolysis, lactate production, glutamine and pyruvate consumption remained unchanged, while glucose consumption is slightly albeit significantly decreased following early depletion of CDA as compared to control cells (Supplementary Figure 4E to 4I). We next performed transmission electron microscopy (TEM) of PDAC cells expressing control or CDA hairpins for 48 hours (Figure 5F). We found that the number of mitochondria is significantly lower in CDA-depleted cells ($-30\% \pm 10\%$, $p < 0.05$, Figure 5G), and that mitochondria are smaller in these cells compared to control cells (length: $-32\% \pm 1\%$, $p < 0.05$ Figure 5H, and width: $-17\% \pm 1\%$, $p < 0.05$ Figure 5I), while cristae numbers remain unchanged (Supplementary Figure 4J). We also observed by transmission electronic microscopy a significant increase in autophagosomes

with engulfed mitochondria in cells depleted for CDA (Figure 5E), suggesting early stage of mitophagy.

In gain of function studies, Mia PACA-2 cells were transduced with lentiviral vectors encoding human CDA, and with GFP-encoding lentiviral vectors as control. CDA expression was readily detected at the mRNA and protein levels (Supplementary Figure 5A and 5B). We found that overexpression of CDA in PDAC cells significantly increases mitochondrial mass (+16% $\pm$ 4%, $p < 0.05$, Figure 6A), mtDNA content (+30% $\pm$ 6%, $p < 0.05$, Figure 6B), ATP production from oxidative phosphorylation (OxPhos) (Figure 6C) and TFAM, complex IV, complex I, SDHA and IDH3A protein levels (Figure 6D), compared to GFP-expressing control cells. Last, we performed rescue experiments with CDA resistant to hairpins and found that cell proliferation could be restored following overexpression of the protein (Figure 6E). Collectively, these results strongly suggest that CDA has a new positive role on mitochondrial biogenesis, and that mitochondrial failure due to CDA targeting in PDAC cells is an early and causative event that provokes PDAC cells inhibition of proliferation.

We next conducted a series of experiments to determine the benefit for PDAC cells to overexpress CDA. To our surprise, data mining studies from TCGA cohorts revealed that CDA expression is associated with gene signatures of motility and migration (Figure 7A) and epithelial-to-mesenchymal transition (Figure 7B) in these tumors. We next analyzed a cohort of primary PDAC cells and found that CDA mRNA expression is enriched in cells from the basal, highly aggressive phenotype, compared to cells with classic phenotype ($p < 0.001$; Figure 7C). We next quantified CDA expression by RTqPCR in cohort of patients with locally advanced, or metastatic PDAC tumors. We found that CDA mRNA is significantly overexpressed in primary tumors from patients with advanced disease (66 fold $\pm$ 0.5, $p < 0.05$, Figure 7D). To address whether CDA expression is altered during the metastatic process, we analyzed a cohort of patient-derived orthotopic xenografts (PDX) that disseminated after engraftment in recipient mice (Diaz-Riascos *et al*, 2019). We found that PDAC PDX express detectable levels of CDA; interestingly, corresponding experimental metastasis express similar mRNA levels encoding for the enzyme, demonstrating that CDA expression is maintained during metastatic spread in model mice (Figure 7E). We next performed functional studies to determine if CDA overexpression impacts PDAC cells migration. While proliferation studies indicate that control

and CDA-overexpressing cells share similar proliferation rate and doubling time (data not shown), CDA overexpression in PDAC cell lines significantly increases cell migration and wound closure (+66% +/- 10% at 24h, $p < 0.05$, Figure 7F, Supplementary movie Figure 5C). We next treated cells overexpressing or not CDA with the mitochondrial complex I inhibitor phenformin. We found that targeting mitochondrial complex I activity inhibits the migration of PDAC cells; however, CDA overexpression significantly thwarts phenformin inhibitory effect on cell migration as compared with control cells (Figure 7G), strongly suggesting that CDA-induced mitochondrial biogenesis confers resistance to PDAC cells and preserves migration. Next, control and CDA-overexpressing cells were engrafted in the pancreas of athymic mice, and tumor growth and dissemination were recorded. Again, CDA overexpression marginally impacts on primary tumor growth (data not shown), however, CDA expression is associated with higher dissemination propensity in mice, either local (ovary) or distant (liver, kidney, diaphragm), and with ascites production and peritoneal carcinomatosis (Table 1). Collectively, these results reveal an unforeseen role of CDA on mitochondrial biogenesis, which promotes cell migration and metastatic spread of PDAC tumors.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate for the first time that CDA, previously known to contribute to cancer chemoresistance by deaminating cytidine-based drugs, has a new role on energetic metabolism regulation that is essential to experimental PDAC growth. Our results indicate that PDAC cells with reduced CDA levels follow an energetic reprogramming, at the transcriptomic and metabolomics levels, to promote glycolysis. On the other hand, we found that PRPP, pyrimidine and purine levels are significantly decreased in these cells, strongly suggesting that PDAC cells invalidated for CDA bypass biosynthetic pathways, such as pentose phosphate and nucleic acids syntheses, to minimize unnecessary ATP utilization. At the same time point, we also identified the presence of dysfunctional mitochondria in CDA-depleted cells with very low respiratory capacity, overproduction of ROS and depletion of mtDNA, and severe drop in ATP production from the mitochondria.

This is of particular importance as PDAC are the quintessential aggressive tumors that thrive in nutrient-poor, hypoxic environments. As a consequence, this tumor type must develop unconventional strategies for fuel source acquisition and utilization. Thus, alterations in tumor cell metabolism are central to the biology of PDAC. Historically, anabolic glucose metabolism is thought to be essential to tumor growth, including PDAC, to fuel tumors' elevated demand for macromolecular biosynthesis and oxidative homeostasis (Perera & Bardeesy, 2015). In these cells, glycolysis predominates over mitochondrial oxidative phosphorylation of pyruvate, regardless of oxygen tension, a phenomenon known as the Warburg effect. However, it is now well accepted that the classic Warburg model misses a large part of the story. This is supported by the clinical observation that glucose concentrations are not significantly elevated in PDAC tumors compared with adjacent parenchyma (Perera & Bardeesy, 2015), and that PDAC cells that are well-adapted to harsh and unfavorable metabolic conditions prioritize the conservation of glucose, and reprogram their biology to maximize energy yields through enhanced mitochondrial respiration. Our results, with recent reports from the literature, indicate that PDAC metabolic program is dynamic and responds to ambient conditions, such as CDA invalidation, and that mitochondria in PDAC are often highly functional, and aerobic respiration is even critical for cancer cell survival (Birsoy *et al*, 2015, 2014; Zarei *et al*, 2017; Vaziri-Gohar *et al*, 2018; Ashton *et al*, 2018).

Interestingly, we found that the first steps of the TCA cycle are highly impacted in cells with low levels of CDA, as citrate and cis-aconitate production is strongly reduced in CDA deficient cells, while fumarate and α -ketoglutarate are not affected (data not shown). These latter observations are worth considering, given that IDH3A, which is responsible for the synthesis of α -ketoglutarate from isocitrate, is strongly repressed at the protein level in CDA deficient cells. The same is true for the enzyme SDHA, which is responsible for the oxidation of succinate to fumarate. This suggests that the production of α -ketoglutarate is compensated by anaplerotic reactions due to consumption of glutamine or glutamate. To validate this hypothesis, we deprived glutamine from culture media and used glutamine synthase inhibitors such as CB-839, but the profound antiproliferative effect consecutive to CDA depletion prevented us from assessing a potentially synergistic activity of this inhibitor (data not shown).

Short term experiments helped identify that mitochondrial failure was causative in the metabolic reprogramming and the antiproliferative and antitumoral effects observed following CDA targeting in PDAC cells, a situation that can also be observed when cells are treated with Antimycin A, a well-known respiratory chain inhibitor, which induces energetic reprogramming of cells towards glycolysis (Gohil *et al*, 2010). Our results show early structural changes in the mitochondria, such as a reduction in their thickness, and some evidences of mitophagy, when cells are depleted of CDA. However, mitochondrial dynamics remain obscure following CDA targeting, as we failed to identify modifications in OPA1 protein expression (short and long form), nor preferential phosphorylation in S616 or S637 of Drp1 (results not shown). These strongly suggest that the acute mitotic stress consecutive to CDA invalidation is too intense to be buffered by mitochondrial dynamics.

We next performed gain of function studies to further identify the consequences of CDA overexpression on cellular chondrioma, and measured a significant increase in mtDNA, associated with an increase in mitochondrial mass and ATP originating from OXPHOS. The link between the pyrimidine pool and mtDNA synthesis had already been reported several times, notably by J. Nikkanen and colleagues who show that a mutation of TWINKLE remodels the dNTP pool *in vivo* in a mouse model. The mitochondrial folate cycle is also altered, with increased biosynthesis of serine and glutathione, and reprogramming of the one-carbon metabolism pathway, which disrupts the DNA methylation pathway (Nikkanen *et al*, 2016). Also, long-term deficit of dNTP promotes mtDNA deletions in HeLa cells (Song *et al*, 2003), and the inhibition of *de novo* pyrimidine synthesis by Leflunomide that targets mitochondrial DHODH induces mitochondrial fusion and mitochondrial stress (Miret-Casals *et al*, 2018). The link between CDA and mitochondrial mass, however, has never been reported in the literature. Mitochondria have their own dNTP pool as well as mitochondrial specific enzymes such as TK2 which transforms thymidine into dTMP, or dGK which transforms deoxyguanosine into dGMP in order to make mtDNA synthesis precursors available, independently of the cell cycle (Rampazzo *et al*, 2004; Pontarin *et al*, 2003). It is interesting to mention that mitochondria are particularly sensitive to depletion of dCTP or excessive concentrations of dTTP consecutive to allosteric regulation of RNR (González-Vioque *et al*, 2011), a situation that is similar to CDA targeting in our study. Studies are currently ongoing to determine whether

CDA promotes mtDNA biogenesis or associates with factor that are essential to mitochondria biogenesis or function.

We next addressed the functional consequences for PDAC cells to express CDA. Surprisingly, CDA overexpression marginally impacts on cancer cell proliferation. On the other hand, CDA expression strongly enhances migratory potential as compared to control cells, the latter independently of EMT induction (data not shown) This was suggested by the study of the molecular signatures of cohorts of PDAC patients who overexpress this enzyme. We next asked whether this particular phenotype could be propelled by increasing mitochondrial capacity of PDAC cells. Indeed, it is now well established that mitochondria are key players in promoting metastatic tumor cells migration (da Silva *et al*, 2014). In particular, B. Cunniff and colleagues showed that mitochondria actively infiltrate lamellipods, to increase local concentration of ATP at the migration front (Cunniff *et al*, 2016). We found that PDAC cells treated with drugs targeting mitochondria, such as phenformin, demonstrated reduced migratory capacity, a situation largely overridden by CDA expression. In addition, preliminary experiments performed using patient-derived primary cells indicate that CDA expression levels are indicative of resistance to phenformin, atovaquonone and antimycin A antiproliferative effect (data not shown). Taken together, we confirm that mitochondrial capacity is essential to cancer cells migration, and for the first time, that CDA favors PDAC cell migration and protects cancer cells from drugs targeting mitochondrial function. Our work strongly suggests that CDA expression may drive therapeutic decision when treating PDAC patients with mitochondrial targeting drugs.

The results obtained during this study may be of further interest for the management of patients with PDAC. Indeed, we found that CDA expression is elevated in advanced tumors, is maintained during the dissemination process of PDAC PDX in mice, and that CDA expression promotes dissemination in experimental models of this disease. Previously, CDA activity in patients was used solely as a predictive marker of response to chemotherapy. Our results suggest that CDA expression could also represent a new marker for predicting tumor aggressiveness. In particular, CDA expression analysis could be applied to patients with resectable tumors, as high expression of CDA in primary tumor would indicate high risk of relapse, and thus represent an unfavorable marker for surgical intervention, or for patients

with locally advanced diseases, as CDA expression may advocate for the presence of undetected micrometastases, which would justify further investigation of patients and may change therapeutic management. In order to confirm these results, we will quantify CDA expression in tumor samples from patients from the prospective Bacap cohort, who present all stages of the disease, and whose response to therapy, particularly gemcitabine-based therapy, and progression-free and overall survival are known (Canivet *et al*, 2018). Last, our results advocate for targeting CDA for the therapy of PDAC; however, we found that current CDA inhibitors barely inhibit PDAC cell proliferation while sensitizing cells to chemotherapy (data not shown), strongly arguing that long-standing inhibition of CDA expression is needed to achieve therapeutic efficacy. We pioneered gene therapy for PDAC (Buscail *et al*, 2015), but shRNA delivery using non-viral or viral vectors can be cumbersome for this disease (Rouanet *et al*, 2017). On the other hand, recent studies report the use of synthetic exosomes for delivering KRASG12D siRNA *in vivo* in mouse model of PDAC (Kamerkar *et al*, 2017), that recently reached clinical-grade quality (Mendt *et al*, 2018). Given the difficulty of targeting and treating PDAC tumors in patients, further studies are needed to address whether CDA is a promising new therapeutic target for PDAC.

REFERENCES

- Amit M & Gil Z (2013) Macrophages increase the resistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine by upregulating cytidine deaminase. *Oncoimmunology* **2**: e27231
- Ashton TM, McKenna WG, Kunz-Schughart LA & Higgins GS (2018) Oxidative Phosphorylation as an Emerging Target in Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **24**: 2482–2490
- Bian B, Bigonnet M, Gayet O, Loncle C, Maignan A, Gilabert M, Moutardier V, Garcia S, Turrini O, Delpero J-R, Giovannini M, Grandval P, Gasmi M, Ouaiissi M, Secq V, Poizat F, Nicolle R, Blum Y, Marisa L, Rubis M, et al (2017) Gene expression profiling of patient-derived pancreatic cancer xenografts predicts sensitivity to the BET bromodomain inhibitor JQ1: implications for individualized medicine efforts. *EMBO Mol. Med.* **9**: 482–497
- Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, Bayraktar EC, Thiru P, Yucel B, Wang T, Chen WW, Clish CB & Sabatini DM (2014) Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature* **508**: 108–112
- Birsoy K, Wang T, Chen WW, Freinkman E, Abu-Remaileh M & Sabatini DM (2015) An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell* **162**: 540–551
- Bournet B, Pointreau A, Souque A, Oumouhou N, Muscari F, Lepage B, Senesse P, Barthet M, Lesavre N, Hammel P, Levy P, Ruszniewski P, Cordelier P & Buscail L (2012) Gene expression signature of advanced pancreatic ductal adenocarcinoma using low density array on endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP AI* **12**: 27–34
- Buscail L, Bournet B, Vernejoul F, Cambois G, Lulka H, Hanoun N, Dufresne M, Meulle A, Vignolle-Vidoni A, Ligat L, Saint-Laurent N, Pont F, Dejean S, Gayral M, Martins F, Torrisani J, Barbey O, Gross F, Guimbaud R, Otaï P, et al (2015) First-in-man phase I clinical trial of gene therapy for advanced pancreatic cancer: Safety, biodistribution and preliminary clinical findings. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*
- Camienner GW & Smith CG (1965) Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside—I: Enzyme distribution and species specificity. *Biochem. Pharmacol.* **14**: 1405–1416
- Canivet C, Gourgou-Bourgade S, Napoleon B, Palazzo L, Flori N, Guibert P, Piessen G, Farges-Bancel D, Seitz J-F, Assenat E, Vendrely V, Truant S, Vanbiervliet G, Berthelemy P, Garcia S, Gomez-Brouchet A, Buscail L & Bournet B (2018) A prospective clinical and biological database for pancreatic adenocarcinoma: the BACAP cohort. *BMC Cancer* **18**: 986
- Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul J-L, Choné L, Francois E, Artru P, Biagi JJ, Lecomte T, Assenat E, Faroux R, Ychou M, Volet J, Sauvanet A, Breysacher G, Di Fiore F, Cripps C, Kavan P, et al (2018) FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **379**: 2395–2406

Cunniff B, McKenzie AJ, Heintz NH & Howe AK (2016) AMPK activity regulates trafficking of mitochondria to the leading edge during cell migration and matrix invasion. *Mol. Biol. Cell* **27**: 2662–2674

Diaz-Riascos ZV, Ginesta MM, Fabregat J, Serrano T, Busquets J, Buscail L, Cordelier P & Capellá G (2019) Expression and Role of MicroRNAs from the miR-200 Family in the Tumor Formation and Metastatic Propensity of Pancreatic Cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **17**: 491–503

Ebrahem Q, Mahfouz R, Ng KP & Sauntharajah Y (2012) High cytidine deaminase expression in the liver provides sanctuary for cancer cells from decitabine treatment effects. *Oncotarget* **3**: 1137–1145

Geller LT, Barzily-Rokni M, Danino T, Jonas OH, Shental N, Nejman D, Gavert N, Zwang Y, Cooper ZA, Shee K, Thaiss CA, Reuben A, Livny J, Avraham R, Frederick DT, Ligorio M, Chatman K, Johnston SE, Mosher CM, Brandis A, et al (2017) Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science* **357**: 1156–1160

Gohil VM, Sheth SA, Nilsson R, Wojtovich AP, Lee JH, Perocchi F, Chen W, Clish CB, Ayata C, Brookes PS & Mootha VK (2010) Discovery and therapeutic potential of drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. *Nat. Biotechnol.* **28**: 249–255

Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, Park J-O, Hochhauser D, Arnold D, Oh D-Y, Reinacher-Schick A, Tortora G, Algül H, O'Reilly EM, McGuinness D, Cui KY, Schlienger K, Locker GY & Kindler HL (2019) Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**: 317–327

González-Vioque E, Torres-Torronteras J, Andreu AL & Martí R (2011) Limited dCTP Availability Accounts for Mitochondrial DNA Depletion in Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet.* **7**: Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3069123/> [Accessed September 30, 2019]

Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, Lee JJ & Kalluri R (2017) Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* **546**: 498–503

Kappler L, Li J, Häring H-U, Weigert C, Lehmann R, Xu G & Hoene M (2016) Purity matters: A workflow for the valid high-resolution lipid profiling of mitochondria from cell culture samples. *Sci. Rep.* **6**: 21107

Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Hruban RH & Neoptolemos JP (2016) Pancreatic cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**: 16022

Martano G, Delmotte N, Kiefer P, Christen P, Kentner D, Bumann D & Vorholt JA (2015) Fast sampling method for mammalian cell metabolic analyses using liquid chromatography-mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **10**: 1–11

Mendt M, Kamerkar S, Sugimoto H, McAndrews KM, Wu C-C, Gagea M, Yang S, Blanko EVR, Peng Q, Ma X, Marszalek JR, Maitra A, Yee C, Rezvani K, Shpall E, LeBleu VS & Kalluri R (2018) Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *JCI Insight* **3**:

- Miret-Casals L, Sebastián D, Brea J, Rico-Leo EM, Palacín M, Fernández-Salguero PM, Loza MI, Albericio F & Zorzano A (2018) Identification of New Activators of Mitochondrial Fusion Reveals a Link between Mitochondrial Morphology and Pyrimidine Metabolism. *Cell Chem. Biol.* **25**: 268-278.e4
- Neff T & Blau CA (1996) Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp. Hematol.* **24**: 1340–1346
- Neoptolemos JP, Kleeff J, Michl P, Costello E, Greenhalf W & Palmer DH (2018) Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **15**: 333–348
- Nikkanen J, Forsström S, Euro L, Paetau I, Kohnz RA, Wang L, Chilov D, Viinamäki J, Roivainen A, Marjamäki P, Liljenbäck H, Ahola S, Buzkova J, Terzioglu M, Khan NA, Pirnes-Karhu S, Paetau A, Lönnqvist T, Sajantila A, Isohanni P, et al (2016) Mitochondrial DNA Replication Defects Disturb Cellular dNTP Pools and Remodel One-Carbon Metabolism. *Cell Metab.* **23**: 635–648
- Perera RM & Bardeesy N (2015) Pancreatic Cancer Metabolism: Breaking It Down to Build It Back Up. *Cancer Discov.*
- Pontarin G, Gallinaro L, Ferraro P, Reichard P & Bianchi V (2003) Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: Dynamic relations to cytosolic pools. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 12159–12164
- Rampazzo C, Ferraro P, Pontarin G, Fabris S, Reichard P & Bianchi V (2004) Mitochondrial Deoxyribonucleotides, Pool Sizes, Synthesis, and Regulation. *J. Biol. Chem.* **279**: 17019–17026
- du Rieu MC, Torrisani J, Selves J, Al Saati T, Souque A, Dufresne M, Tsongalis GJ, Suriawinata AA, Carrère N, Buscail L & Cordelier P (2010) MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin. Chem.* **56**: 603–612
- Rooney JP, Ryde IT, Sanders LH, Howlett EH, Colton MD, Germ KE, Mayer GD, Greenamyre JT & Meyer JN (2015) PCR based determination of mitochondrial DNA copy number in multiple species. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1241**: 23–38
- Rouanet M, Lebrin M, Gross F, Bournet B, Cordelier P & Buscail L (2017) Gene Therapy for Pancreatic Cancer: Specificity, Issues and Hopes. *Int. J. Mol. Sci.* **18**:
- Serdjebi C, Seitz J-F, Ciccolini J, Duluc M, Norguet E, Fina F, Lacarelle B, Ouafik L & Dahan L (2013) Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen. *Pharmacogenomics* **14**: 1047–1051
- Sicard F, Gayral M, Lulka H, Buscail L & Cordelier P (2013) Targeting miR-21 for the Therapy of Pancreatic Cancer. *Mol. Ther.* Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/mt.2013.35> [Accessed March 18, 2013]
- Siegel RL, Miller KD & Jemal A (2016) Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **66**: 7–30
- da Silva AF, Mariotti FR, Máximo V & Campello S (2014) Mitochondria dynamism: of shape, transport and cell migration. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**: 2313–2324

Song S, Wheeler LJ & Mathews CK (2003) Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* **278**: 43893–43896

Vaziri-Gohar A, Zarei M, Brody JR & Winter JM (2018) Metabolic Dependencies in Pancreatic Cancer. *Front. Oncol.* **8**: 617

Zarei M, Lal S, Parker SJ, Nevler A, Vaziri-Gohar A, Dukleska K, Mambelli-Lisboa NC, Moffat C, Blanco FF, Chand SN, Jimbo M, Cozzitorto JA, Jiang W, Yeo CJ, Londin ER, Seifert EL, Metallo CM, Brody JR & Winter JM (2017) Posttranscriptional Upregulation of IDH1 by HuR Establishes a Powerful Survival Phenotype in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res.* **77**: 4460–4471

Zauri M, Berridge G, Thézéas M-L, Pugh KM, Goldin R, Kessler BM & Kriaucionis S (2015) CDA directs metabolism of epigenetic nucleosides revealing a therapeutic window in cancer. *Nature* **524**: 114–118

TABLES

Table 1:

Metastasis localization	% of animals with control tumors with metastasis	% of animals with CDA-overexpressing tumors with metastasis
Liver	60	100
Ovary	40	80
Ascites	60	100
Spleen	20	20
Peritoneum	20	20
Kidney	0	40
Diaphragm	20	60

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by *Fondation Toulouse Cancer Santé* and *Fondation Total*. The authors would like to thank Pr Arnauné and Dr Frezza for fruitful discussions, and Prof Avet-Loiseau for granting access to transcriptomic facility. In loving memory of Alix Vignolle-Vidoni.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 : CDA is over-expressed in pancreatic cancer and is associated with a bad prognosis.

- A.** Expression of CDA mRNA in pancreatic tumors and matched normal tissue (n=37) from CHU Toulouse and Idibell cohorts. ***p<0.001 (Wilcoxon test)
- B.** Kaplan Meyer survival plot for CDA expression in PDAC patients with advanced tumors (n=41)

Fig. 2 : Genetic invalidation of CDA impairs pancreatic cancer growth and induces cell death by apoptosis

- A.** Daily proliferation rate of CDA-depleted cells vs control from day 1 after transduction to 14 days following transduction (MiaPACA2). Mean of four independent experiments from four different transductions. *, **, *** : p-value < 0.05, 0.01, 0.001 respectively (paired t-test)
- B.** Colony formation assay of CDA-depleted vs control cells, D14 following transduction. Representative of four independent experiments performed from four different transductions and mean quantification of colony areas. ** : p-value < 0.01 respectively (paired t-test)
- C.** Loss of mitochondrial membrane potential assessed by TMRE staining, 3 days following transduction. Mean of six independent experiments from six different transductions. * : p-value < 0.05 (paired t-test)
- D.** Annexin V staining of pancreatic cancer cells, 6 to 10 days following transduction. Mean of four independent experiments from three different transductions. * : p-value < 0.05 (paired t-test)
- E.** Western blotting of key apoptotic proteins: cleaved PARP, cleaved caspase 3 in CDA-depleted vs control cells representative of seven and five independent experiments respectively, 6 to 10 days following transduction.
- F.** Representative Tumor formation and growth monitoring in mice injected with CDA-depleted vs control cells
- G.** Mean quantification of tumor growth assessed by luminescence (n= 15 per group). (*: p-value<0.05, **: p-value<0.01, ***:p-value<0.005, paired t-test)

Fig. 3 : CDA depletion in pancreatic cancer cells increases glycolysis

A. Transcriptomics data enrichment analysis of up-regulated genes in CDA-depleted vs control cells, 14 days following transduction.

B. Western blotting for hexokinase II, phosphofructokinase platelet and (phospho-) lactate dehydrogenase in CDA-depleted vs control cells. Mean quantification of at least three independent experiments for each blot.

C. Percentage of ATP produced by glycolysis in CDA-depleted vs control cells 14 days following transduction. Mean of ten experiments from five different transductions. ** : p-value < 0.01 (paired t-test)

E. Metabolomics analysis of fructose-1,6-bisphosphate levels in CDA-depleted vs control cells 14 days following transduction. Mean of three independent experiments from three different transductions. * : p-value < 0.05 (paired one-sided t-test)

F. Metabolomics analysis of 2-phosphoglycerate levels in CDA-depleted vs control cells 14 days following transduction. Mean of three independent experiments from three different transductions. * : p-value < 0.05 (paired one-sided t-test)

Fig. 4 : CDA depletion in pancreatic cancer cells impairs mitochondrial functions

- A.** Western blotting for isocitrate dehydrogenase and succinate dehydrogenase in CDA-depleted cells vs control. Mean quantification of at least three experiments.
- B.** Percentage of ATP produced by oxidative phosphorylation in mitochondria in CDA-depleted vs control cells at D14. Mean of ten experiments from five different transductions. **: p-value < 0.01 (paired t-test)
- C.** Oxygen consumption rate measurement by Seahorse in CDA-depleted and control cells. Mean of four experiments from four different transductions. *, **: p-value < 0.05, 0.001 respectively (paired t-test)
- D.** Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production assessed by flow cytometry using the fluorescent dye MitoSox in CDA-depleted cells vs control. Mean of nine independent experiments from nine different transductions. * : p-value < 0.05 (paired t-test)
- E.** Mitochondrial mass assessed by flow cytometry using the fluorescent dye MitoTracker Green (MTG) in CDA-depleted and control cells. Mean of five experiments from five different transductions. * : p-value < 0.05 (paired t-test).
- F.** PCR based determination of mitochondrial DNA (mtDNA) copy number relatively to genomic DNA (gDNA) in CDA-depleted and control cells. Mean of five experiments from four different transductions. * : p-value < 0.05 (paired t-test).
- G.** Metabolomics data of citrate levels in CDA-depleted cells vs control. *** : p-value < 0.001 (paired t-test)
- H.** Metabolomics data of cis-aconitate levels in CDA-depleted cells vs control. *** : p-value < 0.001 (paired t-test)
- I.** Metabolomics data of succinate levels in CDA-depleted cells vs control. * : p-value < 0.05 (paired t-test)
- J.** Western blotting of Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3-I) and LC3-phosphatidylethanolamine (LC3-II) in CDA-depleted and control cells. Representative of 2 experiments, from two different sets of transduction.

Fig. 5 : Mitochondrial defects occur early following CDA depletion

A. PCR based determination of mitochondrial DNA (mtDNA) copy number relatively to genomic DNA (gDNA) 2 days after transduction. Mean of four experiments from four different transductions. * : p-value < 0.05 (paired t-test).

B. Mitochondrial membrane potential assessed by flow cytometry using TMRE dye in CDA-depleted vs control cells 2 days after transduction. Mean of five independent experiments from five different transductions. * : p-value < 0.05 (paired t-test)

C. Western blotting for isocitrate dehydrogenase and succinate dehydrogenase in CDA-depleted cells vs control 2 days after transduction. Mean quantification of at least three experiments.

D. Western blotting of respiration complexes in CDA-depleted cells and control 2 days after transduction. Mean quantification of three independent experiments from three different transductions.

E. Western blotting of the mitochondrial transcription factor TFAM in CDA-depleted cells and control 2 days after transduction. Mean quantification of three independent experiments from three different transductions.

F. Transmission electronic microscopy images of mitochondria in CDA-depleted and control cells 2 days after transduction.

G. Quantification of the mean number of mitochondria per field visible by MET in CDA-depleted vs control cells 2 days after transduction. (n=17 cells per group from two different transduction batches). * : p-value < 0.05 (t-test)

H. Quantification of length of mitochondria in CDA-depleted vs control cells 2 days after transduction. (n=330 and 334 mitochondria from two different transduction batches). * : p-value < 0.05 (Mann-Whitney test)

I. Quantification of width of mitochondria in CDA-depleted vs control cells 2 days after transduction. (n=330 and 334 mitochondria from two different transduction batches). *** : p-value < 0.001 (Mann-Whitney test)

Fig. 6 : CDA increases mitochondrial biogenesis

A. Mitochondrial mass assessed by flow cytometry using the fluorescent dye MitoTracker Red (MTR) in CDA-overexpressing vs control cells. Mean of six experiments. * : p-value < 0.05 (paired t-test)

B. PCR based determination of mitochondrial DNA (mtDNA) copy number relatively to genomic DNA (gDNA). Mean of six experiments. * : p-value < 0.05 (paired t-test)

C. Percentage of ATP from OxPhos in CDA-overexpressing and control cells. Mean of six experiments from three different transductions. * : p-value < 0.05 (paired t-test)

D. Western blotting of key krebs cycle enzymes: isocitrate dehydrogenase and succinate dehydrogenase, respiration complexes and TFAM in CDA-overexpressing and control cells. Mean quantification of at least six experiments.

E. Proliferation assessed by Incucyte of CDA-depleted and control cells transduced with vectors coding CDA or GFP. Representative of 2 different sets of transduction.

Fig. 7 : CDA expression is associated with PDAC aggressive phenotype and promotes migration *in vitro* and metastasis in experimental models of this disease

- A.** GSEA correlation of TCGA-derived molecular signature with motility and migration signature.
- B.** GSEA correlation of TCGA-derived molecular signature with EMT signature.
- C.** CDA mRNA expression in human patient-derived xenografts (Marseilles' cohort), classified as "basal" or "classic" (n=90).
- D.** Expression of CDA mRNA in localized (resectable, n=12) and in advanced pancreatic tumors (n=52). *: p<0.05 (unpaired t-test)
- E.** Expression of CDA mRNA in PDX primary tumors (n=13) and corresponding metastasis (n=17).
- F.** Migration of CDA-overexpressing cells vs control measured with the IncuCyte. Mean of nine experiments from three different transductions. *, **, *** : p-value < 0.05, 0.01, 0.001 respectively (paired t-test)
- G.** Inhibition of migration of CDA-overexpressing cells vs control, treated with phenformin. Mean of three experiments from three different transductions. *, **, *** : p-value < 0.05, 0.01, 0.001 respectively (paired t-test)

FIGURE 1

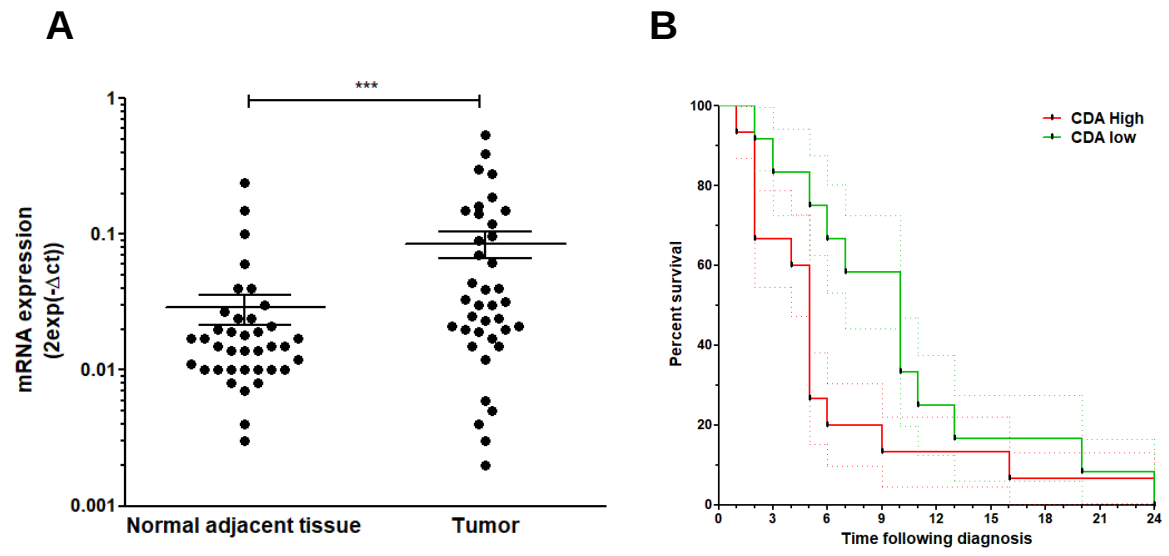


FIGURE 2

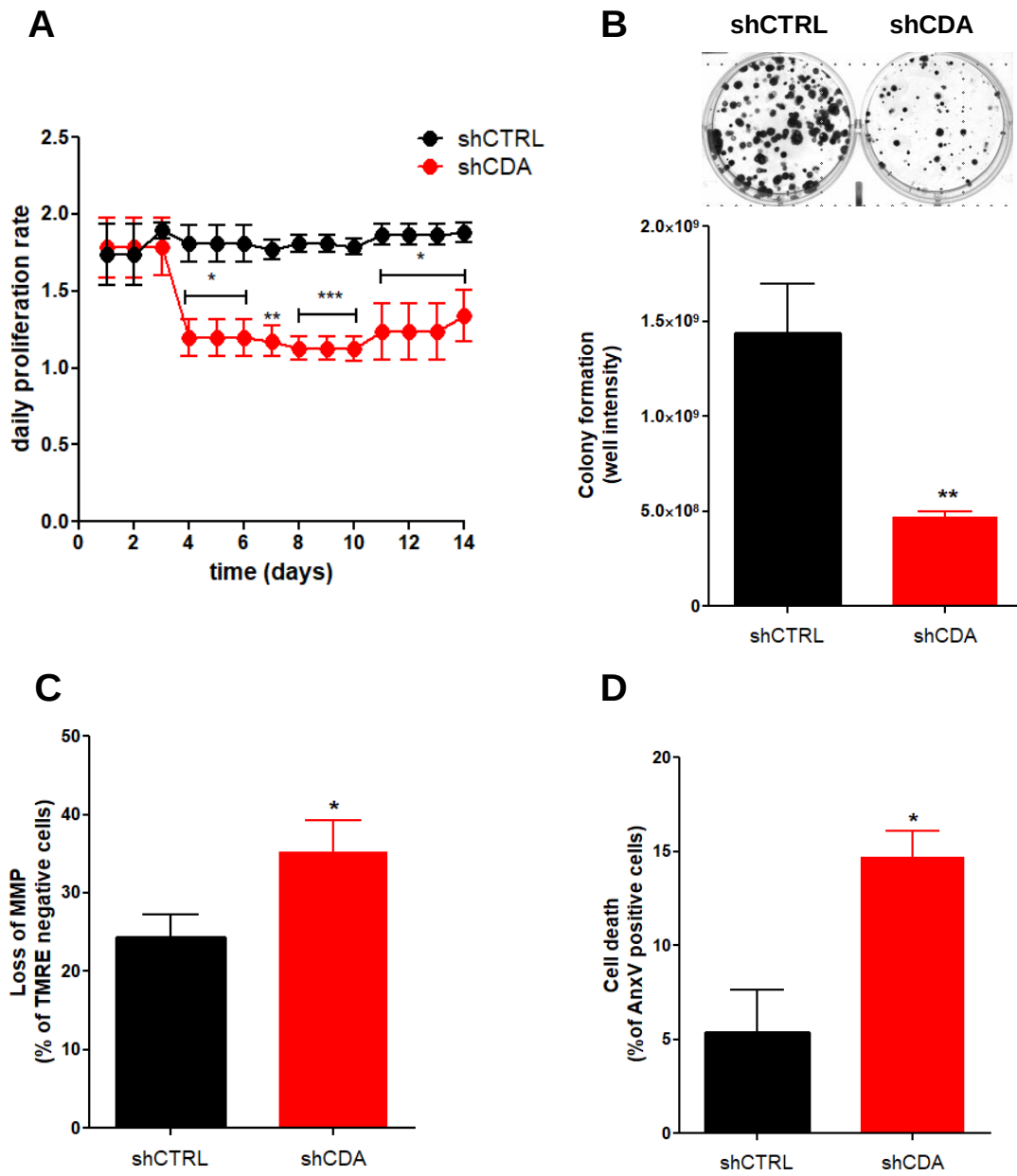
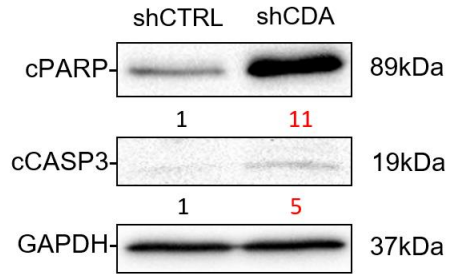
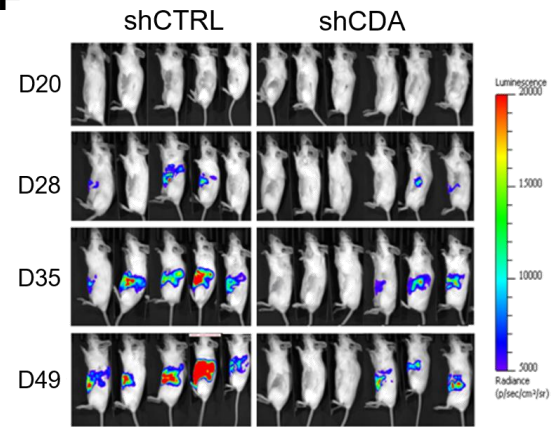


FIGURE 2

E



F



G

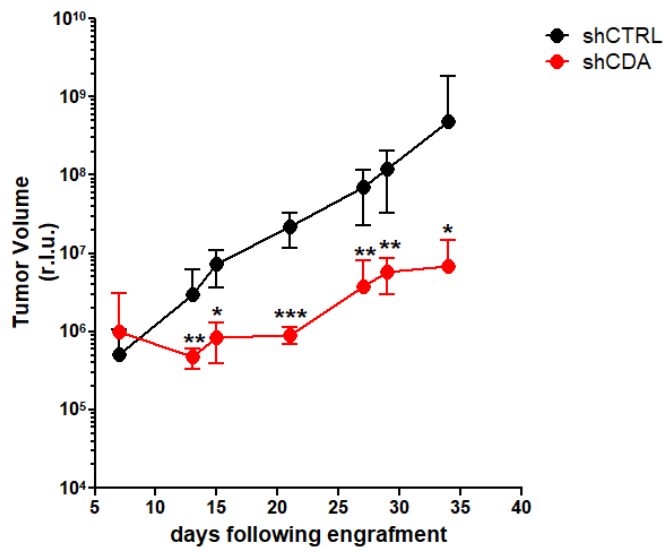
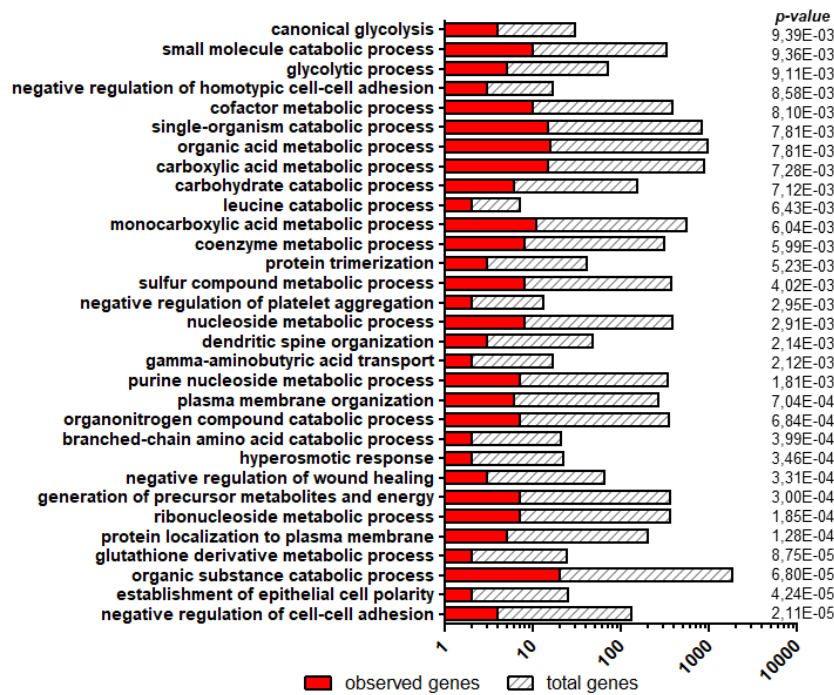


FIGURE 3

A



B

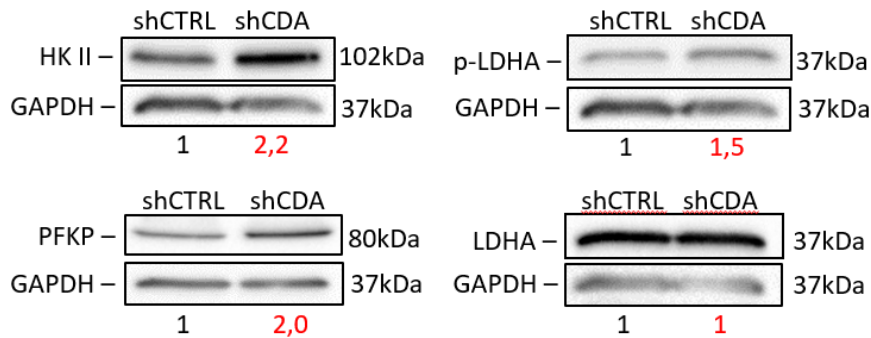
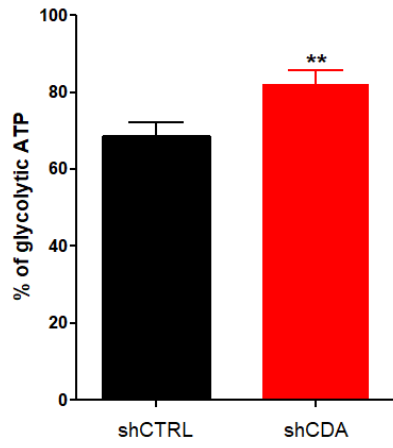
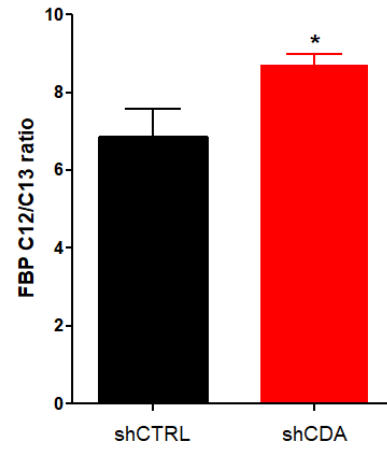


FIGURE 3

C



D



E

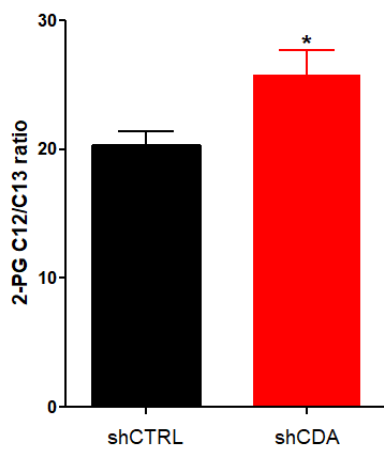
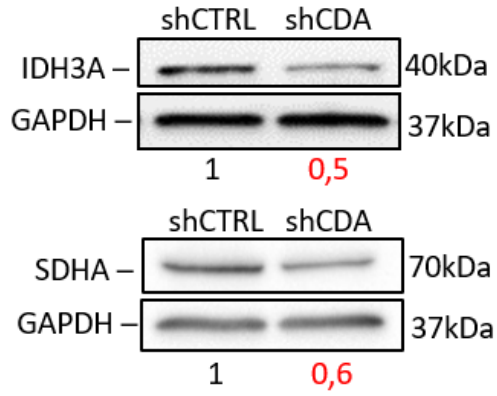
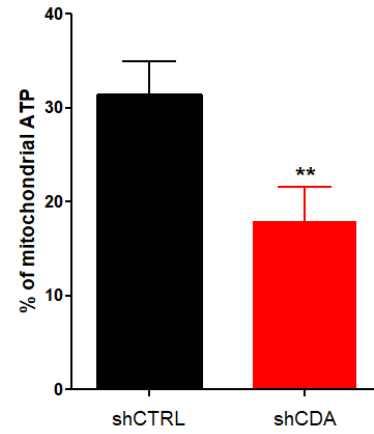


FIGURE 4

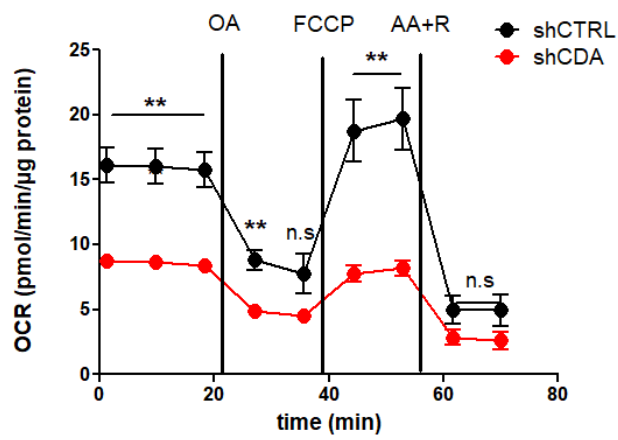
A



B



C



D

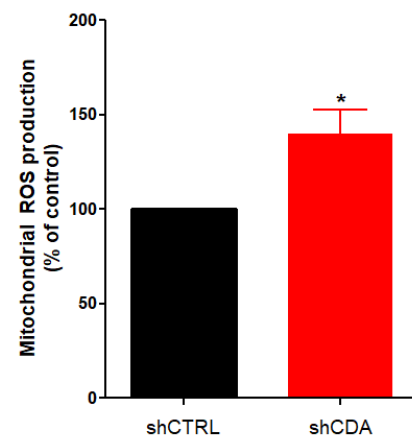


FIGURE 4

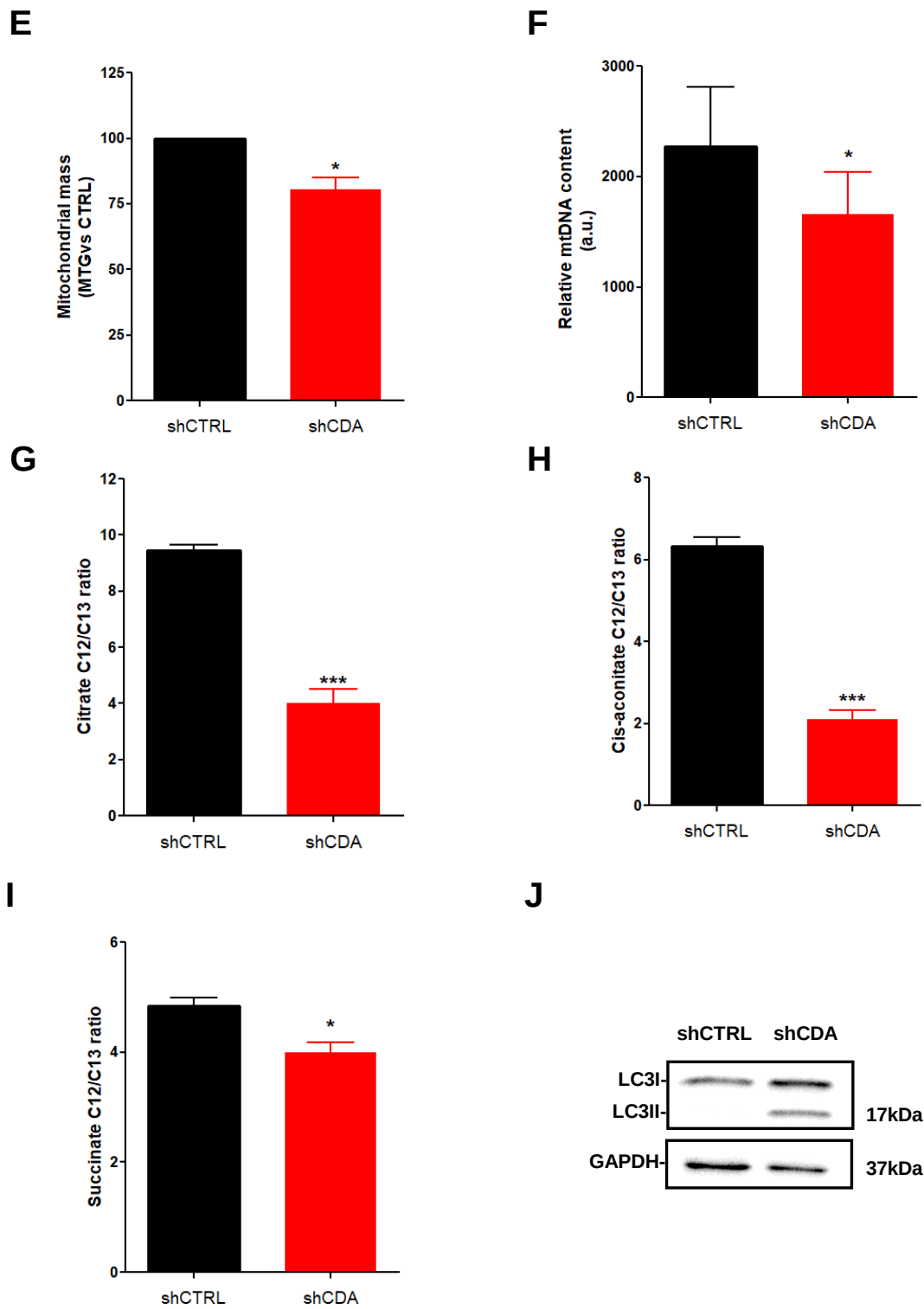


FIGURE 5

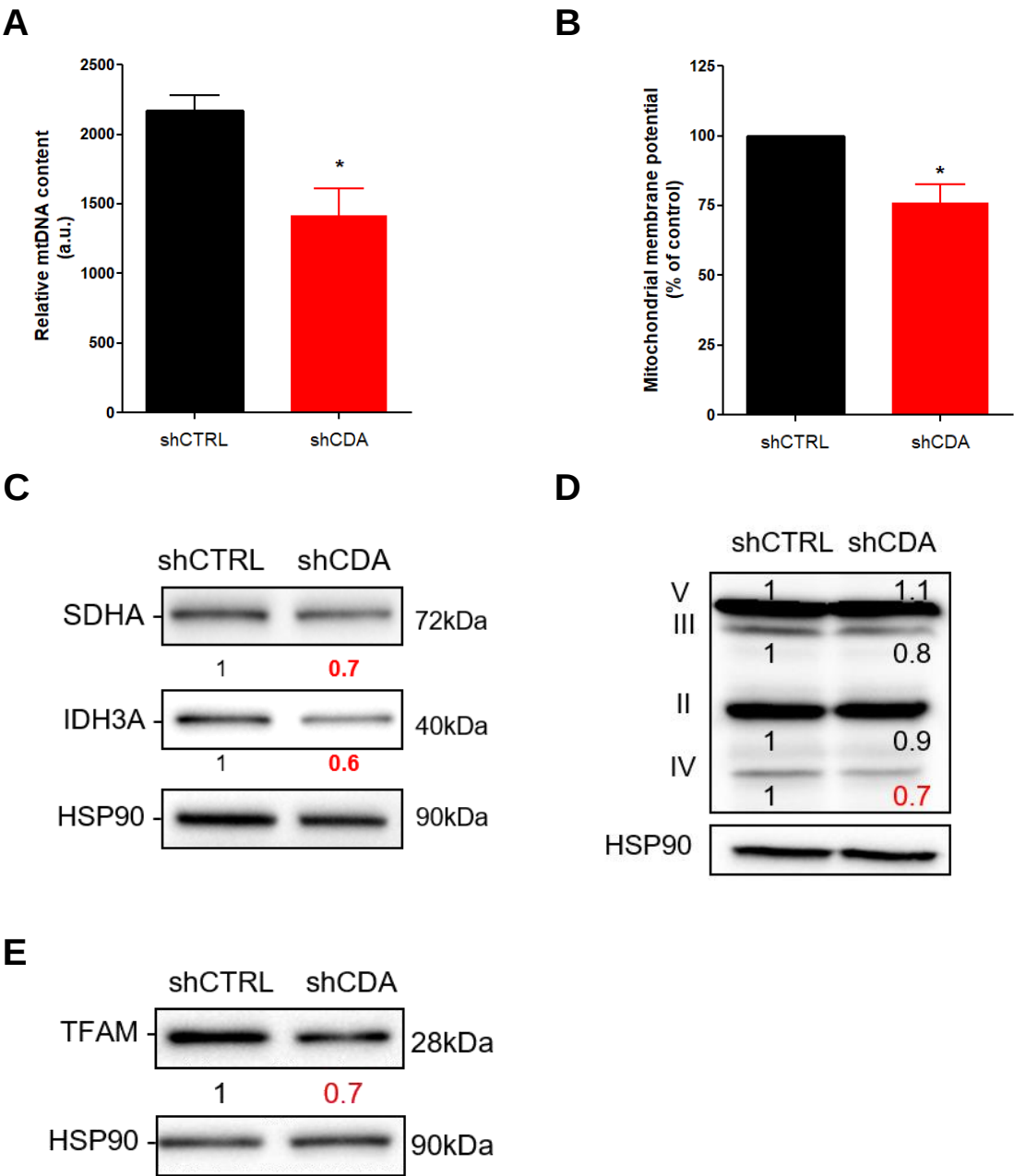


FIGURE 5

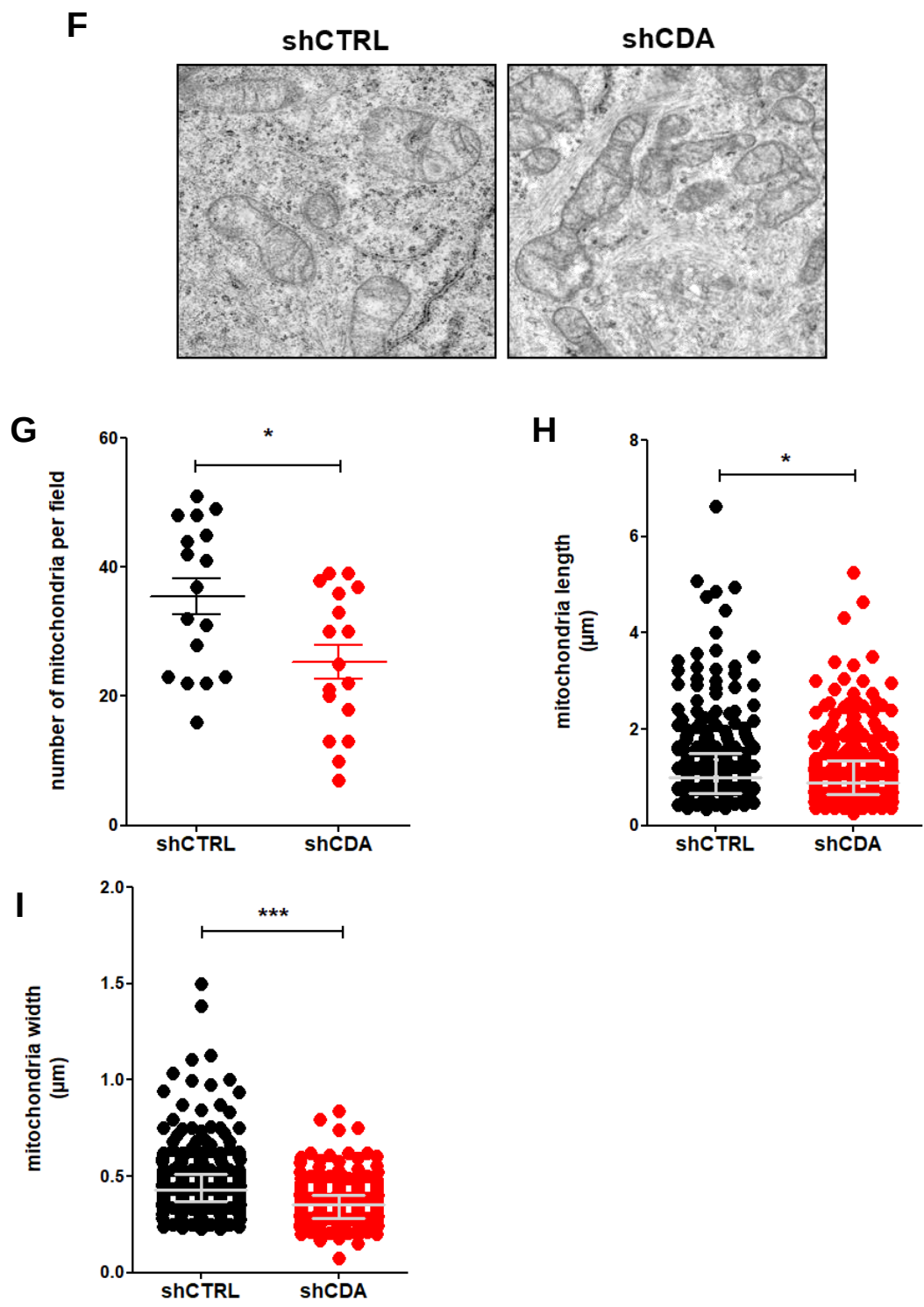


FIGURE 6

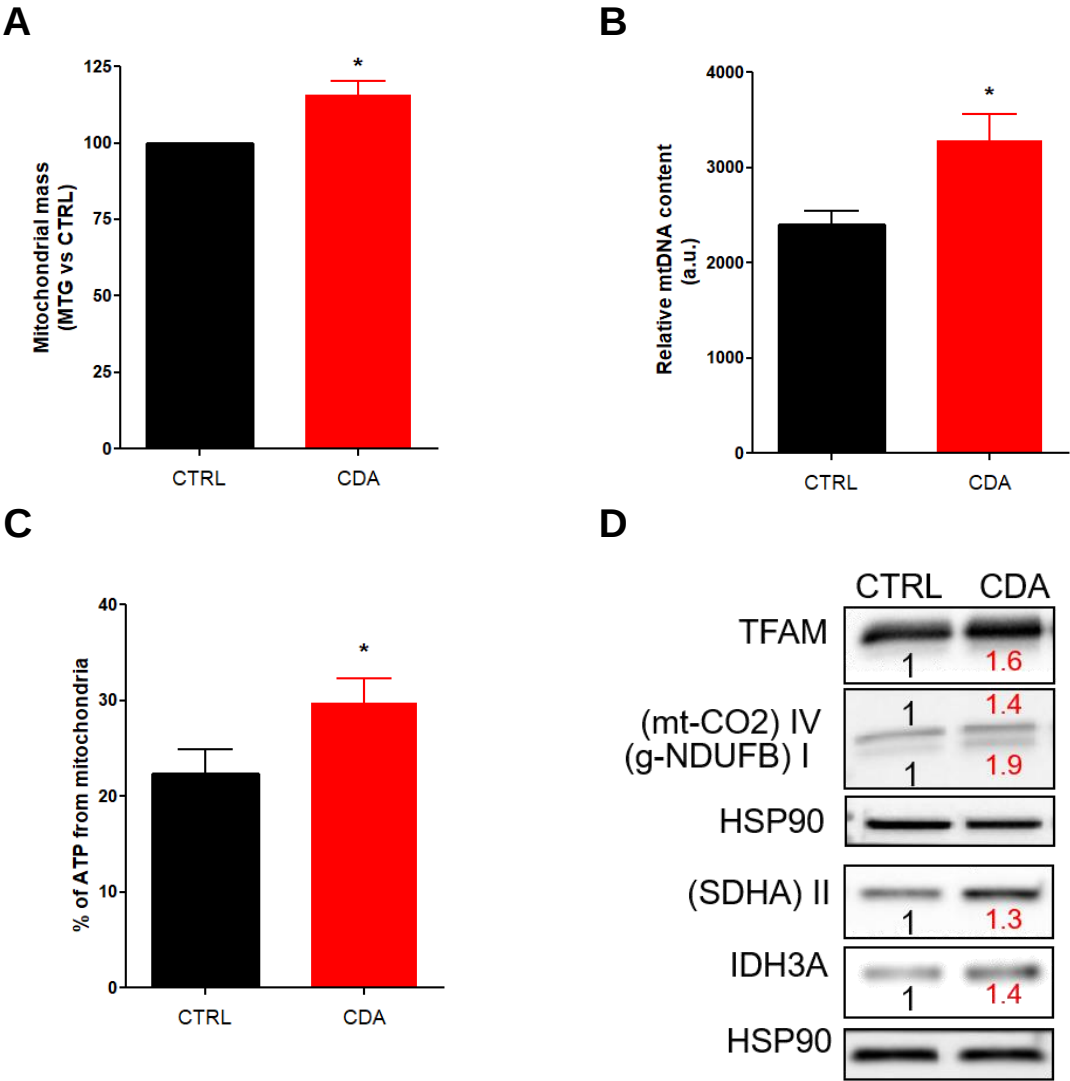


FIGURE 6

E

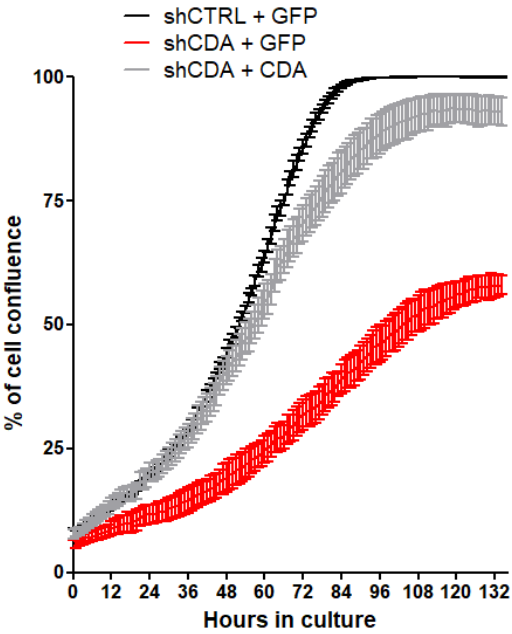
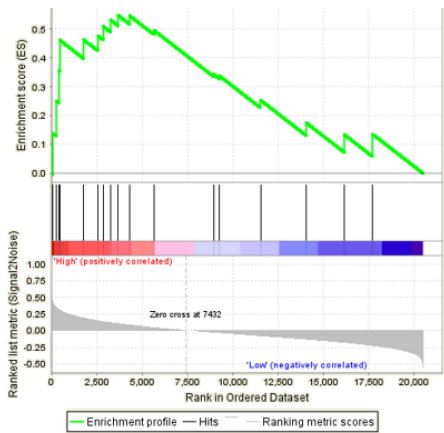
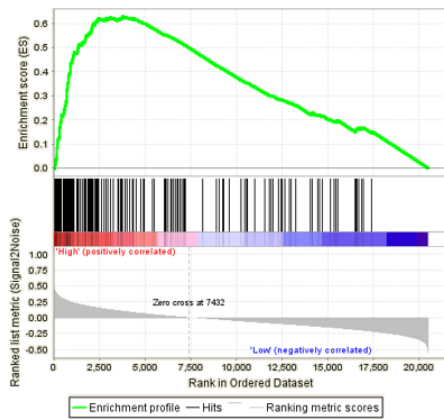


FIGURE 7

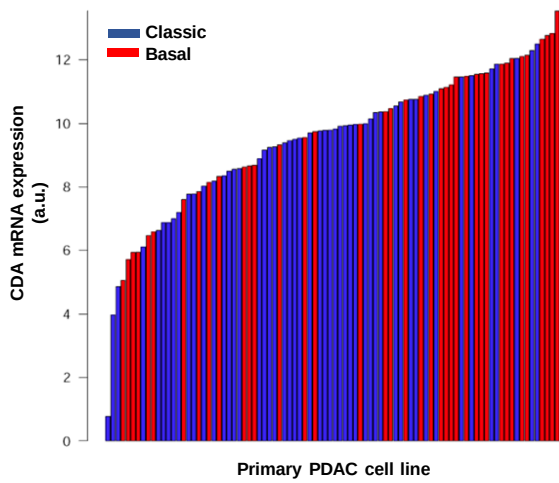
A



B



C



D

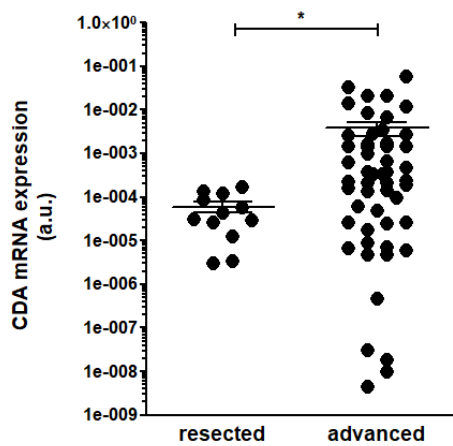
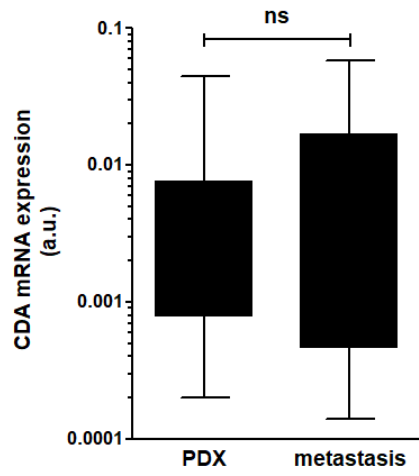
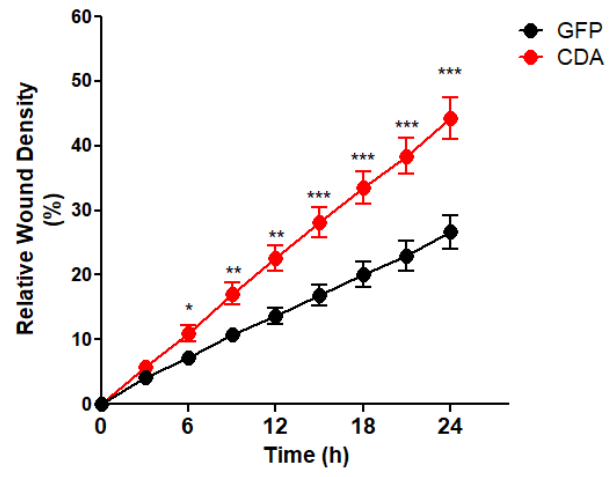


FIGURE 7

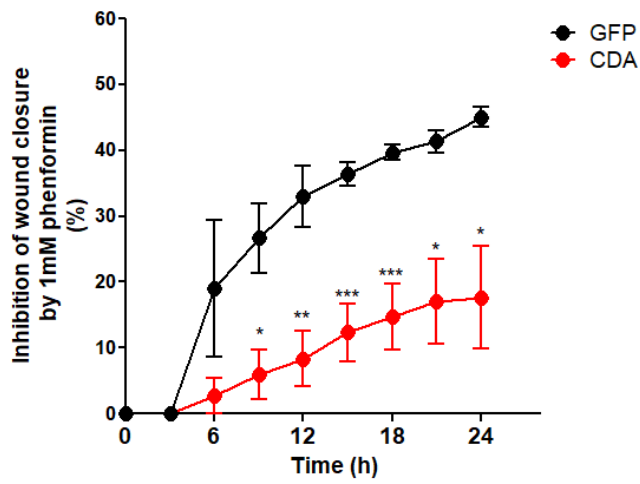
E



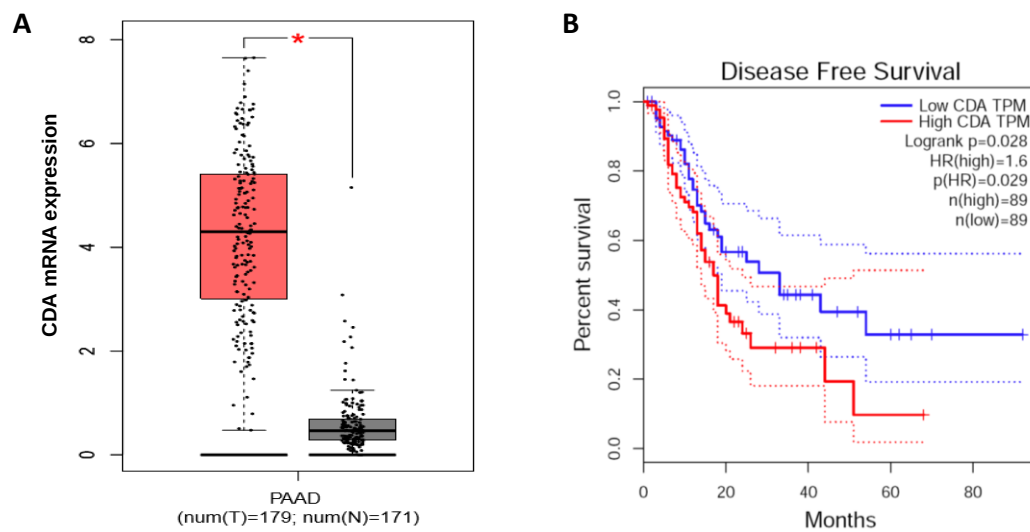
F



G

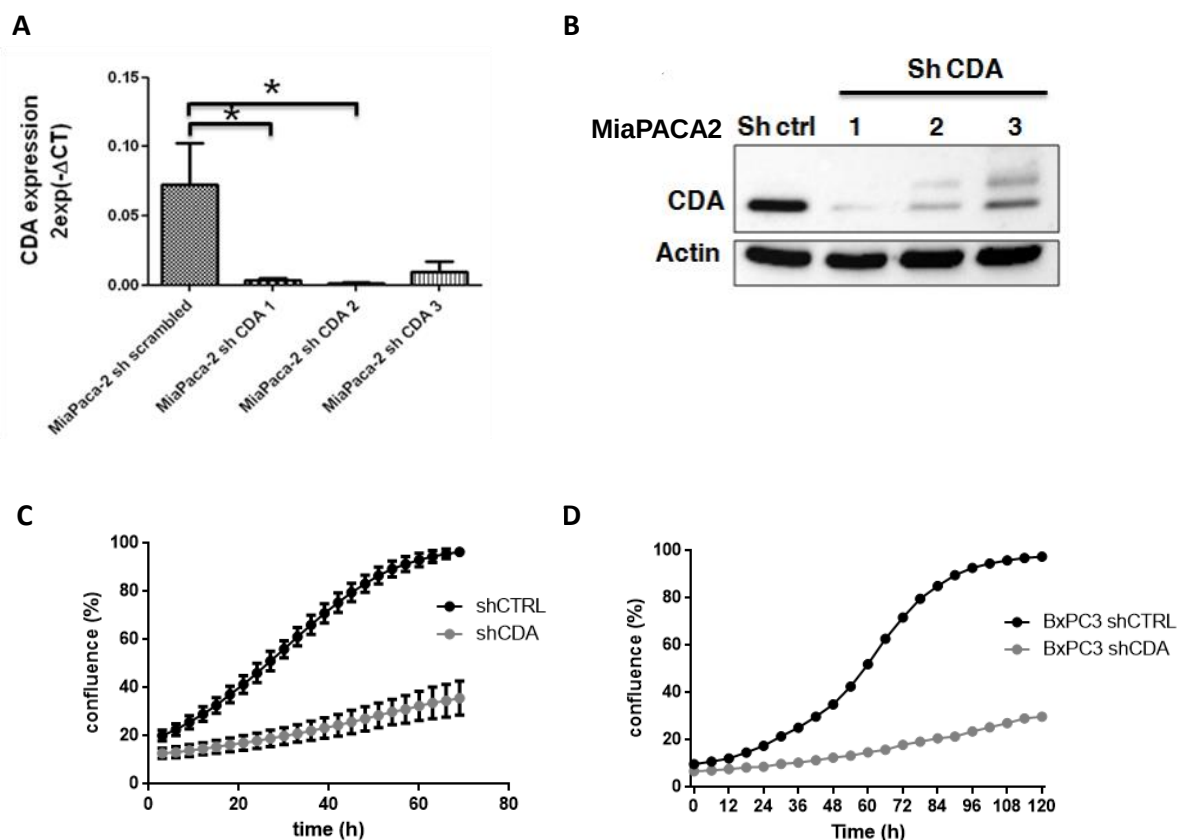


Supplementary figure 1:



Supp. Fig. 1: A. Expression of CDA mRNA in pancreatic tumors (in red =179 patients from TCGA) and normal pancreas (in grey =171). * $p < 0.05$ (non paired t-test). **B.** Kaplan Meyer survival plot for CDA expression in PDAC patients (source Gepia)

Supplementary figure 2:



Supp. Fig. 2: **A.** CDA mRNA expression in CDA-depleted cells with three different shRNAs vs control cells (MiaPACA2). Mean of three independent experiments. * : p-value < 0.05 (paired t-test) **B.** Western blotting of CDA in CDA-depleted cells with three different shRNAs and control cells (MiaPACA2). Representative of three independent experiments. **C.** Proliferation of CDA-depleted and control cells (MiaPACA2) measured with the IncuCyte 6 days following transduction. Representative of at least three independent experiments. **D.** Proliferation of CDA-depleted and control cells (BxPC3) measured with the IncuCyte. Representative of two independent experiments.

Supplementary figure 3:

A

Down-regulated genes in shCDA vs shCTRL

Gene Symbol	Fold change	Gene Symbol	Fold change	Gene Symbol	Fold change
CDA	0,05	TSPAN15	0,36	DHRS1	0,45
ITGB4	0,12	CFL2	0,37	FDXR	0,45
MUC1	0,14	AKT3	0,37	EMC1	0,46
TNFSF15	0,14	ZNF581	0,37	HK2	0,46
MEX3C	0,17	TTC30A	0,37	GSTA4	0,46
SSPN	0,17	CYS1	0,38	RSPH3	0,46
TCF7	0,18	ISCA2	0,38	ZNF233	0,46
PFKFB4	0,18	MAVS	0,38	FAM217B	0,46
ALOX5AP	0,19	GSTK1	0,38	EHBP1L1	0,46
ALDH3A2	0,20	IFT140	0,38	TRIB2	0,46
CEACAM1	0,20	LPPR3	0,39	BCKDHB	0,46
FUT11	0,21	NPAS2	0,39	PRKAG1	0,46
ENO2	0,21	TBC1D5	0,39	MATK	0,46
HNMT	0,21	PTK7	0,39	SUMF2	0,47
CNIH1	0,22	ARHGEF37	0,39	TMEM87B	0,47
SYF2	0,23	EPHB2	0,40	MPP5	0,47
CNIH3	0,24	GPR162	0,40	GLIS2	0,47
METTL10	0,26	CDK19	0,41	TNRC6C-AS1	0,47
SLC2A12	0,27	SKI	0,42	HPS1	0,47
RETSAT	0,27	PIGN	0,42	MAP2K5	0,47
NXT2	0,27	PEX6	0,42	PFKL	0,47
ITGA3	0,27	CXXC5	0,42	CD109	0,48
MIR210HG	0,28	MPP5	0,42	AHNAK2	0,48
OCLN	0,30	CCNDBP1	0,42	TOLLIP-AS1	0,48
MED28	0,30	SSH3	0,42	TLDC1	0,48
TMEM56	0,31	GTF3C3	0,43	ANK1	0,49
FYTTD1	0,31	SFXN3	0,43	DPH5	0,49
CCM2L	0,31	TMEM37	0,43	DENND5B	0,49
SLC6A12	0,32	GALNT7	0,43	TLE6	0,49
YPEL2	0,32	EML2-AS1	0,43	USP25	0,49
ACE	0,33	STAU2	0,44	WDR82	0,49
PLXNA3	0,33	C1QTNF6	0,44	PGAP1	0,49
CFD	0,33	TACC2	0,44	LRSAM1	0,49
TRIM37	0,33	TRIB2	0,44	CTDSP2	0,49
SYNC	0,34	EHD2	0,45	EIF3E	0,49
FNDC3A	0,34	OARD1	0,45	NGEF	0,49
FAM175A	0,35	ABAT	0,45	TMEM256	0,50
GRIP2	0,35	CPS1	0,45	MCCC1	0,50
ETHE1	0,36	SNX21	0,45	TCAIM	0,50
		HMGCL	0,45	PMVK	0,50

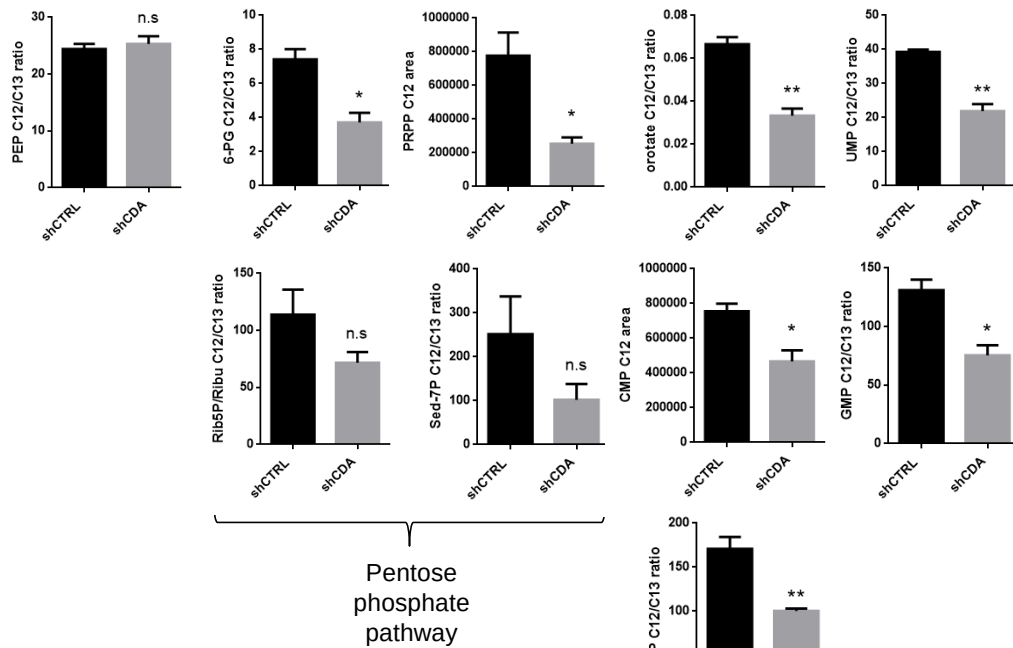
B

Up-regulated genes in shCDA vs shCTRL

Gene Symbol	Fold change	Gene Symbol	Fold change	Gene Symbol	Fold change
SLC19A2	4,28	SCAF11	2,63	DICER1	2,23
CLDN1	4,10	GALNT10	2,63	LRP12	2,21
PHLDB2	3,92	ELL2	2,59	BPTF	2,19
CALML4	3,62	PCBP2	2,52	LRPPRC	2,18
NUDT11	3,59	JMJD1C	2,49	BAMBI	2,17
GLTP	3,57	YARS	2,47	DDX23	2,17
GADD45A	3,42	TAF5	2,47	INIP	2,15
TAF5L	3,35	TRAPPC10	2,47	RPIA	2,13
GLTP	3,34	CHAC1	2,46	CA5BP1	2,10
KIF23	3,28	SMCO4	2,43	PNP	2,10
PID1	3,00	GCNT2	2,43	HIST1H2AM	2,09
SAMD4A	2,87	HIST1H2BH	2,37	YOD1	2,09
H2BFS	2,81	CBX5	2,35	COX7B	2,06
SARS	2,78	GPATCH2L	2,28	BTG3	2,05
MAPRE2	2,71	GNG4	2,25	IFT57	2,01

Supplementary figure 3:

C



D

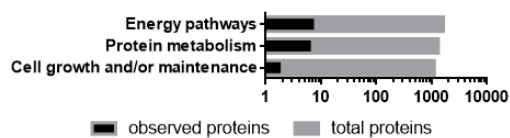
DOWN in shCDA vs shCTRL

SERPINB9	Serpin B9	-2,76
PSME1	Proteasome activator complex subunit 1	-2,44
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	-2,23
UQCRC1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	-2,02
CAPG	Macrophage-capping protein	-1,81
ECHS1	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	-1,7
PMPCB	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	-1,65
WARS	Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	-1,59
ERLIN2	Erlin-2	-1,59
IMMT	Mitochondrial inner membrane protein	-1,59
PDHB	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mito	-1,56
PHB	Prohibitin	-1,54

UP in shCDA vs shCTRL

GARS	Glycyl-tRNA synthetase	2,04
UAP1	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	1,83
Vimentin	Vimentin	1,76
FKBP4	FK506-binding protein 4	1,72
AHCY	Adenosylhomocysteinase	1,58
actin	Actin, cytoplasmic	1,55
EIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I	1,55
HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	1,55
V-ATPase	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	1,55
ENO1	Alpha-enolase	1,51

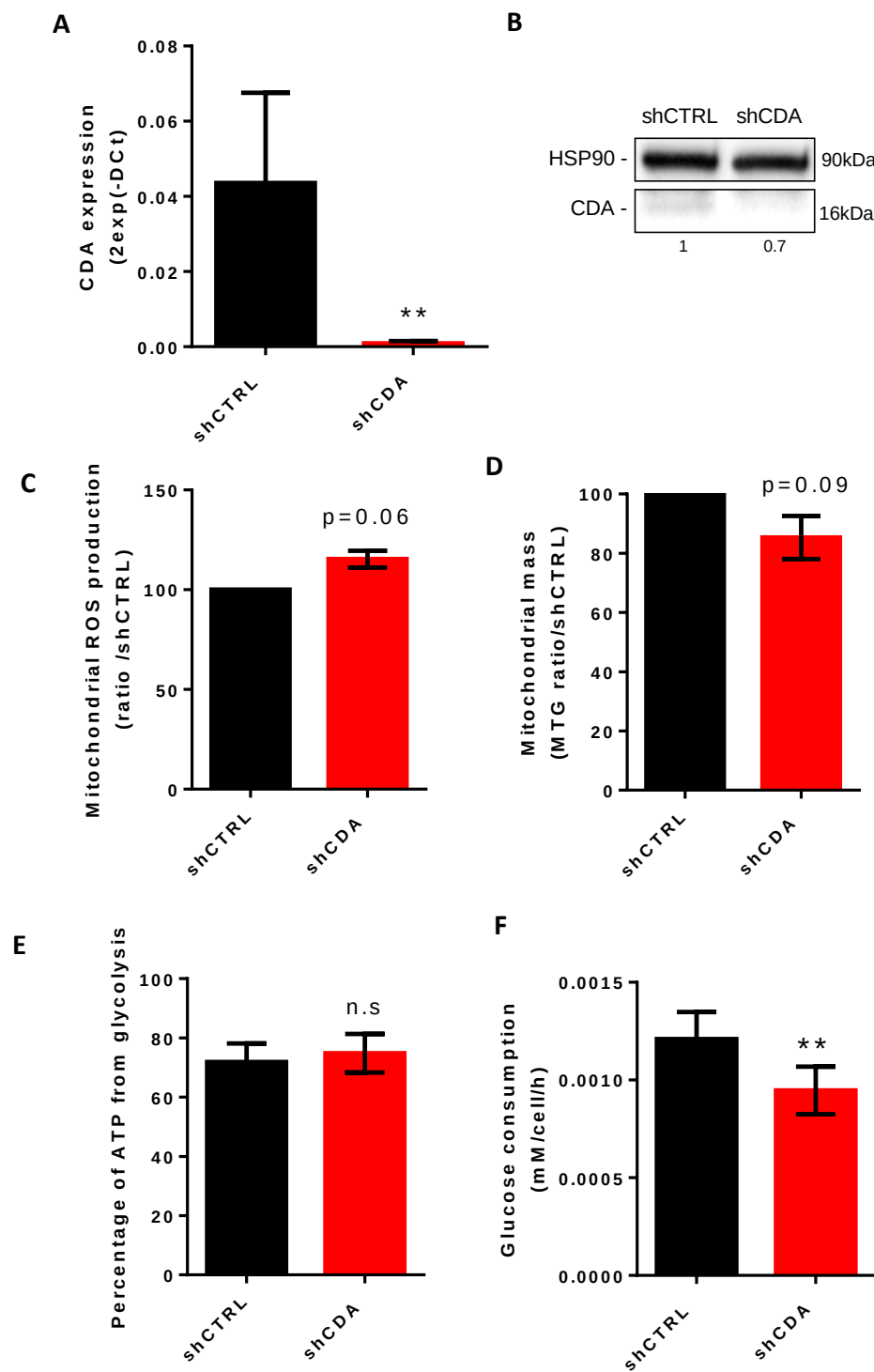
E



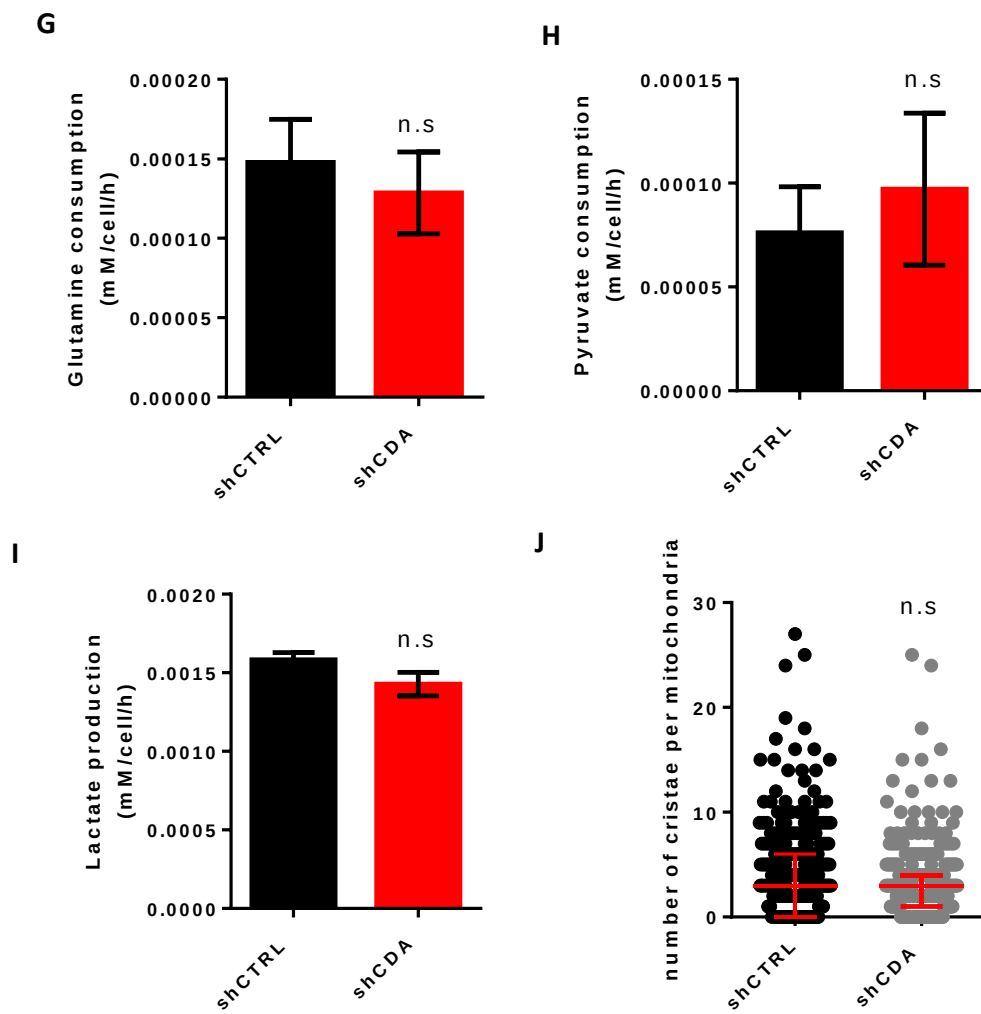
Supplementary figure 3:

Supp. Fig. 3: **A.** List of down-regulated genes in MiaPACA2 shCDA vs shCTRL with fold change < 0.50. **B.** List of up-regulated genes in shCDA vs shCTRL with fold change > 2.00. **C.** Metabolomics data of additional metabolites: PEP (phosphoenol pyruvate), 6-PG (6-phosphogluconate), Rib5P (Ribose 5-phosphate), PRPP (Phosphoribosylpyrophosphate), Sed-7P (sedoheptulose-7-phosphate), orotate and nucleosides triphosphate. Mean of three independent experiments from three different transductions. *, **: p-value < 0.05, 0.01 respectively (paired t-test). **D.** List of regulated proteins in CDA-depleted vs control cells. **E.** Proteomics data enrichment analysis of up- and down-regulated genes in CDA-depleted vs control cells, 14 days following transduction.

Supplementary figure 4:



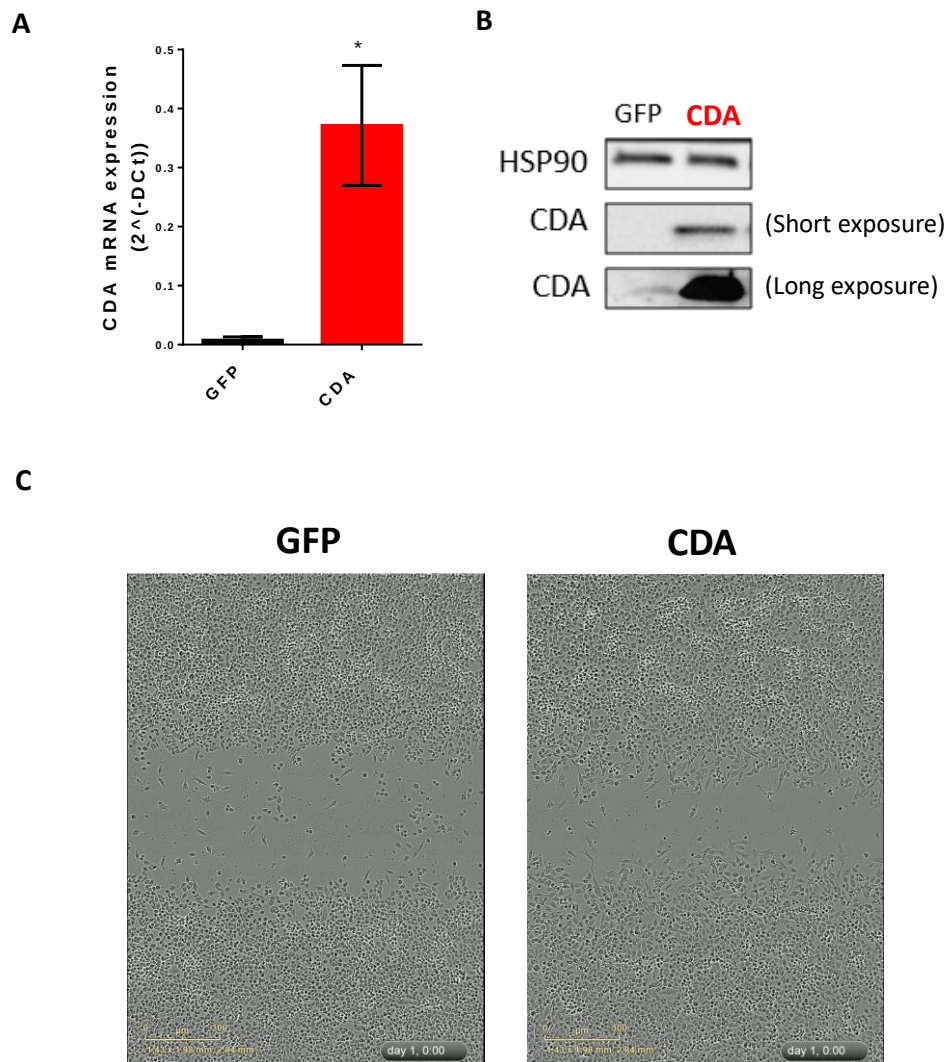
Supplementary figure 4:



Supplementary figure 4:

Supp. Fig. 4: **A.** CDA mRNA expression in CDA-depleted cells vs control cells (MiaPACA2). Mean of five independent experiments. ** : p-value < 0.01 (paired t-test). **B.** Western blotting of CDA in CDA-depleted and control cells, 2 days after transduction. Mean of three independent experiments from three different transductions. **C.** Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production assessed by flow cytometry using the fluorescent dye MitoSox in CDA-depleted cells vs control 2 days after transduction. Mean of three independent experiments from three different transductions. p-value as indicated (paired t-test). **D.** Mitochondrial mass assessed by flow cytometry using the fluorescent dye MitoTracker Green (MTG) in CDA-depleted and control cells 2 days after transduction. Mean of six experiments from six different transductions. P-value as indicated (paired t-test). **E.** Percentage of ATP produced by glycolysis in CDA-depleted vs control cells 2 days after transduction. Mean of three experiments from three different transductions. (paired t-test). **F.** Exometabolome analysis of glucose consumption rates by CDA-depleted and control cells 2 days after transduction. Mean of three independent experiments from three different transductions. (paired t-test). **G.** Exometabolome analysis of glutamine consumption rates by CDA-depleted and control cells 2 days after transduction. Mean of three independent experiments from three different transductions. (paired t-test). **H.** Exometabolome analysis of pyruvate consumption rates by CDA-depleted and control cells 2 days after transduction. Mean of three independent experiments from three different transductions. (paired t-test). **I.** Exometabolome analysis of lactate production rates by CDA-depleted and control cells 2 days after transduction. Mean of three independent experiments from three different transductions. (paired t-test). **J.** Number of cristae per mitochondria in CDA-depleted and control cells, 2 days after transduction (n=330 and 335 mitochondria) (Mann-Whitney test).

Supplementary figure 5:



Supp. Fig. 5: A. CDA mRNA expression level in CDA-overexpressing vs control cells (MiaPACA2). Mean of three independent experiments. * : p-value < 0.05 (paired t-test). **B.** Western blotting of CDA in CDA-overexpressing vs control cells. Representative of six experiments from three different transductions. **C.** Movies of wound closure by CDA-overexpressing and control cells.

3. Conclusion

Mes travaux de thèse ont permis d'appréhender le rôle de la CDA dans un contexte expérimental de cancer du pancréas et en particulier de montrer pour la première fois que la CDA joue un rôle clé dans la reprogrammation énergétique tumorale pancréatique. En effet, la CDA contrôle la biogénèse mitochondriale et son invalidation induit des dysfonctionnements majeurs des mitochondries, ce qui conduit à l'inhibition de la prolifération cellulaire et à la mort programmée par apoptose. Les cellules qui survivent à cette invalidation reprogramment leur métabolisme énergétique vers la glycolyse. Aussi, mes travaux ont permis de montrer que la surexpression de CDA stimule la biogénèse mitochondriale, protège les cellules cancéreuses d'un stress mitochondrial, et augmente leur capacité migratoire. Ces travaux sont mis en perspective, discutés et complétés par des résultats annexes obtenus pendant ma thèse qui visent à éclaircir le mécanisme moléculaire mis en jeu dans la partie « III. Discussion ».

III. Discussion

Grâce à cette étude, nous avons montré que la CDA a un nouveau rôle dans le contrôle du métabolisme énergétique. L'étude des conséquences phénotypiques de l'invalidation génétique de la CDA à long terme, c'est-à-dire après mort cellulaire massive et émergence de cellules présentant des taux réduits en CDA, a révélé une reprogrammation énergétique des cellules, qui tendent à favoriser l'utilisation de glucose *via* la glycolyse. Les études d'exométabolomes ont permis de déterminer une tendance de l'augmentation de consommation de glucose et de glutamine, et de l'augmentation de production de lactate en réponse à l'invalidation de la CDA, sans pour autant atteindre de valeur significative. Les études métabolomiques menées à long terme après invalidation indiquent que la glycolyse est augmentée dans ces cellules, notamment caractérisée par des taux plus élevés de FBP et de 2-PG. Des études transcriptomiques et par western blot confirment ces données fonctionnelles, puisque les cellules présentant des taux réduits de CDA surexpriment HKII et PFKP, qui sont des enzymes clés de la régulation du flux glycolytique. On note également une activation de LDHA, qui catalyse l'interconversion de pyruvate en lactate. En revanche, les voies de synthèses *de novo* des pyrimidines, mais également des purines, sont très altérées dans les cellules invalidées pour la CDA. Ce résultat indique que le point de contrôle métabolique dépendant de la CDA se situe en amont, ce que nous confirmons car les niveaux de PRPP sont également très diminués dans ces cellules. Il semblerait donc que les cellules cancéreuses pancréatiques invalidées en CDA reprogramment leur métabolisme énergétique et qu'elles favorisent la glycolyse, tout en délaissant d'une part les voies anaboliques telle que celles de la synthèse des pentoses phosphates et des acides nucléiques et, d'autre part, en contournant la mitochondrie, notamment en favorisant la production de lactate à partir de pyruvate.

Aussi, nous avons identifié dans les cellules invalidées pour la CDA la présence de mitochondries dysfonctionnelles qui respirent très peu, présentent une surproduction de ROS et une déplétion d'ADNmt. Des études métabolomiques à long terme nous ont permis de démontrer que les premières étapes du cycle de Krebs sont très impactées dans ces cellules. En effet, les taux de citrate et de cis-aconitate sont diminués de moitié dans les cellules déficientes en CDA. Ceci peut s'expliquer en partie par la suractivité de LDHA qui dévie le pyruvate vers la production de lactate. Il reste cependant à étudier la synthèse d'acides gras dans ces cellules, dont le point de départ se situe au niveau du citrate. En effet, l'invalidation de CDA dans ces cellules provoque peut-être une dépendance accrue en acides gras, qu'elles compensent en activant la voie de l'acide gras synthase (FAS) et qui peut provoquer une diminution des taux d'acide citrique. En revanche, les taux de fumarate et d' α -cétoglutarate ne sont pas affectés. Ces dernières observations prêtent à réflexion, compte tenu du fait qu'IDH3A, responsable de la synthèse d' α -cétoglutarate à partir d'isocitrate, est fortement réprimée à l'échelle protéique dans les cellules déficientes en CDA. Il en est de même pour l'enzyme SDHA, responsable de l'oxydation du succinate en fumarate. Ceci suggère que la production d' α -cétoglutarate est compensée par des réactions anaplerotiques grâce à l'apport de glutamine ou de glutamate. Afin de valider cette hypothèse, nous avons privé les

milieux de culture en glutamine et utilisé des inhibiteurs de la glutamine synthase tels que le CB-839, puis mesuré la prolifération des cellules invalidées pour la CDA par rapport aux cellules témoin. Malheureusement, il existe un tel écart de prolifération basale entre les cellules invalidées pour la CDA et les cellules témoins que nos résultats se sont avérés inexploitable (résultats non montrés). Bien qu'il faille rester prudent sur la nature même des cellules qui ont « échappé » à la mort cellulaire suivant l'inhibition de CDA, notamment sur le fait qu'elles aient été sélectionnées ou qu'elles aient pu s'adapter selon des mécanismes qui restent à déterminer, des études de traçage métabolique s'avèreraient utiles pour mieux comprendre les flux métaboliques mis en place dans les cellules invalidées ou non pour la CDA.

D'autre part, l'étude des conséquences phénotypiques à court terme, c'est-à-dire avant la mort massive des cellules invalidées pour la CDA, a révélé que les mitochondries sont affectées précocement par le ciblage de cette protéine. On mesure en effet une diminution de l'ADNmt (semblable à celle observée à long terme) ainsi qu'une diminution du potentiel de membrane mitochondrial et une diminution d'IDH3A, SDHA, TFAM et du complexe IV. Ce résultat essentiel suggère que les dysfonctions mitochondriales observées sont une cause précoce de la reprogrammation énergétique, et du profond effet antiprolifératif et antitumoral mesuré après ciblage de la CDA. En effet, il est connu qu'un dysfonctionnement mitochondrial amène à une reprogrammation énergétique à l'échelle de la cellule. V. M. Gohil et ses collaborateurs ont notamment montré que l'Antimycine A, un inhibiteur connu de la chaîne respiratoire, induit une reprogrammation énergétique des cellules vers un comportement glycolytique³⁴². Des études métabolomiques réalisées à court terme après invalidation de la CDA révèlent que la glycolyse n'est en effet pas impactée tandis que la voie des pentoses phosphates présente déjà quelques modifications (voir figure 39). Ces résultats confortent le fait que la reprogrammation énergétique vers la glycolyse des cellules suite à l'invalidation de la CDA est un évènement tardif tandis que les cellules subissent déjà des modifications de la synthèse de nucléotides qu'elles tentent de compenser en modifiant leurs flux dans la voie des pentoses phosphates. Nos résultats font également apparaître des modifications structurelles des mitochondries à court terme après invalidation de la CDA, telles qu'une réduction de leur épaisseur. Lors d'un stress modéré ressenti par la cellule (stress chimique ou privation en nutriments par exemple), les mitochondries fusionnent pour échapper à un phénomène massif d'autophagie appelé macro-autophagie. Ainsi fusionnées, les mitochondries sont trop grosses pour être digérées par la cellule et protègent ainsi leur intégrité. Ceci s'observe par la présence de longues mitochondries tubulaires ou en forme de Y comme dans la publication de L. Miret-Casals et ses collaborateurs²⁵⁶. Cependant, bien que quelques mitochondries en Y soient observables dans les cellules invalidées pour la CDA, ce n'est pas le cas pour la majorité des mitochondries. De plus, nous n'avons pu obtenir de résultats robustes et reproductibles quant à la mesure de marqueurs impliqués dans la dynamique mitochondriale, comme Drp1 ou OPA1, en réponse au ciblage de la CDA. En effet, nous n'avons pas observé de modification d'expression protéique des formes longues et courtes d'OPA, ni de phosphorylation préférentielle en S616 ou S637 de Drp1 (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que le stress supporté par ces cellules lors de l'invalidation de la CDA est trop intense pour être tamponné par la dynamique mitochondriale. Il reste également à prouver que c'est bien la défaillance de la fonction mitochondriale qui est à

l'origine de l'effet antiprolifératif mesuré après ciblage de la CDA. Nous pourrions par exemple traiter les cellules avec du Mitotempo, un agent chimique qui inhibe les ROS mitochondriaux de façon spécifique, et qui devrait, en théorie, protéger contre l'inflexion de la prolifération induite par le ciblage de la CDA.

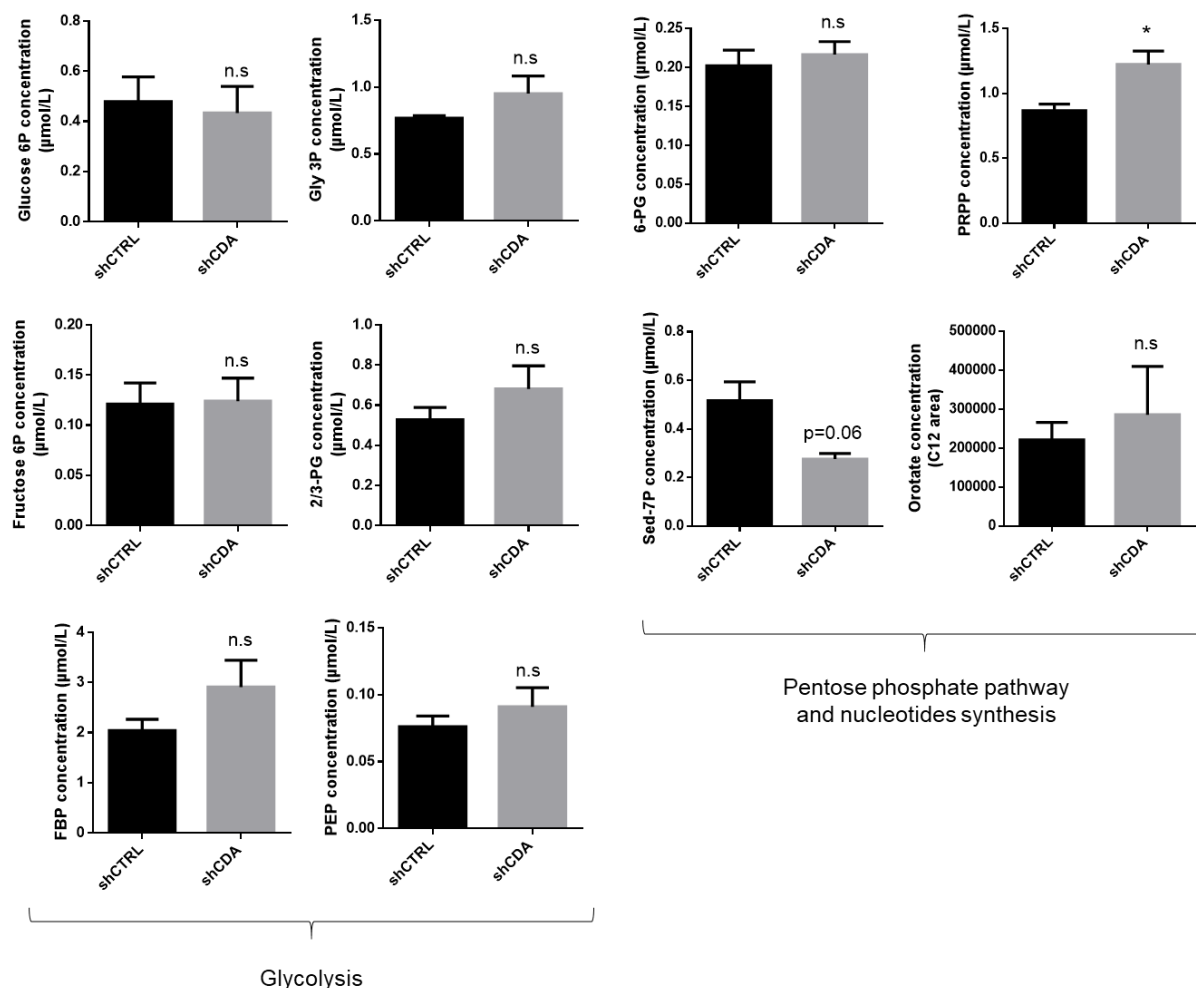


Figure 39 : Concentration des métabolites intracellulaires dans les cellules invalidées pour la CDA et les cellules témoin, 2 jours après transduction. Les métabolites sont classés par voie de signalisation. Moyenne de trois expériences réalisées à partir de trois pools différents de cellules transduites (t-test apparié).

Nous avons par la suite entrepris la réalisation d'études « gain de fonction » pour asseoir le phénotype mitochondrial entrevu lors des études de « perte de fonction » avec l'invalidation de la CDA. Ainsi, lors de la surexpression de CDA dans le même modèle cellulaire, nous avons mesuré une augmentation significative d'ADNmt, associé à une augmentation de la masse mitochondriale. Il reste cependant à préciser le mécanisme responsable de ce chondriome plus abondant dans les cellules surexprimant la CDA. En effet, il peut s'agir d'une augmentation de la biogénèse mitochondriale, mesurable par l'incorporation accrue de BrdU et l'activation de la voie de fission mitochondriale, ou d'une diminution de la mitophagie ou des phénomènes de déplétion mitochondriale, observable d'une part par l'analyse des marqueurs de la mitophagie tels que PINK1 et d'autre part par la visualisation de fuite d'ADN hors des mitochondries. Des études sont actuellement en cours afin de déterminer la nature

des mécanismes mis en jeu. Les cellules semblent également produire davantage d'ATP par l'OxPhos que les cellules GFP témoin, probablement en raison de la surexpression des enzymes du cycle de Krebs IDH3 et SDH, et à la surexpression du complexe IV de la chaîne respiratoire. Des études secondaires de ciblage de ces protéines par interférence à ARN pourront nous permettre de confirmer ce lien fonctionnel. Des études métabolomiques réalisées sur les cellules surexprimant la CDA et les cellules témoin ont mis en évidence une augmentation de citrate et de cis-aconitate (voir figure 40).

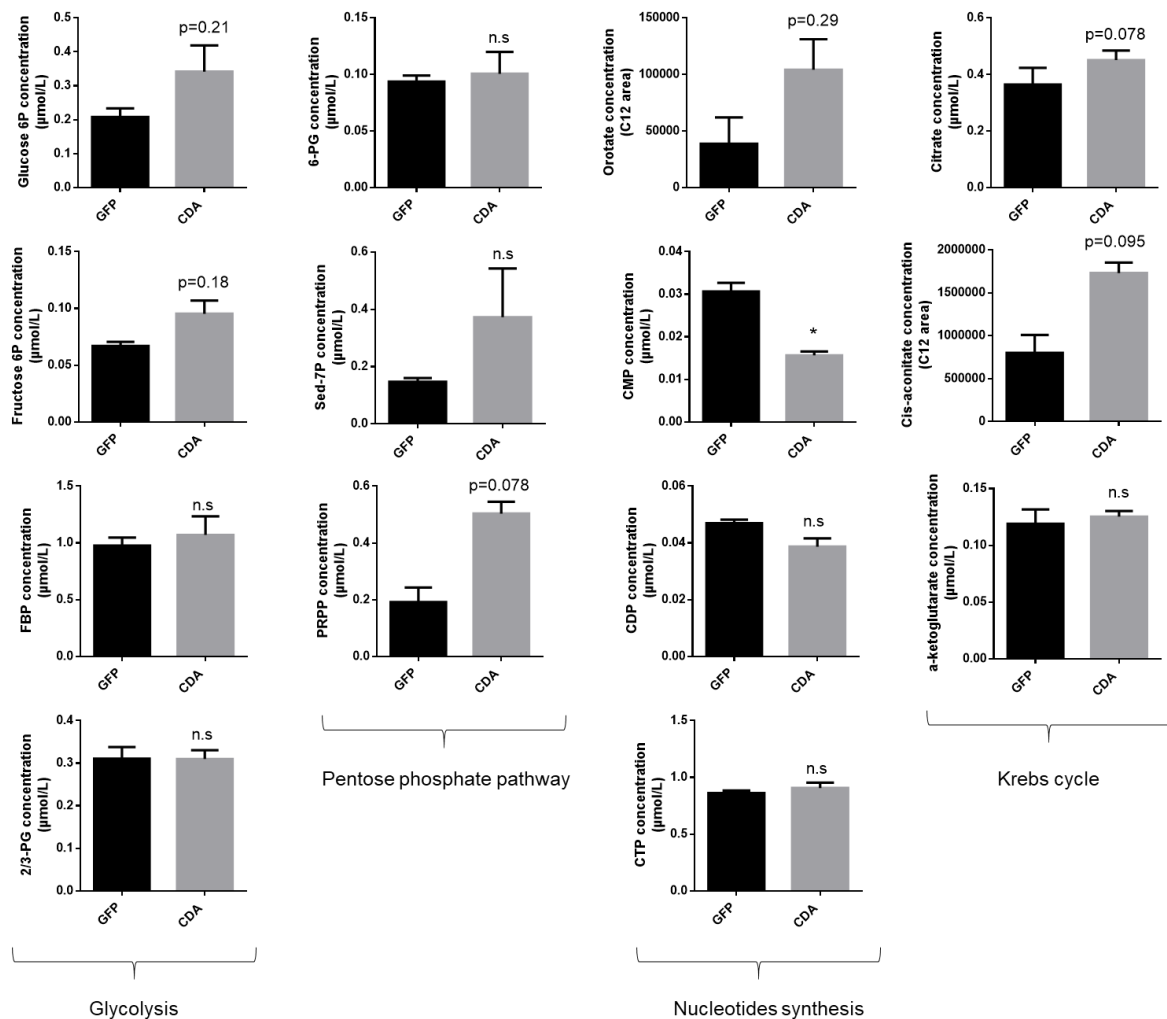


Figure 40 : Concentration des métabolites intracellulaires dans les cellules surexprimant la CDA et les cellules GFP témoin. Les métabolites sont classés par voie de signalisation. Moyenne de trois expériences réalisées à partir de trois pools différents de cellules transduites (t-test apparié).

Ces résultats sont intéressants car ils sont à l'inverse des résultats obtenus suite à l'inactivation de la CDA, et suggèrent donc un rôle important de ces métabolites dans les phénotypes observés lors des expériences de gain et de perte de fonction. Il serait particulièrement intéressant d'étudier le métabolisme des acides gras dans ces cellules par des études de lipidomique afin de déterminer leur importance fonctionnelle. Aussi, on mesure une augmentation des métabolites de la voie des pentoses phosphates et de l'orotate. En contrepartie, la forte diminution des niveaux de CMP est compensée progressivement aux

stades CDP puis CTP, suggérant que de nombreuses voies de compensation rétablissent l'équilibre du pool de nucléotides. Ainsi, le phénotype observé lors de ces expériences de gain de fonction ne semble pas dû à un déséquilibre du pool de nucléotides pour la synthèse d'ADN. Dans la continuité logique de ces résultats, nous avons voulu identifier le bénéfice apporté par la surexpression de CDA aux cellules tumorales pancréatiques. De façon surprenante, les cellules surexprimant la CDA présentent une prolifération semblable aux cellules témoins et produisent la même quantité d'ATP total (voir figure 41 A et B). En revanche, nous avons traité des cellules primaires de patients atteints de cancer du pancréas avec des inhibiteurs de la respiration : la phenformine (inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire), l'atovaquone (inhibiteur du complexe III) et l'antimycine A (inhibiteur du complexe III), et obtenu des résultats démontrant qu'un niveau d'expression élevé de CDA protège les cellules vis-à-vis de traitements ciblant l'activité mitochondriale (voir figure 42 A, B et C).

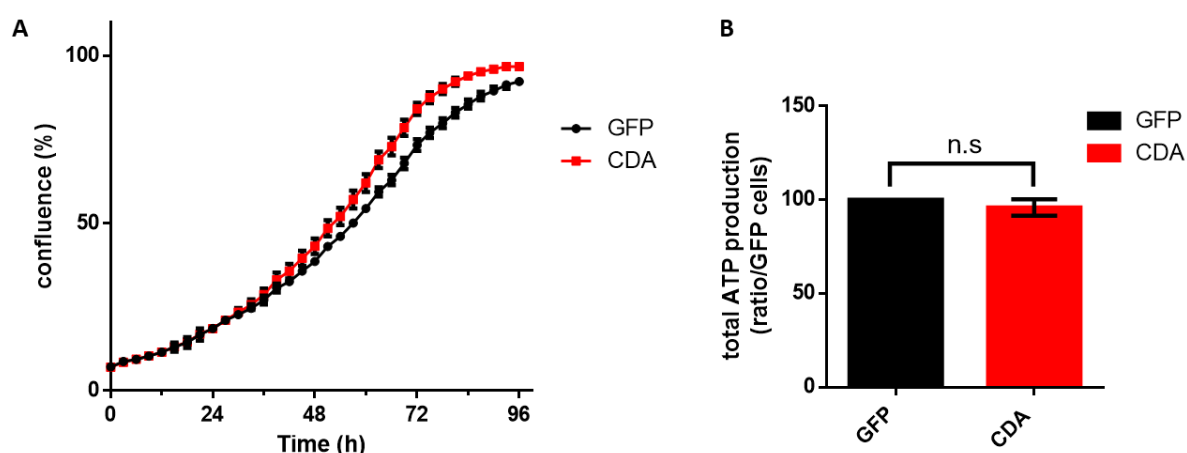


Figure 41 : A. Prolifération des cellules surexprimant la CDA et des cellules GFP témoin. Moyenne de six expériences réalisées à partir de trois pools différents de cellules transduites. B. ATP total produit par les cellules surexprimant la CDA par rapport aux cellules GFP témoin. Moyenne de six expériences réalisées à partir de trois pools différents de cellules transduites (t-test apparié).

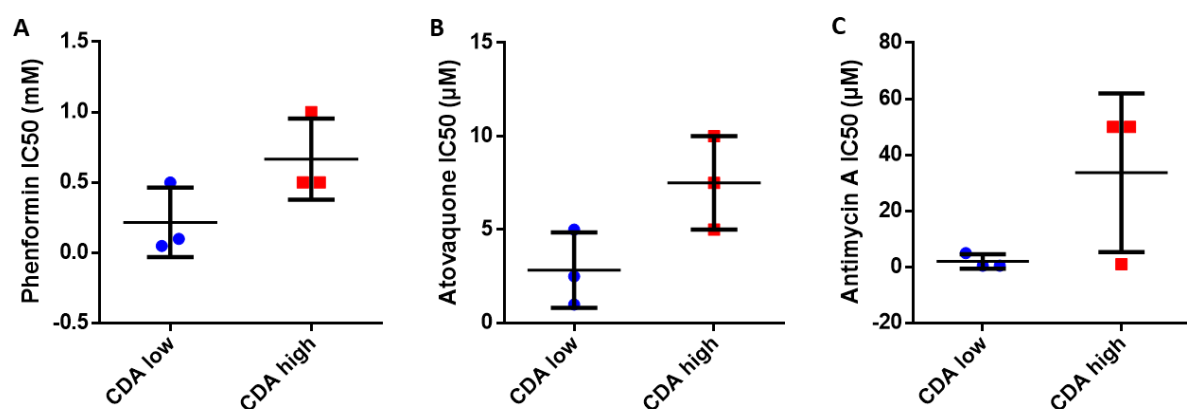


Figure 42 : IC50 of Phenformin (A), Atovaquone (B) and Antimycin A (C) in PDX-derived cell lines, three expressing a high level of CDA and three expressing a low level of CDA.

Nos résultats suggèrent que l'augmentation de la masse mitochondriale suite à la surexpression de CDA n'a donc pas nécessairement pour conséquence la surproduction d'énergie à l'état basal, surtout si l'on garde à l'esprit que l'ATP n'est pas le facteur limitant pour la prolifération des cellules cancéreuses, mais pourrait cependant permettre de mieux répondre à un stress mitochondrial. Il sera donc important d'étudier d'une part la fonction mitochondriale de ces cellules soumises à des stress (privation en nutriments, hypoxie, etc...) et d'autre part de rechercher des conséquences fonctionnelles à la surexpression de CDA autres que la production d'énergie *via* l'oxydation phosphorylante, comme par exemple la régulation de la synthèse d'acides gras à partir du pyruvate, l'homéostasie cellulaire du calcium ou encore l'activation du réticulum endoplasmique grâce à l'interaction des mitochondries avec celui-ci, toutes ces fonctions étant caractéristiques de ces organites¹⁹⁶. Le phénotype le plus marquant des cellules cancéreuses pancréatiques surexprimant la CDA est leur potentiel migratoire beaucoup plus élevé que les cellules témoins. Ceci nous a été suggéré par l'étude des signatures moléculaires des cohortes de patients atteints de cancer du pancréas qui surexpriment cette enzyme. Des résultats préliminaires ont également montré la présence de mitochondries au niveau des fronts de migration des cellules surexprimant la CDA tandis qu'elles restent périnucléaires dans les cellules GFP témoin (voir figure 43). Il reste à confirmer qu'il s'agisse bien d'une relocalisation spécifique des mitochondries dans les cellules surexprimant la CDA, qui suivrait l'augmentation de biogénèse mitochondriale induite par l'enzyme. Autre fait marquant relevé par l'étude par microscopie électronique et encore non exploité est la mesure d'une densité accrue du cytoplasme des cellules invalidées pour la CDA. En effet, des études antérieures en microscopie optique sur cellules vivantes montrent que les filaments mitochondriaux modifient continuellement leur position et leur morphologie³⁴³ ; dans ce contexte, les cytosquelettes d'actine, de tubuline et de filaments intermédiaires jouent des rôles clefs dans l'organisation cellulaire en général, et dans la localisation et la dynamique des mitochondries en particulier. Cependant, leur contribution dans l'organisation du compartiment mitochondrial n'est pas encore complètement élucidée. Chez la levure, les interactions des mitochondries avec le cytosquelette d'actine sont les plus importantes³⁴⁴. Par contre, chez *Schizosaccharomyces pombe*, elles dépendent essentiellement d'une interaction avec les microtubules³⁴⁵. Concernant les cellules de mammifères, les mitochondries sont principalement localisées au niveau des microtubules³⁴⁶ et leur mouvement dépend de moteurs moléculaires associés à ces microtubules. Cependant, le mouvement des mitochondries dans les axones neuronaux réquisitionne en plus le cytosquelette d'actine³⁴⁷. Les filaments intermédiaires ont été également impliqués, mais leur rôle reste discuté³⁴⁸. Il est ainsi tout à fait possible que la CDA contrôle également indirectement la bonne localisation subcellulaire de la mitochondrie, aiguillant ainsi de façon optimale le besoin d'énergie nécessaire à la migration cellulaire. Afin de mieux étudier cette hypothèse, nous pourrions réaliser des marquages par immunofluorescence des principaux composants du cytosquelette et de la localisation subcellulaire des mitochondries, en présence ou non de CDA. En effet, il est connu que les mitochondries peuvent augmenter leur fission afin d'être recrutées dans des régions subcellulaires spécifiques pour permettre aux cellules métastatiques tumorales de migrer³⁴⁹. En particulier, B. Cuniff et ses collaborateurs ont montré que les mitochondries infiltrent activement les lamellipodes (une extension

transitoire des cellules au front de migration), augmentant ainsi la masse mitochondriale localement et la concentration locale d'ATP en conséquences. De plus, leur étude met en évidence que c'est l'AMPK qui est responsable du flux migratoire mitochondrial³⁵⁰. Le métabolisme mitochondrial semble donc étroitement lié à la capacité migratoire des cellules.

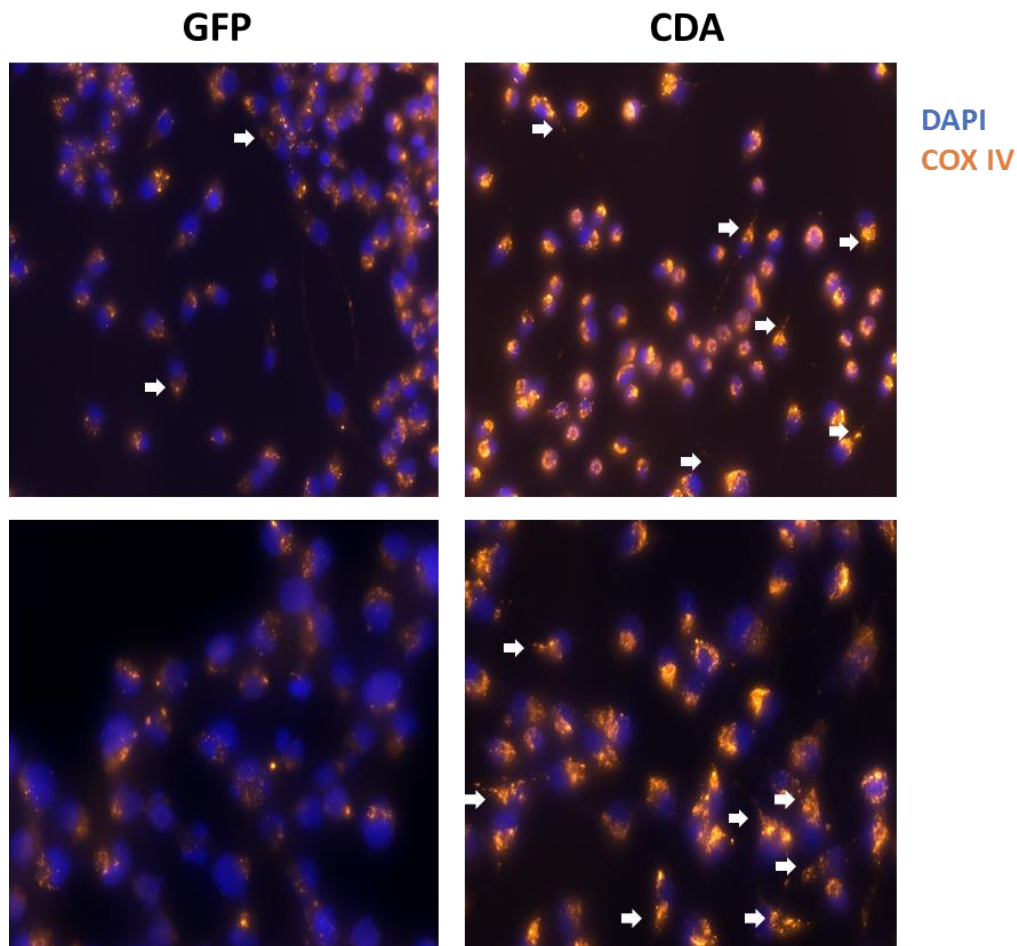


Figure 43 : Microscopie immunofluorescence x20 (intensité maximale sur 10z) des cellules surexprimant la CDA et des cellules GFP témoin. L'ADN est marqué au DAPI, les mitochondries sont marquées grâce à un anticorps reconnaissant COX IV. Les flèches blanches pointent une localisation des mitochondries aux lamellipodes d'une cellule.

Afin de définir si la biogenèse mitochondriale induite par la CDA détient un rôle prépondérant dans la migration des cellules cancéreuses pancréatiques, nous avons mesuré la migration des cellules surexprimant la CDA et des cellules GFP témoin soumises à un traitement par Phenformine. Nos résultats confirment que la Phenformine limite la migration des cellules témoins et des cellules surexprimant la CDA. Cependant, la migration des cellules qui surexpriment la CDA est beaucoup moins impactée. Ceci conforte le fait que les modifications mitochondriales mises en place lors d'une surexpression de CDA augmentent bien le potentiel migratoire des cellules. Aussi, dans les tumeurs, l'invasion des cellules cancéreuses est généralement associée à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules³⁵¹. En effet, les cellules tumorales acquièrent des changements phénotypiques semblent à ceux qui ont lieu au cours de l'embryogenèse ou de la cicatrisation et impliquent une perte de polarité, une perturbation de l'adhésion cellule-cellule et l'acquisition d'une

capacité migratoire supérieure leur permettant de circuler dans le sang et de former des métastases à distance. Nous avons donc analysé l'expression protéique de plusieurs marqueurs clés de cette transition dans les cellules surexprimant la CDA par rapport aux cellules témoins afin de déterminer si l'augmentation de la capacité migratoire pouvait également être le reflet de l'induction d'EMT dans ces cellules. Nos résultats ne montrent pas de modification significative d'expression des protéines de l'EMT : vimentine, β -caténine, ZEB1 et snail (voir figure 44) ni d'expression de E/N-cadhérines (résultats non montrés). Bien qu'il soit nécessaire de procéder à des études complémentaires de localisation subcellulaire des cadhérines pour confirmer cette tendance, ces résultats suggèrent que ce mécanisme n'est pas nécessairement le phénomène responsable de la migration de ces cellules en réponse à la surexpression de CDA. Ceci rappelle les travaux récents de J. S. Roe et ses collaborateurs, qui démontrent que le facteur FOXA1 favorise la dissémination cancéreuse pancréatique, sans pour autant impliquer l'EMT³⁵².

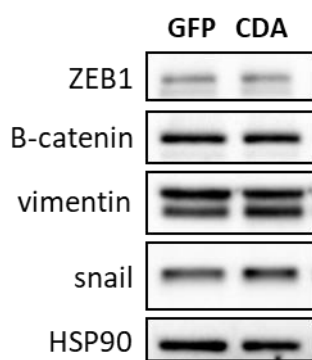


Figure 44 : Western blot des protéines impliquées dans l'EMT des cellules surexprimant la CDA et des cellules GFP témoin. Représentatif de six expériences.

En conclusion, nos résultats font la preuve que la CDA permet aux cellules de maintenir leur pool mitochondrial pour soutenir la migration cellulaire. Comme indiqué précédemment, ces résultats font le lien avec les résultats cliniques qui montrent i) que les patients du TCGA qui surexpriment le plus de CDA ont une signature moléculaire corrélée à des signatures de migration cellulaire et d'EMT, ii) que l'expression de CDA est corrélée au sous-type moléculaire basal qui comprend les tumeurs les plus agressives, iii) que les tumeurs qui ont métastasé surexpriment la CDA en comparaison avec les tumeurs qui demeurent localement avancées, iv) que l'expression de la CDA est maintenue lors du processus de dissémination de PDX expérimentales et enfin v) que la CDA favorise la dissémination métastatique dans des modèles expérimentaux de PDAC. Il serait intéressant de déterminer si la CDA est essentielle au maintien de ces métastases, et si son ciblage peut entraîner une inhibition de ces dernières. Cela demeure une question entière, sachant que les tumeurs primaires et métastatiques ne partagent que partiellement leurs traits métaboliques (M. A. Hollingsworth, présentation AACR Pancreas, Boston, 2018). Nos résultats explorent donc pour la première fois le lien entre l'expression de CDA et l'agressivité des tumeurs *via* l'augmentation de la masse mitochondriale.

Mes résultats de thèse ont donc mis en évidence un lien étroit entre la CDA et la masse mitochondriale dans plusieurs modèles expérimentaux de cancers du pancréas. Le lien entre une altération du pool de pyrimidine et la synthèse d'ADNmt avait déjà été rapporté à plusieurs reprises, notamment par J. Nikkanen et ses collaborateurs qui montrent qu'une mutation de TWINKLE remodèle le pool de dNTP *in vivo* dans un modèle murin. Le cycle du folate mitochondrial est également modifié, accompagné d'une biosynthèse accrue de sérine et de glutathion, et d'une reprogrammation de la voie des composés à un carbone (one-carbon metabolism), ce qui perturbe la voie de méthylation de l'ADN³⁵³. De façon intéressante, nous avons mené des études épigénétiques à large échelle, sans que l'expression de CDA ne modifie la méthylation de l'ADN génomique dans les cellules invalidées pour la CDA (résultats non montrés). D'après ces auteurs, le phénomène de déplétion d'ADNmt est associé à un déséquilibre et un défaut de dNTP, tandis que le phénomène de délétions multiples de l'ADNmt est associé à un déséquilibre et un surplus de dNTP. Il existe un certain nombre de pathologies associées à des défauts d'ADNmt. En effet, MDS (*Mitochondrial DNA depletion syndrome*) regroupe un ensemble de pathologies ayant pour cause une diminution importante du nombre de copies d'ADNmt par cellule. Elles sont classées en 4 groupes caractérisés par l'organe principalement atteint et le type de mutation. Dans tous les cas, la dysfonction de l'organe découle de la diminution du nombre de copies d'ADNmt, ce qui induit un déficit en protéines de la chaîne respiratoire codées par le génome mitochondrial, ce qui a pour conséquence un apport insuffisant d'énergie à l'organe³⁵⁴. La pathologie due à un défaut de maintenance de l'ADNmt la plus caractérisée à ce jour est la MNGIE (*recessive mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy*)²⁰¹. MNGIE est caractérisée par de nombreuses déficiences avec, entre autres, une neuropathie (perte de l'audition, de la vue et des sensations), une dysmotilité gastro-intestinale et une leucoencéphalopathie³⁵⁵. Cette maladie a pour origine des mutations du gène de la thymidine phosphorylase (TP ou TYMP)³⁵⁶, une enzyme de la voie de recyclage des pyrimidines responsable de la réaction de transformation de la thymidine en thymine. Cette enzyme étant fortement exprimée dans le système nerveux périphérique et le système gastro-intestinal et essentielle au maintien du pool de pyrimidine mitochondrial, une perte de fonction de cette enzyme a donc de graves conséquences dans ces tissus³⁵⁶. Les défauts d'ADNmt menant à des dysfonctions mitochondriales ont donc une incidence directe sur le pool de nucléotides dans d'autres pathologies que le cancer. De plus, S. Song et ses collaborateurs montrent qu'un déficit de dNTP sur le long terme favorise les délétions d'ADNmt dans des cellules HeLa³⁵⁷. Aussi, L. Miret-Casals et ses collaborateurs montrent que l'inhibition de la synthèse *de novo* de pyrimidines induit la fusion mitochondriale dans leur étude sur le stress mitochondrial induit par Leflunomide²⁵⁶. Il serait donc particulièrement intéressant d'étudier l'expression de la CDA dans ces diverses pathologies, et de procéder à des études fonctionnelles de modulation de l'expression de la CDA, si des modèles expérimentaux pertinents existent.

Le lien entre la CDA et un stress mitochondrial n'a en revanche jamais été rapporté dans la littérature. Cependant, il est connu que les mitochondries possèdent leur propre pool de dNTP ainsi que des enzymes spécifiques mitochondriales telles que la TK2 qui transforme la thymidine en dTMP ou la dGK qui transforme la désoxyguanosine en dGMP afin de rendre disponible les précurseurs de synthèse d'ADNmt, indépendamment du cycle cellulaire^{358,359}. Il

est intéressant de noter que les mitochondries seraient particulièrement sensibles à une déplétion en dCTP ou de trop grandes concentrations en dTTP du fait de la régulation allostérique de la RNR³⁶⁰. Le rôle de la CDA dans le maintien de l'ADNmt prend alors tout son sens. Cependant, nous avons montré par des études d'enrichissement de fractions subcellulaires dans plusieurs lignées que la CDA n'est pas située dans les mitochondries (voir figure 45).

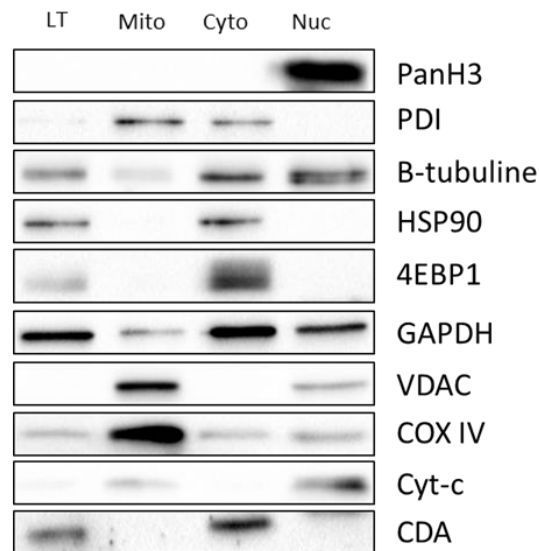


Figure 45 : Western blot de la CDA dans les fractions subcellulaires mitochondriale (Mito), cytoplasmique (Cyto), nucléaire (Nuc) et du lysat total (LT). PanH3 sert de contrôle de la fraction nucléaire, PDI sert de contrôle du réticulum endoplasmique, la B-tubuline et GAPDH sont contenues à la fois dans la fraction cytoplasmique et la fraction nucléaire, HSP90 et 4EBP1 sont des contrôles de la fraction cytoplasmique, VDAC et COX IV sont des contrôles membranaires mitochondriaux et Cyt-c est un contrôle de l'intégrité mitochondriale

Afin de valider ce résultat, il serait intéressant d'étudier si la CDA possède un signal de reconnaissance par les mitochondries qui lui permettrait d'être transportée jusqu'à la matrice mitochondriale où se trouve le pool de dNTP. En effet, les mitochondries sont composées d'une membrane externe et d'une membrane interne. La membrane externe est une bicouche phospholipidique, semblable à la membrane cytoplasmique, associée à de nombreuses protéines. Elle contient un ratio équilibré (1:1) de phospholipides et de protéines et est relativement perméable aux petites molécules (<5kDa) et aux ions. Les grosses molécules, telles que les peptides codés par l'ADN génomique participant à la chaîne respiratoire ont des séquences spécifiques en N-terminal de 20 à 30 acides aminés qui leur permettent de se lier à un complexe de protéines intra-membranaires appelées TOM (*translocase of the outer membrane*) afin d'effectuer leur transport au travers de la membrane externe *via* TOM40 qui possède un canal transmembranaire. La membrane interne est plus riche en protéines (3:1) et beaucoup plus imperméable (grâce notamment à la présence de 20% de cardiolipine, aussi retrouvée en grande quantité dans les membranes bactériennes). La diffusion des petites molécules au travers de la membrane interne n'est pas possible, et doit se faire *via* des canaux spécifiques, ce qui crée des gradients de concentration entre la matrice et l'espace inter-membranaire mitochondrial. Les grosses protéines comprenant le signal de localisation

mitochondrial sont de nouveau transportées grâce au complexe de protéines intra-membranaires appelées TIM (*translocase of the inner membrane*) et en particulier TIM23. Une fois dans la matrice, ces protéines sont prises en charge par HSP70, entre autres, pour acquérir leur structure tertiaire et assurer leur fonction³⁶¹. Si la CDA possède ce signal de reconnaissance, elle pourrait donc être transportée jusqu'à la matrice mitochondriale dans des conditions particulières. Il faut également rester vigilant sur le fait que nos résultats concernant la localisation subcellulaire de l'enzyme ont été obtenus sur des cellules en culture, de façon statique. Il faudra s'intéresser à la localisation subcellulaire de la CDA, si possible en imagerie en temps réel, en réponse à des conditions qui nécessitent une implication accrue de cette protéine et de sa fonction en lien avec l'activité et la mobilité mitochondriale, telles qu'une déplétion en nucléotides ou une inhibition de la respiration. Nous pourrions pour cela exprimer dans les cellules d'intérêt des formes de CDA fusionnées à la GFP (même s'il reste à démontrer que cette fusion n'altère pas la fonction de cette protéine), ou de façon plus originale modifier génétiquement ces cellules à l'aide d'outil d'édition du génome (CRISPR-Cas9) pour créer des fusions endogènes CDA/GFP. Dans un second temps, nous pourrions étudier la capacité migratoire de ces cellules, notamment en réponse à un stress mitochondrial, pour rapporter le comportement subcellulaire de la CDA dans ce contexte.

Nous avons également tenté de reproduire les résultats obtenus par shARN avec des inhibiteurs pharmacologiques de la CDA : le tétrahydrourine (THU) et le diazépino riboside (DR). Le THU a été très largement étudié dans la littérature et son efficacité et sa spécificité parfois remises en question¹⁴¹. Le DR est présenté par P. S. Liu et ses collaborateurs comme un excellent inhibiteur de la CDA¹⁴⁷ et la cristallisation de l'enzyme avait même été effectuée en liaison avec le DR¹⁴⁸. Cependant, il n'avait jamais été étudié *in vitro* sur des lignées cellulaires. Nous avons donc, pour commencer, réalisé des courbes de dose-réponse sur les différentes lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques étudiées pendant ma thèse. L'activité des inhibiteurs était mesurée de façon indirecte grâce à un traitement concomitant à la gemcitabine, induisant de façon dose dépendante la diminution de la prolifération mesurée par Incucyte (voir figure 46). En effet, les inhibiteurs bloquent l'activité catalytique de la CDA et chimiosensibilisent ainsi les cellules à la gemcitabine. La dose efficace du THU a été choisie à 100µM et correspond aux valeurs retrouvées dans la littérature¹⁴¹. La dose efficace du DR a également été choisie à 100µM et constitue la première preuve d'efficacité *in vitro*. Nous avons, dans un second temps, traité les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques avec du THU ou du DR afin de reproduire les effets des shARN à l'aide de trois indicateurs principaux : la mort cellulaire, la baisse de prolifération et la diminution d'ATP produit par les mitochondries. Cependant, aucun de ces indicateurs n'a été affecté (voir figure 47 A et B), même lors d'un traitement chronique pendant 21 jours consécutifs à la dose de 100µM. Ces résultats reproduisent les données de la littérature et expliquent pourquoi l'importance fonctionnelle de la CDA n'avait jamais été mise en évidence malgré les nombreuses études *in vitro* utilisant ces inhibiteurs. Cependant, cela soulève deux points essentiels concernant i) la spécificité d'inactivation consécutive à l'utilisation du shARN et remet en cause le mécanisme d'action de la CDA dans la carcinogénèse pancréatique et ii) suggère une nouvelle fonction de la CDA.

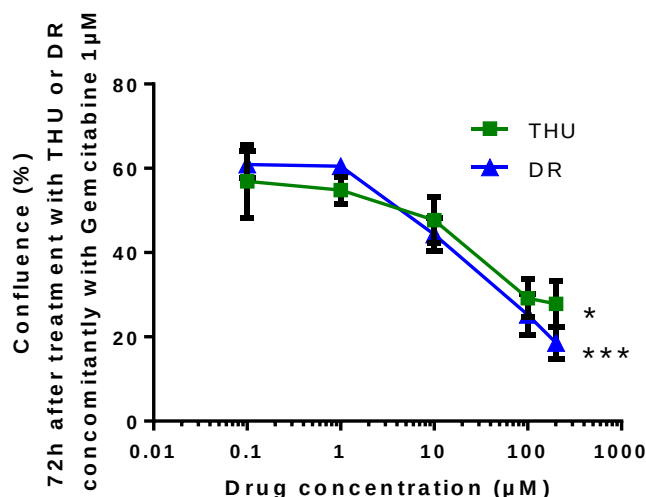


Figure 46 : Confluence mesurée 72h après le début du traitement par 1μM de gemcitabine et des doses croissantes de THU ou de DR. Moyenne de quatre expériences indépendantes. *, *** : p-value < 0,05 et 0,001 respectivement.

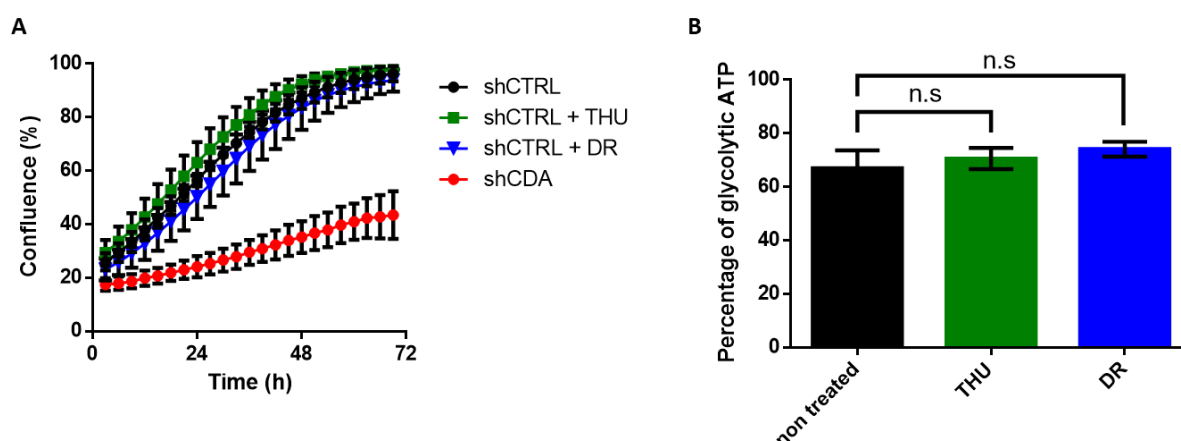


Figure 47 : A. Prolifération des cellules invalidées pour la CDA et des cellules témoins traitées par THU ou DR. Représentatif de trois expériences indépendantes. B. Pourcentage d'ATP produit par la glycolyse par des cellules traitées par THU ou DR (t-test apparié).

Concernant le premier point, nous avons validé par l'utilisation de différentes lignées, et de différentes modalités (autres shARN, pool de siARNs) que le ciblage génétique de la CDA s'accompagne, y compris dans d'autres lignées, de l'inhibition de la prolifération cellulaire, en absence de gemcitabine (résultats non montrés). Il semble donc peu probable que nous répétions ici un effet non spécifique qui mettrait en péril l'interprétation de nos résultats. De plus, après analyse des données transcriptomiques, le gène codant pour la CDA est celui dont l'expression est la plus diminuée ; de plus, nous avons « dégradé » *in silico* la séquence du shARN utilisé pour identifier d'autres gènes potentiellement ciblés par ce dernier ; cependant, aucun des gènes identifiés n'est régulé à la lecture des données de transcriptomiques, ce qui consolide la spécificité du shARN utilisé dans nos études. Enfin, l'expression d'une protéine dont l'ARNm a été modifié pour « résister » au shARN, mais dont la séquence protéique reste inchangée, restaure la prolifération des cellules cancéreuses pancréatiques exprimant le

shARN contre la CDA. Collectivement, ces résultats confirment la spécificité et l'efficacité de notre approche génétique de ciblage de la CDA.

Afin d'étudier la possibilité que la CDA exerce les effets mesurés sur les cellules dérivées de cancer du pancréas en raison d'une nouvelle fonction non identifiée, nous avons produit un vecteur pour surexprimer un mutant catalytiquement inactif. Comparé à une surexpression de CDA sauvage et à une surexpression de GFP comme témoin, cette étude avait plusieurs buts : d'une part de vérifier la réciprocité du phénotype, et d'autre part de suggérer une nouvelle fonction de la CDA. Le mutant, noté E67Q, a été produit d'après les travaux de A. Cambi et ses collaborateurs et affecte directement l'activité catalytique de l'enzyme puisque c'est le glutamate en position 67 responsable de l'initiation de la réaction qui est muté⁹⁰. Nos résultats mettent en évidence que la surexpression de CDA catalytiquement inactive a les mêmes répercussions phénotypiques sur la biogénèse mitochondriale (voir figure 48 A et B), la production d'ATP (voir figure 48 C) et la migration que la CDA « sauvage » (voir figure 48 D). En outre, des résultats préliminaires sur un autre mutant catalytiquement inactif affectant Y33, un acide aminé essentiel pour la tétramérisation de la protéine, montre que ce mutant reproduit les mêmes résultats que la CDA « sauvage » (résultats non montrés). Cependant, nous avons rencontré des limitations techniques à l'utilisation de ces mutants. En effet, l'ARNm de la CDA mutée est bien surexprimé, du même ordre de grandeur que la CDA « sauvage » (voir figure 49 A), cependant, la protéine n'est pas détectable en Western Blot (voir figure 49 B). Des études préliminaires ont été effectuées afin de déterminer si la protéine n'était pas traduite, rapidement dégradée ou si l'anticorps servant à la détection de la CDA « sauvage » ne reconnaît pas la protéine mutée. Une étude cinétique préliminaire en présence de MG132 pour bloquer le protéasome a permis de montrer que la dégradation de la protéine mutée ne peut qu'en partie expliquer l'absence de signal en Western blot, suggérant d'une part un problème de stabilité ou de conformation par rapport à la protéine « sauvage » (voir figure 50) et d'autre part un problème de reconnaissance de la forme mutée par l'anticorps.

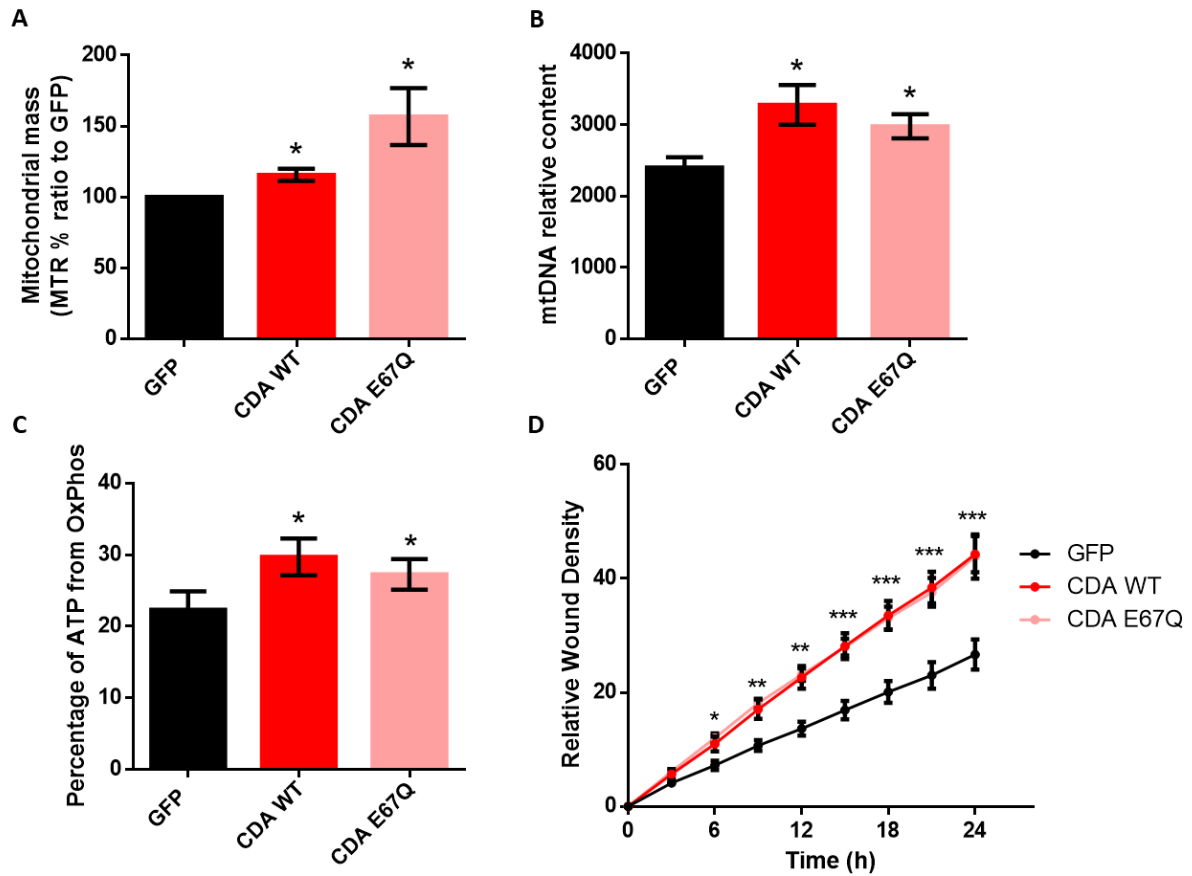


Figure 48 : Masse mitochondriale (A), contenu en ADNmt (B) et pourcentage d'ATP produit par la glycolyse (C) des cellules surexprimant la CDA « sauvage » ou un mutant catalytiquement inactif E67Q et des cellules GFP témoin. Moyenne de six expériences effectuées à partir de trois pools différents de cellules transduites. * : p-value < 0,05 (t-test apparié). D. Migration des cellules surexprimant la CDA « sauvage » ou un mutant catalytiquement inactif E67Q et des cellules GFP témoin. Moyenne de neuf expériences issues de trois pools différents de cellules transduites. *, **, *** : p-value < 0,05, 0,01, 0,001 respectivement (t-test apparié).

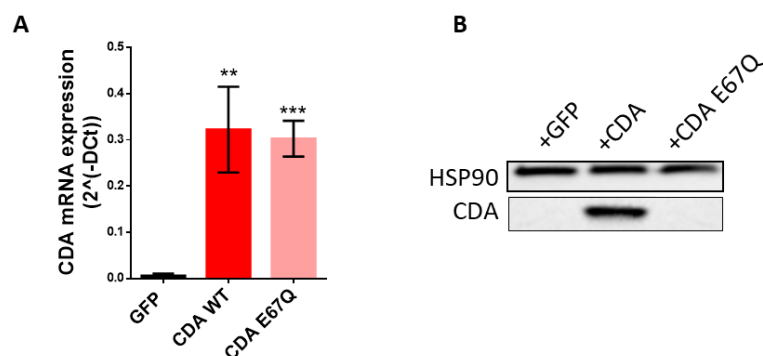


Figure 49 : A. Niveau d'expression de l'ARNm de la CDA et B. western blot de la CDA dans les cellules surexprimant la CDA « sauvage » ou un mutant catalytiquement inactif E67Q et des cellules GFP témoin. Moyenne de six expériences effectuées à partir de trois pools différents de cellules transduites. **, *** : p-value < 0,01 et 0,001 respectivement (t-test apparié).

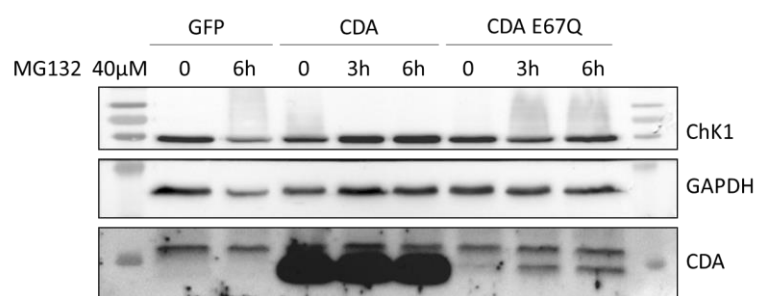


Figure 50 : Western blot de la CDA dans les cellules surexprimant la CDA « sauvage » ou un mutant catalytiquement inactif E67Q et les cellules GFP témoin traitées par 40μM de MG132. ChK1 sert de contrôle de dégradation par le protéasome.

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et de se prémunir d'un défaut de reconnaissance de l'anticorps anti-CDA disponible actuellement, nous avons produit une construction lentivirale codant pour la CDA, mutée ou non sur le résidu E67, et codant pour un épitope HA (afin de faciliter l'identification de partenaires, discuté ci-après) et une étiquette triple Flag pour faciliter la détection par Western blot. Les résultats préliminaires montrent que la protéine est bien exprimée, au niveau ARNm (résultats non montrés) et au niveau protéique reconnu par un anticorps anti-Flag (voir figure 51). Ces résultats nous confortent sur l'idée que la protéine mutée est bien traduite mais non reconnaissable par l'anticorps anti-CDA dont nous disposons.

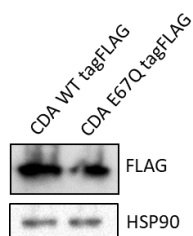


Figure 51 : Western blot de la CDA dans les cellules surexprimant la CDA ou son mutant couplé à un tag HA-triple FLAG.

Toujours dans le but de valider l'hypothèse d'une nouvelle activité de la CDA, nous avons tenté de restaurer le phénotype induit lors d'une invalidation génétique de la CDA en complétant le milieu des cellules par son produit et dérivé (uridine/désoxyuridine) ou de le phénocopier, par ajout d'un excès de cytidine et/ou de désoxycytidine. Nous sommes pour cela partie d'un postulat simple basé sur l'activité catalytique connue de la CDA. En supprimant la CDA, la cytidine (et désoxycytidine) n'est plus convertie en uridine (et désoxyuridine), et on peut s'attendre à une accumulation de cytidine et désoxycytidine. A l'inverse lors d'une surexpression de CDA, la cytidine (et désoxycytidine) est rapidement et massivement convertie en uridine (et désoxyuridine), ce qui provoque théoriquement une accumulation de ces produits. Cette théorie est également argumentée par M. Amor-Gueret et ses collaborateurs, et nous nous sommes basés sur les concentrations qu'ils utilisent dans leurs études pour mener les premières expériences³⁶². Aussi, de façon intéressante, les

mitochondries avec un défaut d'expression ou une mutation sur MFN1/2 ou un déficit en ADN mitochondrial ont besoin d'un apport important en pyruvate et en uridine pour se maintenir³⁶³. Cependant, l'uridine (et désoxyuridine) n'a jamais permis de restaurer le phénotype basal suite à une invalidation de la CDA lors de nos expériences (voir figure 52 A). En effet, malgré un apport exogène en uridine, les cellules meurent 4 jours après la transduction avec le vecteur codant le shCDA (résultats non montrés). Nous avons bien vérifié que l'apport exogène d'uridine et son utilisation par la cellule est pourtant possible car le traitement des cellules par Leflunomide induit une diminution de la prolifération, réversible par un traitement concomitant par uridine (voir figure 52 B).

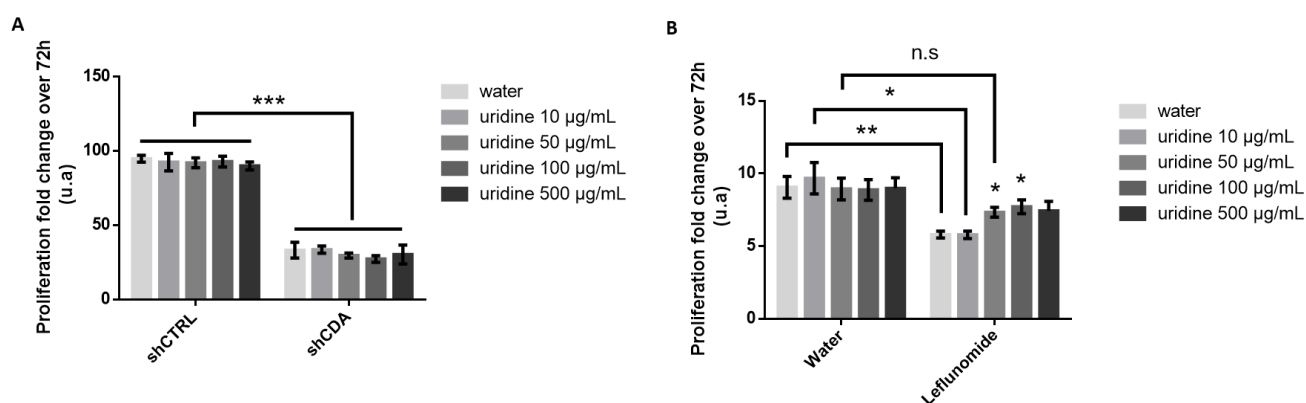


Figure 52 : A. Ratio de la prolifération sur 72h des cellules invalidées pour la CDA et des cellules témoin traitées par des doses croissantes d'uridine. Moyenne de trois expériences indépendantes. * : p-value < 0,001 (t-test apparié) B. Ratio de la prolifération sur 72h de cellules traitées par Leflunomide et des doses croissantes d'uridine. Moyenne de quatre expériences indépendantes. *, ** : p-value < 0,05 et 0,01 respectivement (t-test apparié).**

L'apport d'uridine et de désoxyuridine permet cependant de prévenir la baisse de prolifération des cellules invalidées pour la CDA, mais dans une moindre mesure (voir figure 53), suggérant que le phénotype observé lors de l'invalidation génétique de la CDA est en partie seulement due à son activité catalytique connue, ou bien trop avancé pour qu'un *rescue* soit possible. Aussi, nous avons traité les cellules cancéreuses pancréatiques avec de la cytidine et de la désoxycytidine afin de phénocopier une invalidation de CDA. De façon encourageante, nous avons observé dans ces cellules une légère baisse de prolifération (résultats non montrés) et la mesure de plusieurs indicateurs tels que l'expression protéique de SDHA et de IDH3A, ou encore la diminution d'ADNmt a été reproduite (voir figure 54 A et B). Cependant, l'analyse du niveau protéique de CDA en Western Blot a montré une forte diminution du niveau protéique de cette enzyme en réponse à ce traitement exogène (voir figure 55), suggérant une régulation possible, et nouvelle, de la CDA par le pool de nucléotides. Ceci a également été reproduit par traitement des cellules à l'orotate (résultat non montré).

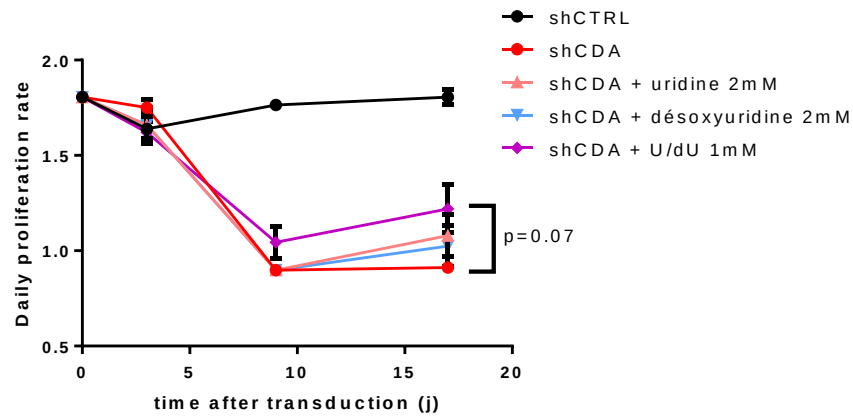


Figure 53 : Taux de prolifération journalier des cellules témoin et des cellules invalidées pour la CDA dont le milieu a été complémenté en uridine et/ou désoxyuridine. Moyenne de trois expériences indépendantes (t-test apparié).

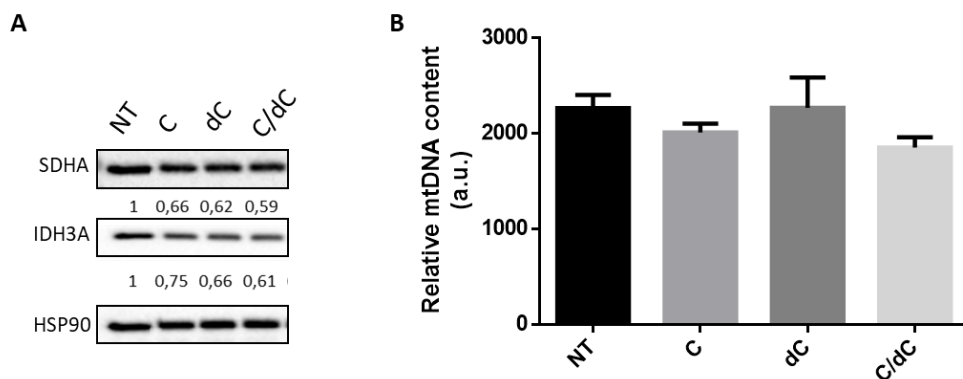


Figure 54 : A. Western blot de SDHA et IDH3A dans les cellules traitées par 1mM de cytidine et/ou désoxycytidine. Représentatif de trois expériences. B. Contenu en ADNmt des cellules traitées par 1mM de cytidine et/ou désoxycytidine. Moyenne de deux expériences.

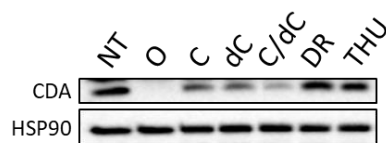


Figure 55 : Western blot de la CDA dans des cellules traitées par 1mM de cytidine et/ou désoxycytidine, 1mM d'orotate ou 100μM de THU ou de DR. Représentatif de deux expériences.

Ces résultats surprenants n'ont en revanche pas permis de conclure sur l'activité catalytique de la CDA étant donné que la complémentation en cytidine et désoxyuridine induit une diminution du niveau protéique de la CDA, ce qui s'apparente de trop près à ce que nous obtenons après invalidation génétique de la protéine. En conclusion, ces études ont permis de mettre en évidence que le phénotype induit sur les cellules cancéreuses pancréatiques

consécutivement à un ciblage ou une surexpression de CDA n'est pas dû en totalité à son activité catalytique connue.

Afin de restaurer le phénotype basal suite à l'invalidation de CDA, nous avons réalisé des tests de complémentation avec divers composés tels que l'acide oléique, l'acide urique, la carnitine, l'acide aspartique, l'alanine, l'acide citrique et l'acide orotique afin de tenter de restaurer des mitochondries fonctionnelles. Ces composés, utilisés individuellement à plusieurs concentrations, n'ont pas permis d'empêcher la mort cellulaire, seul paramètre étudié dans notre étude préliminaire (résultats non montrés). Cependant, il est fort possible qu'un ensemble de voies soient altérées simultanément. Ainsi, la complémentation avec un composé unique ne permettrait pas de compléter la fonction mitochondriale.

Le mécanisme d'action de la CDA dans la carcinogénèse pancréatique et son lien avec la biogénèse mitochondriale n'a pas été élucidé. Afin de remédier à cela, nous allons réaliser des études de protéomique afin de révéler l'interactome de la CDA pour déterminer les partenaires de la CDA à même d'expliquer ce phénotype. En effet, des études d'interactomes à grande échelle ont révélé un grand nombre de partenaires potentiels de la CDA.³⁶⁴ Cependant, le domaine de la CDA impliqué dans ces interactions n'est pas connu et aucune d'entre elles n'a fait l'objet d'études fonctionnelles. La connaissance des interactants de la CDA, et en particulier du mécanisme responsable de la modulation du métabolisme mitochondrial, nous permettrait d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La mise en perspective de ce travail dans d'autres pathologies serait également intéressante. En effet, ce travail montre l'importance fonctionnelle de la CDA dans la carcinogénèse pancréatique. Il serait intéressant d'étudier la protéine dans d'autres modèles afin de déterminer si cette nouvelle fonction est spécifique du cancer du pancréas. En particulier, il est connu que les cellules de Bloom, qui sont associées à une baisse de l'expression protéique de CDA, subissent un stress réplicatif important qui provoque l'accumulation d'erreurs génétiques et favorise la survenue de cancers¹⁴⁹. Cependant, l'homéostasie mitochondriale de ces cellules n'est pas connue. Il est donc tout à fait envisageable que ces cellules accumulent des dysfonctions mitochondriales dont les conséquences pourraient être la reprogrammation énergétique des cellules, et participer à l'apparition de cancers.

Ce travail présente également plusieurs intérêts pour les patients atteints d'un cancer du pancréas. Le dosage de l'activité de CDA chez les patients était déjà étudié comme marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie par gemcitabine, ou comme indicateur d'effet secondaire néfaste de cette molécule. Nos résultats suggèrent que l'expression de CDA pourrait représenter un nouveau marqueur prédictif d'agressivité des tumeurs afin d'apprécier à l'avance le devenir des patients (progression rapide, récidives, etc...) et d'adapter en conséquence la décision thérapeutique pour leur prise en charge. En particulier, cette analyse pourrait s'appliquer aux patients résécables, ou présentant des maladies localement avancées. Dans le premier cas, une expression élevée de CDA dans la tumeur primaire serait indicatrice de maladie agressive à fort risque de rechute, et représenter ainsi un marqueur défavorable d'intervention chirurgicale compte tenu du risque inhérent à cette pratique et à son inutilité en cas de maladie avancée. Dans le second cas, l'expression de CDA

dans les tumeurs primaires localement avancées pourrait être en faveur de la présence de micrométastases non détectées, ce qui justifierait une investigation plus poussée des patients. Afin de conforter ces résultats, nous procèderons à l'analyse moléculaire des patients inclus de façon prospective dans la cohorte Bacap, qui présentent tous les stades de la maladie, et dont la réponse à la thérapie, notamment à base de gemcitabine, et la survie sans progression et globale sont connus³⁶⁵.

Notre travail a également mis en évidence que le niveau d'expression de CDA influence l'état métabolique des cellules, et en particulier le flux mitochondrial en faveur de la migration cellulaire. Des traitements métaboliques pourraient donc être envisagés en fonction du niveau d'expression de la CDA afin de réduire le potentiel migratoire et invasif des tumeurs résécables et localement avancées afin de prévenir les métastases. Enfin, ce travail souligne l'importance de la CDA dans la carcinogénèse pancréatique, d'autant plus que son profil d'expression est original dans le cancer du pancréas par rapport aux autres cancers. En effet, les enzymes de la voie *de novo* des pyrimidines (UMPS, CAD et DHODH) sont surexprimées dans tous les cancers (données disponibles sur <https://portals.broadinstitute.org/>), de même que la plupart des enzymes de recyclage et de métabolisation des nucléotides telles que TK1, TK2, CMPK, CTPS1, DCK ou RRM2. Seules quelques enzymes (UPP1, TYMP) ont un profil d'expression hétérogène entre les cancers, et c'est la CDA qui présente le profil d'expression le plus hétérogène, avec certains cancers qui la surexpriment (cancers du pancréas, de l'œsophage, du poumon...) et d'autres qui la sousexpriment (mélanome, lymphome, neuroblastome...). Cet aspect est en faveur de la mise en place de stratégies de ciblage de la CDA dans le cadre du cancer du pancréas. Cependant, il est nécessaire de développer de nouveaux outils thérapeutiques puisque les inhibiteurs de la CDA sont inefficaces et des stratégies de shARN codés par des vecteurs lentiviraux difficilement envisageables chez le patient, même si notre équipe est spécialiste des approches de thérapie génique anticancéreuse en clinique. Par contre, il est tout à fait envisageable de développer de nouveaux virus oncolytiques, dont nous maîtrisons la manipulation dans l'équipe, équipés de shARN dirigés contre la CDA, injectés localement dans la tumeur, et le cas échéant dans la circulation afin d'atteindre les métastases. Aussi, plusieurs études récentes rapportent l'utilisation d'exosomes dérivés par exemple de cellules mésenchymateuses fibroblastiques portant un siARN spécifique de l'oncogène *KRAS*^{G12D} *in vivo* dans un modèle murin de cancer du pancréas³⁶⁶. Cette technologie, appelés iExosomes, qui permet le ciblage spécifique de la forme active mutée de Kras, pourrait être adaptée à notre problématique. D'autres études développent également l'encapsulation de siARNs dans des nanoparticules synthétiques à base de lipides ou de polymères³⁶⁷. Enfin, la découverte d'interactants de la CDA et de son mécanisme d'action permettrait d'envisager de nouvelles solutions thérapeutiques, telles que le ciblage de sa nouvelle fonction, le blocage de son interaction avec ses partenaires impliqués dans le phénotype protumoral que nous avons identifié, ou encore le ciblage de ses partenaires. Dans l'attente de ces résultats, il est toutefois possible d'imaginer le couplage des inhibiteurs catalytiques de la CDA à un signal d'adressage au protéasome qui permettraient ainsi la dégradation systématique de la protéine. Des études complémentaires sur l'efficacité des différentes approches proposées, notamment compte tenu de la difficulté à atteindre et

traiter les tumeurs du pancréas, sont donc nécessaires avant de faire de la CDA une nouvelle cible thérapeutique prometteuse pour ce cancer qui demeure incurable.

Bibliographie

1. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 9th Edition PDF Free Download [Direct Link]. *Medicos Times* <https://medicostimes.com/robbins-pathology-pdf/> (2018).
2. Bustinza-Linares, E., Kurzrock, R. & Tsimberidou, A.-M. Salirasib in the treatment of pancreatic cancer. *Future Oncol.* **6**, 885–891 (2010).
3. Rhim, A. D. *et al.* EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* **148**, 349–361 (2012).
4. Kamisawa, T., Isawa, T., Koike, M., Tsuruta, K. & Okamoto, A. Hematogenous Metastases of Pancreatic Ductal Carcinoma. *Pancreas* **11**, 345–349 (1995).
5. Rawla, P., Sunkara, T. & Gaduputi, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J. Oncol.* **10**, 10–27 (2019).
6. Cruz, M. S. D. D. L., Young, A. P. & Ruffin, M. T. Diagnosis and Management of Pancreatic Cancer. *Am. Fam. Physician* **89**, 626–632 (2014).
7. Parkin, D. M., Boyd, L. & Walker, L. C. 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br. J. Cancer* **105 Suppl 2**, S77-81 (2011).
8. Jarosz, M., Sekuła, W. & Rychlik, E. Influence of diet and tobacco smoking on pancreatic cancer incidence in poland in 1960-2008. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2012**, 682156 (2012).
9. Chari, S. T. *et al.* Pancreatic Cancer–Associated Diabetes Mellitus: Prevalence and Temporal Association With Diagnosis of Cancer. *Gastroenterology* **134**, 95–101 (2008).
10. Midha, S., Chawla, S. & Garg, P. K. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett.* **381**, 269–277 (2016).
11. Rosato, V. *et al.* Population attributable risk for pancreatic cancer in Northern Italy. *Pancreas* **44**, 216–220 (2015).
12. Culetto, A., Bournet, B. & Buscail, L. Clinical profile of cannabis-associated acute pancreatitis. *Dig. Liver Dis.* **49**, 1284–1285 (2017).
13. Maitra, A. & Hruban, R. H. Pancreatic Cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 157–188 (2008).

14. Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **531**, 47–52 (2016).
15. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **32**, 185–203.e13 (2017).
16. Wennerberg, K., Rossman, K. L. & Der, C. J. The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 843–846 (2005).
17. Lüscher, B. Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene* **277**, 1–14 (2001).
18. Klump, B. *et al.* Methylation status of p14ARF and p16INK4a as detected in pancreatic secretions. *Br. J. Cancer* **88**, 217–222 (2003).
19. Sherr, C. J. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 663–673 (2006).
20. Chen, C.-R., Kang, Y., Siegel, P. M. & Massagué, J. E2F4/5 and p107 as Smad Cofactors Linking the TGF β Receptor to c-myc Repression. *Cell* **110**, 19–32 (2002).
21. Hruban, R. H., Maitra, A., Kern, S. E. & Goggins, M. Precursors to Pancreatic Cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **36**, 831–vi (2007).
22. Hingorani, S. R. *et al.* Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437–450 (2003).
23. Delpeu, Y. *et al.* Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Curr. Genomics* **12**, 15–24 (2011).
24. Hingorani, S. R. *et al.* Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**, 469–483 (2005).
25. Al Saati, T. *et al.* Oxidative stress induced by inactivation of TP53INP1 cooperates with KrasG12D to initiate and promote pancreatic carcinogenesis in the murine pancreas. *Am. J. Pathol.* **182**, 1996–2004 (2013).
26. Safi, F. *et al.* High sensitivity and specificity of CA 19-9 for pancreatic carcinoma in comparison to chronic pancreatitis. Serological and immunohistochemical findings. *Pancreas* **2**, 398–403 (1987).

27. Moffitt, R. A. *et al.* Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Genet.* **47**, 1168–1178 (2015).
28. Puleo, F. *et al.* Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology* **155**, 1999–2013.e3 (2018).
29. Juiz, N. A., Iovanna, J. & Duseti, N. Pancreatic Cancer Heterogeneity Can Be Explained Beyond the Genome. *Front. Oncol.* **9**, (2019).
30. Iovanna, J. & Duseti, N. Speeding towards individualized treatment for pancreatic cancer by taking an alternative road. *Cancer Lett.* **410**, 63–67 (2017).
31. Duconseil, P. *et al.* Transcriptomic analysis predicts survival and sensitivity to anticancer drugs of patients with a pancreatic adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **185**, 1022–1032 (2015).
32. Bournet, B., Buscail, C., Muscari, F., Cordelier, P. & Buscail, L. Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **54**, 75–83 (2016).
33. Fuccio, L. *et al.* The role of K-ras gene mutation analysis in EUS-guided FNA cytology specimens for the differential diagnosis of pancreatic solid masses: a meta-analysis of prospective studies. *Gastrointest. Endosc.* **78**, 596–608 (2013).
34. Bournet, B. *et al.* Molecular endoscopic ultrasound for diagnosis of pancreatic cancer. *Cancers* **3**, 872–882 (2011).
35. Bournet, B. *et al.* Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with a KRAS mutation assay using allelic discrimination improves the diagnosis of pancreatic cancer. *J. Clin. Gastroenterol.* **49**, 50–56 (2015).
36. Brychta, N., Krahn, T. & Ahsen, O. von. Detection of KRAS Mutations in Circulating Tumor DNA by Digital PCR in Early Stages of Pancreatic Cancer. *Clin. Chem.* **62**, 1482–1491 (2016).
37. Earl, J. *et al.* Circulating tumor cells (CTC) and KRAS mutant circulating free DNA (cfDNA) detection in peripheral blood as biomarkers in patients diagnosed with exocrine pancreatic cancer. *BMC Cancer* **15**, (2015).

38. Kahlert, C. *et al.* Identification of Double-stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated KRAS and p53 DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer. *J. Biol. Chem.* **289**, 3869–3875 (2014).
39. Barault, L. *et al.* Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of treatment response in metastatic colorectal cancer. *Gut* **67**, 1995–2005 (2018).
40. Malbec, R. *et al.* Microfluidics for minute DNA sample analysis: open challenges for genetic testing of cell-free circulating DNA in blood plasma. *Micro Nano Eng.* **1**, 25–32 (2018).
41. Habbe, N. *et al.* MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 340–346 (2009).
42. du Rieu, M. C. *et al.* MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin. Chem.* **56**, 603–612 (2010).
43. Yu, J., Li, A., Hong, S.-M., Hruban, R. H. & Goggins, M. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 981–992 (2012).
44. Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **379**, 2395–2406 (2018).
45. Tempero, M. A. *et al.* Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **15**, 1028–1061 (2017).
46. Neuzillet, C. *et al.* Pancreatic cancer: French clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, ACHBT, AFC). *Dig. Liver Dis.* **50**, 1257–1271 (2018).
47. Samore, W. R. & Gondi, C. S. Brief overview of selected approaches in targeting pancreatic adenocarcinoma. *Expert Opin. Investig. Drugs* **23**, 793–807 (2014).
48. Golan, T. *et al.* Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **381**, 317–327 (2019).
49. Balsano, R., Tommasi, C. & Garajova, I. State of the Art for Metastatic Pancreatic Cancer Treatment: Where Are We Now? *Anticancer Res.* **39**, 3405–3412 (2019).

50. Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1817–1825 (2011).
51. Belli, C., Cereda, S. & Reni, M. Role of taxanes in pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* **18**, 4457–4465 (2012).
52. Mohammed, S., Van Buren II, G. & Fisher, W. E. Pancreatic cancer: Advances in treatment. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 9354–9360 (2014).
53. Von Hoff, D. D. *et al.* Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1691–1703 (2013).
54. Storniolo, A. M. *et al.* An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* **85**, 1261–1268 (1999).
55. Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I. & Mazzei, T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann. Oncol.* **17**, v7–v12 (2006).
56. Huang, P., Chubb, S., Hertel, L. W., Grindey, G. B. & Plunkett, W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA Synthesis. *Cancer Res.* **51**, 6110–6117 (1991).
57. Chandler, N. M., Canete, J. J. & Callery, M. P. Caspase-3 drives apoptosis in pancreatic cancer cells after treatment with gemcitabine. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* **8**, 1072–1078 (2004).
58. Morgan, M. A. *et al.* Role of Checkpoint Kinase 1 in Preventing Premature Mitosis in Response to Gemcitabine. *Cancer Res.* **65**, 6835–6842 (2005).
59. Heinemann, V. *et al.* Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Mol. Pharmacol.* **38**, 567–572 (1990).
60. Pourquier, P. *et al.* Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **8**, 2499–2504 (2002).
61. Rizzuto, I., Ghazaly, E. & Peters, G. J. Pharmacological factors affecting accumulation of gemcitabine's active metabolite, gemcitabine triphosphate. *Pharmacogenomics* **18**, 911–925 (2017).

62. Bhutia, Y. D., Hung, S. W., Patel, B., Lovin, D. & Govindarajan, R. CNT1 expression influences proliferation and chemosensitivity in drug-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* **71**, 1825–1835 (2011).
63. Galmarini, C. M. *et al.* Potential mechanisms of resistance to cytarabine in AML patients. *Leuk. Res.* **26**, 621–629 (2002).
64. Achiwa, H. *et al.* Determinants of sensitivity and resistance to gemcitabine: the roles of human equilibrative nucleoside transporter 1 and deoxycytidine kinase in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* **95**, 753–757 (2004).
65. Greenhalf, W. *et al.* Pancreatic cancer hENT1 expression and survival from gemcitabine in patients from the ESPAC-3 trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **106**, djt347 (2014).
66. Bouffard, D. Y., Laliberté, J. & Momparler, R. L. Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 1857–1861 (1993).
67. Grunewald, R., Abbruzzese, J. L., Tarassoff, P. & Plunkett, W. Saturation of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate accumulation by mononuclear cells during a phase I trial of gemcitabine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **27**, 258–262 (1991).
68. Kroep, J. R. *et al.* Pretreatment Deoxycytidine Kinase Levels Predict in Vivo Gemcitabine Sensitivity 1 Supported by Eli Lilly & Co, International and The Netherlands.1. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 371–376 (2002).
69. Buscail, L. *et al.* First-in-man phase 1 clinical trial of gene therapy for advanced pancreatic cancer: safety, biodistribution, and preliminary clinical findings. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **23**, 779–789 (2015).
70. Wang, L. *et al.* Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *FEBS Lett.* **443**, 170–174 (1999).
71. Nakahira, S. *et al.* Involvement of ribonucleotide reductase M1 subunit overexpression in gemcitabine resistance of human pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **120**, 1355–1363 (2007).

72. Akita, H. *et al.* Significance of RRM1 and ERCC1 expression in resectable pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* **28**, 2903–2909 (2009).
73. Plunkett, W., Huang, P., Searcy, C. E. & Gandhi, V. Gemcitabine: preclinical pharmacology and mechanisms of action. *Semin. Oncol.* **23**, 3–15 (1996).
74. Davidson, J. D. *et al.* An Increase in the Expression of Ribonucleotide Reductase Large Subunit 1 Is Associated with Gemcitabine Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* **64**, 3761–3766 (2004).
75. Van der Donk, W. A. *et al.* Detection of a new substrate-derived radical during inactivation of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* by gemcitabine 5'-diphosphate. *Biochemistry* **37**, 6419–6426 (1998).
76. Bergman, A. M. *et al.* In vivo induction of resistance to gemcitabine results in increased expression of ribonucleotide reductase subunit M1 as the major determinant. *Cancer Res.* **65**, 9510–9516 (2005).
77. Shukla, S. K. *et al.* MUC1 and HIF-1 α Signaling Crosstalk Induces Anabolic Glucose Metabolism to Impart Gemcitabine Resistance to Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **32**, 392 (2017).
78. Gilbert, L. A. & Hemann, M. T. Chemotherapeutic Resistance: Surviving Stressful Situations. *Cancer Res.* **71**, 5062–5066 (2011).
79. Weizman, N. *et al.* Macrophages mediate gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma by upregulating cytidine deaminase. *Oncogene* **33**, 3812–3819 (2014).
80. Reizer, J., Buskirk, S., Bairoch, A., Reizer, A. & Saier, M. H. A novel zinc-binding motif found in two ubiquitous deaminase families. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **3**, 853–856 (1994).
81. Stelzer, G. *et al.* The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **54**, 1.30.1–1.30.33 (2016).
82. Johansson, E., Mejlhede, N., Neuhard, J. & Larsen, S. Crystal Structure of the Tetrameric Cytidine Deaminase from *Bacillus subtilis* at 2.0 Å Resolution. *Biochemistry* **41**, 2563–2570 (2002).
83. Kumar, R., DiMenna, L. J., Chaudhuri, J. & Evans, T. Biological function of activation-induced cytidine deaminase (AID). *Biomed. J.* **37**, 269–283 (2014).

84. Saccone, S. *et al.* Assignment of the human cytidine deaminase (CDA) gene to chromosome 1 band p35-p36.2. *Genomics* **22**, 661–662 (1994).
85. Demontis, S. *et al.* Isolation and characterization of the gene coding for human cytidine deaminase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* **1443**, 323–333 (1998).
86. Vincenzetti, S., Cambi, A., Neuhard, J., Garattini, E. & Vita, A. Recombinant human cytidine deaminase: expression, purification, and characterization. *Protein Expr. Purif.* **8**, 247–253 (1996).
87. Cacciamani, T. *et al.* Purification of human cytidine deaminase: Molecular and enzymatic characterization and inhibition by synthetic pyrimidine analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **290**, 285–292 (1991).
88. Vincenzetti, S. *et al.* Possible role of two phenylalanine residues in the active site of human cytidine deaminase. *Protein Eng.* **13**, 791–799 (2000).
89. Chung, S. J., Fromme, J. C. & Verdine, G. L. Structure of Human Cytidine Deaminase Bound to a Potent Inhibitor. *J. Med. Chem.* **48**, 658–660 (2005).
90. Cambi, A. *et al.* Identification of four amino acid residues essential for catalysis in human cytidine deaminase by site-directed mutagenesis and chemical modifications. *Protein Eng.* **11**, 59–63 (1998).
91. Costanzi, S. *et al.* Human cytidine deaminase: understanding the catalytic mechanism. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **22**, 1539–1543 (2003).
92. Betts, L., Xiang, S., Short, S. A., Wolfenden, R. & Carter, C. W. Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex. *J. Mol. Biol.* **235**, 635–656 (1994).
93. Vincenzetti, S. *et al.* Modulation of human cytidine deaminase by specific aminoacids involved in the intersubunit interactions. *Proteins* **70**, 144–156 (2008).
94. Vincenzetti, S. *et al.* Site directed mutagenesis as a tool to understand the catalytic mechanism of human cytidine deaminase. *Protein Pept. Lett.* **20**, 538–549 (2013).
95. Kühn, K., Bertling, W. M. & Emmrich, F. Cloning of a functional cDNA for human cytidine deaminase (CDD) and its use as a marker of monocyte/macrophage differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 1–7 (1993).

96. Laliberté, J. & Momparler, R. L. Human cytidine deaminase: purification of enzyme, cloning, and expression of its complementary DNA. *Cancer Res.* **54**, 5401–5407 (1994).
97. Vincenzetti, S. *et al.* Isoenzymatic forms of human cytidine deaminase. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **17**, 871–877 (2004).
98. Serdjebi, C., Milano, G. & Ciccolini, J. Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **11**, 665–672 (2015).
99. Yue, L. *et al.* A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity. *Pharmacogenetics* **13**, 29–38 (2003).
100. Carpi, F. M. *et al.* CDA gene polymorphisms and enzyme activity: genotype-phenotype relationship in an Italian-Caucasian population. *Pharmacogenomics* **14**, 769–781 (2013).
101. Nygaard, P. On the role of cytidine deaminase in cellular metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **195 Pt B**, 415–420 (1986).
102. Chen, M., Herde, M. & Witte, C.-P. Of the Nine Cytidine Deaminase-Like Genes in Arabidopsis, Eight Are Pseudogenes and Only One Is Required to Maintain Pyrimidine Homeostasis in Vivo. *Plant Physiol.* **171**, 799–809 (2016).
103. Pyrimidine Biosynthesis and Catabolism. *BrainKart*
https://www.brainkart.com/article/Pyrimidine-Biosynthesis-and-Catabolism_27712/.
104. Purine and Pyrimidine Metabolism in Man V: Part B: Basic Science Aspects - Google Livres.
<https://books.google.fr/>
105. Dahncke, K. & Witte, C.-P. Plant purine nucleoside catabolism employs a guanosine deaminase required for the generation of xanthosine in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 4101–4109 (2013).
106. Binder, J. X. *et al.* COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence. *Database J. Biol. Databases Curation* **2014**, bau012 (2014).
107. Alexander, S. P. *et al.* THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* **174 Suppl 1**, S17–S129 (2017).

108. Somasekaram, A., Jarmuz, A., How, A., Scott, J. & Navaratnam, N. Intracellular localization of human cytidine deaminase. Identification of a functional nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* **274**, 28405–28412 (1999).
109. Chalmers, I. M., Thomson, G. T. & Desjardins, P. Serum cytidine deaminase as a laboratory test for acute inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **47**, 173–174 (1988).
110. Ciccolini, J. *et al.* Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 160–165 (2010).
111. DeAngelis, L. M., Kreis, W., Chan, K., Dantis, E. & Akerman, S. Pharmacokinetics of ara-C and ara-U in plasma and CSF after high-dose administration of cytosine arabinoside. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **29**, 173–177 (1992).
112. Peters, G. J. *et al.* Selection of the best blood compartment to measure cytidine deaminase activity to stratify for optimal gemcitabine or cytarabine treatment. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **33**, 403–412 (2014).
113. Sugiyama, E. *et al.* Population pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite in Japanese cancer patients: impact of genetic polymorphisms. *Clin. Pharmacokinet.* **49**, 549–558 (2010).
114. Jones, D. D., Bahijri, S., Roberts, E. L. & Williams, G. F. Activity of serum cytidine deaminase during pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **89**, 314–317 (1982).
115. Thompson, P. W., Jones, D. D. & Currey, H. L. Cytidine deaminase activity as a measure of acute inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **45**, 9–14 (1986).
116. Taysi, S., Polat, M. F., Sari, R. A. & Bakan, E. Serum Adenosine Deaminase and Cytidine Deaminase Activities in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**, 493–495 (2005).
117. Schröder, J. K., Kirch, C., Seeber, S. & Schütte, J. Structural and functional analysis of the cytidine deaminase gene in patients with acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **103**, 1096–1103 (1998).
118. Watanabe, S. & Uchida, T. Expression of cytidine deaminase in human solid tumors and its regulation by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochim. Biophys. Acta* **1312**, 99–104 (1996).

119. Mejer, J. & Nygaard, P. Adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase levels in acute myeloblastic leukemia cells. Relationship to diagnosis and clinical course. *Leuk. Res.* **3**, 211–216 (1979).
120. Shord, S. S. & Patel, S. R. Paclitaxel alters the expression and specific activity of deoxycytidine kinase and cytidine deaminase in non-small cell lung cancer cell lines. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **28**, 76 (2009).
121. Frese, K. K. *et al.* nab-paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Discov.* **2**, 260–269 (2012).
122. Mameri, H. *et al.* Cytidine Deaminase Deficiency Reveals New Therapeutic Opportunities against Cancer. *Clin. Cancer Res.* **23**, 2116–2126 (2017).
123. Ge, Y. *et al.* The role of cytidine deaminase and GATA1 mutations in the increased cytosine arabinoside sensitivity of Down syndrome myeloblasts and leukemia cell lines. *Cancer Res.* **64**, 728–735 (2004).
124. Fitzgerald, S. M. *et al.* Identification of functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the cytidine deaminase promoter. *Hum. Genet.* **119**, 276–283 (2006).
125. Ye, F.-G. *et al.* Cytidine Deaminase Axis Modulated by miR-484 Differentially Regulates Cell Proliferation and Chemoresistance in Breast Cancer. *Cancer Res.* **75**, 1504–1515 (2015).
126. Rajabpour, A. *et al.* MiR-608 regulating the expression of ribonucleotide reductase M1 and cytidine deaminase is repressed through induced gemcitabine chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **80**, 765–775 (2017).
127. Amit, M. & Gil, Z. Macrophages increase the resistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine by upregulating cytidine deaminase. *Oncoimmunology* **2**, e27231 (2013).
128. Binenbaum, Y. *et al.* Transfer of miRNA in Macrophage-Derived Exosomes Induces Drug Resistance in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **78**, 5287–5299 (2018).
129. Yue, L. *et al.* A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity. *Pharmacogenetics* **13**, 29–38 (2003).

130. Micozzi, D. *et al.* Human cytidine deaminase: A biochemical characterization of its naturally occurring variants. *Int. J. Biol. Macromol.* **63**, 64–74 (2014).
131. Giovannetti, E. *et al.* Correlation between cytidine deaminase genotype and gemcitabine deamination in blood samples. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **27**, 720–725 (2008).
132. Kirch, H. C. *et al.* Recombinant gene products of two natural variants of the human cytidine deaminase gene confer different deamination rates of cytarabine in vitro. *Exp. Hematol.* **26**, 421–425 (1998).
133. Gilbert, J. A. *et al.* Gemcitabine Pharmacogenomics: Cytidine Deaminase and Deoxycytidylate Deaminase Gene Resequencing and Functional Genomics. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1794–1803 (2006).
134. Hornbeck, P. V. *et al.* PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* **43**, D512–D520 (2015).
135. Costanzi, S. *et al.* Delineation of the molecular mechanisms of nucleoside recognition by cytidine deaminase through virtual screening. *ChemMedChem* **6**, 1452–1458 (2011).
136. West, T. P. & O'Donovan, G. A. Repression of cytosine deaminase by pyrimidines in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **149**, 1171 (1982).
137. Tozzi, M. G., Sgarrella, F. & Ipata, P. L. Induction and repression of enzymes involved in exogenous purine compound utilization in *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **678**, 460–466 (1981).
138. Hanze, A. R. Nucleic acids. IV. The catalytic reduction of pyrimidine nucleosides (human liver deaminase inhibitors). *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 6720–6725 (1967).
139. Cohen, R. M. & Wolfenden, R. Cytidine Deaminase from *Escherichia coli*: PURIFICATION, PROPERTIES, AND INHIBITION BY THE POTENTIAL TRANSITION STATE ANALOG 3,4,5,6-TETRAHYDROURIDINE. *J. Biol. Chem.* **246**, 7561–7565 (1971).
140. Teh, A.-H. *et al.* The 1.48 Å Resolution Crystal Structure of the Homotetrameric Cytidine Deaminase from Mouse. *Biochemistry* **45**, 7825–7833 (2006).
141. Funamizu, N. *et al.* Tetrahydrouridine Inhibits Cell Proliferation through Cell Cycle Regulation Regardless of Cytidine Deaminase Expression Levels. *PLoS ONE* **7**, (2012).

142. Beumer, J. H. *et al.* Plasma pharmacokinetics and oral bioavailability of the 3,4,5,6-tetrahydrouridine (THU) prodrug, triacetyl-THU (taTHU), in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **67**, 421–430 (2011).
143. Ferraris, D. *et al.* Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Fluorinated Tetrahydrouridine Derivatives as Inhibitors of Cytidine Deaminase. *J. Med. Chem.* **57**, 2582–2588 (2014).
144. McCormack, J. J., Marquez, V. E., Liu, P. S., Vistica, D. T. & Driscoll, J. S. Inhibition of cytidine deaminase by 2-oxopyrimidine riboside and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 830–832 (1980).
145. Schroeder, G. K., Zhou, L., Snider, M. J., Chen, X. & Wolfenden, R. Flight of a Cytidine Deaminase Complex with an Imperfect Transition State Analogue Inhibitor: Mass Spectrometric Evidence for the Presence of a Trapped Water Molecule. *Biochemistry* **51**, 6476–6486 (2012).
146. Zhou, L. *et al.* Zebularine: A Novel DNA Methylation Inhibitor that Forms a Covalent Complex with DNA Methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **321**, 591–599 (2002).
147. Liu, P. S., Marquez, V. E., Driscoll, J. S., Fuller, R. W. & McCormack, J. J. Cyclic urea nucleosides. Cytidine deaminase activity as a function of aglycon ring size. *J. Med. Chem.* **24**, 662–666 (1981).
148. Chung, S. J., Fromme, J. C. & Verdine, G. L. Structure of human cytidine deaminase bound to a potent inhibitor. *J. Med. Chem.* **48**, 658–660 (2005).
149. German, J. Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genet. Cytogenet.* **93**, 100–106 (1997).
150. Gemble, S. *et al.* A balanced pyrimidine pool is required for optimal Chk1 activation to prevent ultrafine anaphase bridge formation. *J Cell Sci* **129**, 3167–3177 (2016).
151. Bloom, D. Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs; probably a syndrome entity. *AMA Am. J. Dis. Child.* **88**, 754–758 (1954).
152. Cunliffe, C., Bassetti, J. A. & Ellis, N. A. Bloom's Syndrome: Clinical Spectrum, Molecular Pathogenesis, and Cancer Predisposition. *Mol. Syndromol.* **8**, 4–23 (2017).

153. Chu, W. K. & Hickson, I. D. RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 644–654 (2009).
154. German, J. Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)* **72**, 393–406 (1993).
155. Amor-Gu  ret, M. *et al.* Three new BLM gene mutations associated with Bloom syndrome. *Genet. Test.* **12**, 257–261 (2008).
156. Gemble, S. *et al.* Pyrimidine Pool Disequilibrium Induced by a Cytidine Deaminase Deficiency Inhibits PARP-1 Activity, Leading to the Under Replication of DNA. *PLoS Genet.* **11**, (2015).
157. Nicotera, T. M. Molecular and biochemical aspects of Bloom’s syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* **53**, 1–13 (1991).
158. Nicotera, T., Thusu, K. & Dandona, P. Elevated production of active oxygen in Bloom’s syndrome cell lines. *Cancer Res.* **53**, 5104–5107 (1993).
159. Camiener, G. W. & Smith, C. G. Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside. I. Enzyme distribution and species specificity. *Biochem. Pharmacol.* **14**, 1405–1416 (1965).
160. Neff, T. & Blau, C. A. Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp. Hematol.* **24**, 1340–1346 (1996).
161. Ebrahim, Q., Mahfouz, R., Ng, K. P. & Sauntharajah, Y. High cytidine deaminase expression in the liver provides sanctuary for cancer cells from decitabine treatment effects. *Oncotarget* **3**, 1137–1145 (2012).
162. Abbruzzese, J. L. *et al.* A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine. *J. Clin. Oncol.* **9**, 491–498 (1991).
163. Crooke, S. T. & Prestayko, A. W. *Antineoplastic Agents*. (Elsevier, 2013).
164. Serdjebi, C. *et al.* Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen. *Pharmacogenomics* **14**, 1047–1051 (2013).
165. Weizman, N. *et al.* Macrophages mediate gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma by upregulating cytidine deaminase. *Oncogene* **33**, 3812–3819 (2014).

166. Geller, L. T. *et al.* Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science* **357**, 1156–1160 (2017).
167. Serdjebi, C. *et al.* FFCD-1004 Clinical Trial: Impact of Cytidine Deaminase Activity on Clinical Outcome in Gemcitabine-Monotherapy Treated Patients. *PLoS ONE* **10**, (2015).
168. Mercier, C. *et al.* Toxic death case in a patient undergoing gemcitabine-based chemotherapy in relation with cytidine deaminase downregulation. *Pharmacogenet. Genomics* **17**, 841–844 (2007).
169. Morita, T., Matsuzaki, A., Kurokawa, S. & Tokue, A. Forced Expression of Cytidine Deaminase Confers Sensitivity to Capecitabine. *Oncology* **65**, 267–274 (2003).
170. Uhlén, M. *et al.* Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419 (2015).
171. Guo, D. *et al.* Stability of 5-fluoro-2'-deoxycytidine and tetrahydrouridine in combination. *AAPS PharmSciTech* **11**, 247–252 (2010).
172. Laliberté, J., Marquez, V. E. & Momparler, R. L. Potent inhibitors for the deamination of cytosine arabinoside and 5-aza-2'-deoxycytidine by human cytidine deaminase. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **30**, 7–11 (1992).
173. Lemaire, M., Momparler, L. F., Raynal, N. J.-M., Bernstein, M. L. & Momparler, R. L. Inhibition of cytidine deaminase by zebularine enhances the antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **63**, 411–416 (2009).
174. Wong, P. P. *et al.* Phase I evaluation of tetrahydrouridine combined with cytosine arabinoside. *Cancer Treat. Rep.* **63**, 1245–1249 (1979).
175. Leija, C. *et al.* Pyrimidine Salvage Enzymes Are Essential for De Novo Biosynthesis of Deoxypyrimidine Nucleotides in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* **12**, (2016).
176. Zauri, M. *et al.* CDA directs metabolism of epigenetic nucleosides revealing a therapeutic window in cancer. *Nature* **524**, 114–118 (2015).
177. Boorstein, R. J., Chiu, L. N. & Teebor, G. W. A mammalian cell line deficient in activity of the DNA repair enzyme 5-hydroxymethyluracil-DNA glycosylase is resistant to the toxic effects of the thymidine analog 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5536–5540 (1992).

178. Lachmann, N. *et al.* Myeloprotection by Cytidine Deaminase Gene Transfer in Antileukemic Therapy. *Neoplasia N. Y. N* **15**, 239–248 (2013).
179. Lachmann, N. *et al.* Efficient *in vivo* regulation of cytidine deaminase expression in the haematopoietic system using a doxycycline-inducible lentiviral vector system. *Gene Ther.* **20**, 298–307 (2013).
180. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
181. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
182. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
183. Koppenol, W. H., Bounds, P. L. & Dang, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 325–337 (2011).
184. Hsu, P. P. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**, 703–707 (2008).
185. Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 85–95 (2011).
186. Newsholme, E. A., Crabtree, B. & Ardawi, M. S. The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci. Rep.* **5**, 393–400 (1985).
187. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
188. Ying, H. *et al.* Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* **30**, 355–385 (2016).
189. Gambhir, S. S. *et al.* A tabulated summary of the FDG PET literature. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **42**, 1S-93S (2001).
190. Boland, M. L., Chourasia, A. H. & Macleod, K. F. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front. Oncol.* **3**, 292 (2013).
191. Weinberg, F. *et al.* Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8788–8793 (2010).

192. Andersson, S. G. E., Karlberg, O., Canbäck, B. & Kurland, C. G. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **358**, 165–177; discussion 177–179 (2003).
193. Posakony, J. W., England, J. M. & Attardi, G. Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. *J. Cell Biol.* **74**, 468–491 (1977).
194. Henze, K. & Martin, W. Evolutionary biology: Essence of mitochondria. *Nature* **426**, 127–128 (2003).
195. Barrell, B. G., Bankier, A. T. & Drouin, J. A different genetic code in human mitochondria. *Nature* **282**, 189–194 (1979).
196. van der Bliek, A. M., Sedensky, M. M. & Morgan, P. G. Cell Biology of the Mitochondrion. *Genetics* **207**, 843–871 (2017).
197. Soares, P. *et al.* Correcting for Purifying Selection: An Improved Human Mitochondrial Molecular Clock. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 740–759 (2009).
198. Friedman, J. R. & Nunnari, J. Mitochondrial form and function. *Nature* **505**, 335–343 (2014).
199. Ngo, H. B., Kaiser, J. T. & Chan, D. C. The mitochondrial transcription and packaging factor Tfam imposes a U-turn on mitochondrial DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1290–1296 (2011).
200. Alam, T. I. *et al.* Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1640–1645 (2003).
201. Ashley, N. *et al.* Defects in maintenance of mitochondrial DNA are associated with intramitochondrial nucleotide imbalances. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1400–1411 (2007).
202. The Biogenesis of Mitochondria | Annual Review of Biochemistry. <https://www.annualreviews.org/gate2.inist.fr/doi/abs/10.1146/annurev.bi.39.070170.001343>.
203. Asin-Cayuela, J. & Gustafsson, C. M. Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 111–117 (2007).
204. Dairaghi, D. J., Shadel, G. S. & Clayton, D. A. Human mitochondrial transcription factor A and promoter spacing integrity are required for transcription initiation. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**, 127–134 (1995).

205. Wanrooij, S. & Falkenberg, M. The human mitochondrial replication fork in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1378–1388 (2010).
206. Garrido, N. *et al.* Composition and Dynamics of Human Mitochondrial Nucleoids. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1583–1596 (2002).
207. Ricchetti, M. Replication stress in mitochondria. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **808**, 93–102 (2018).
208. Ekstrand, M. I. *et al.* Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 935–944 (2004).
209. Schägger, H. & Pfeiffer, K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**, 1777–1783 (2000).
210. Cogliati, S. *et al.* Mechanism of super-assembly of respiratory complexes III and IV. *Nature* **539**, 579–582 (2016).
211. Enríquez, J. A. Supramolecular Organization of Respiratory Complexes. *Annu. Rev. Physiol.* **78**, 533–561 (2016).
212. Parsons, D. W. *et al.* An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* **321**, 1807–1812 (2008).
213. Pollard, P. J. *et al.* Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2231–2239 (2005).
214. Pan, Y. *et al.* Multiple Factors Affecting Cellular Redox Status and Energy Metabolism Modulate Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Activity In Vivo and In Vitro. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 912–925 (2007).
215. King, A., Selak, M. A. & Gottlieb, E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* **25**, 4675–4682 (2006).
216. Selak, M. A. *et al.* Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* **7**, 77–85 (2005).
217. Spelbrink, J. N. *et al.* Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat. Genet.* **28**, 223 (2001).

218. Goffart, S. *et al.* Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and in vivo mtDNA replication stalling. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 328–340 (2009).
219. Longley, M. J. *et al.* Mutant POLG2 Disrupts DNA Polymerase γ Subunits and Causes Progressive External Ophthalmoplegia. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 1026–1034 (2006).
220. Goethem, G. V., Dermaut, B., Löfgren, A., Martin, J.-J. & Broeckhoven, C. V. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat. Genet.* **28**, 211 (2001).
221. Viscomi, C. & Zeviani, M. MtDNA-maintenance defects: syndromes and genes. *J. Inherit. Metab. Dis.* **40**, 587–599 (2017).
222. Rodier, G. *et al.* The Transcription Factor E4F1 Coordinates CHK1-Dependent Checkpoint and Mitochondrial Functions. *Cell Rep.* **11**, 220–233 (2015).
223. He, Y. *et al.* Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* **464**, 610–614 (2010).
224. Petros, J. A. *et al.* mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 719–724 (2005).
225. Zhou, S. *et al.* Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7540–7545 (2007).
226. Ishikawa, K. *et al.* ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* **320**, 661–664 (2008).
227. Hamanaka, R. B. & Chandel, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 505–513 (2010).
228. Ralph, S. J., Rodríguez-Enríquez, S., Neuzil, J., Saavedra, E. & Moreno-Sánchez, R. The causes of cancer revisited: ‘mitochondrial malignancy’ and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy. *Mol. Aspects Med.* **31**, 145–170 (2010).
229. Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. & Lesnefsky, E. J. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* **278**, 36027–36031 (2003).

230. Giannoni, E., Buricchi, F., Raugei, G., Ramponi, G. & Chiarugi, P. Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6391–6403 (2005).
231. Chiarugi, P. & Cirri, P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 509–514 (2003).
232. Cunnick, J. M. *et al.* Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 14468–14475 (1998).
233. Stojković, G. *et al.* Oxidative DNA damage stalls the human mitochondrial replisome. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
234. Pai, C.-C. & Kearsey, S. E. A Critical Balance: dNTPs and the Maintenance of Genome Stability. *Genes* **8**, (2017).
235. Bourdon, A. *et al.* Mutation of *RRM2B*, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* **39**, 776–780 (2007).
236. Kazak, L., Reyes, A. & Holt, I. J. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 659–671 (2012).
237. Kukat, C. *et al.* Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13534–13539 (2011).
238. Mishra, A., Saxena, S., Kaushal, A. & Nagaraju, G. RAD51C/XRCC3 Facilitates Mitochondrial DNA Replication and Maintains Integrity of the Mitochondrial Genome. *Mol. Cell. Biol.* **38**, e00489-17 (2018).
239. Sage, J. M. & Knight, K. L. Human Rad51 Promotes Mitochondrial DNA Synthesis Under Conditions of Increased Replication Stress. *Mitochondrion* **13**, 350–356 (2013).
240. Bailey, L. J. & Doherty, A. J. Mitochondrial DNA replication: a PrimPol perspective. *Biochem. Soc. Trans.* **45**, 513–529 (2017).

241. Youle, R. J. & Blik, A. M. van der. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science* **337**, 1062–1065 (2012).
242. Twig, G. *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* **27**, 433–446 (2008).
243. Rojo, M., Legros, F., Chateau, D. & Lombès, A. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.* **115**, 1663–1674 (2002).
244. Merkwirth, C. *et al.* Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev.* **22**, 476–488 (2008).
245. Frezza, C. *et al.* OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177–189 (2006).
246. Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A. & van der Blik, A. M. C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell* **4**, 815–826 (1999).
247. Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T. & Mihara, K. Mitotic Phosphorylation of Dynamin-related GTPase Drp1 Participates in Mitochondrial Fission. *J. Biol. Chem.* **282**, 11521–11529 (2007).
248. McBride, H. M., Neuspiel, M. & Wasiak, S. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Curr. Biol.* **16**, R551–R560 (2006).
249. Friedman, J. R. *et al.* ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* **334**, 358–362 (2011).
250. Tanaka, A. *et al.* Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J. Cell Biol.* **191**, 1367–1380 (2010).
251. Hsieh, C.-H. *et al.* Functional Impairment in Miro Degradation and Mitophagy Is a Shared Feature in Familial and Sporadic Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell* **19**, 709–724 (2016).
252. Starr, D. A. & Han, M. Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science* **298**, 406–409 (2002).
253. Sahin, E. *et al.* Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* **470**, 359–365 (2011).

254. Yu, M. *et al.* Mitochondrial fusion exploits a therapeutic vulnerability of pancreatic cancer. *JCI Insight* **5**, (2019).
255. Yu, T., Robotham, J. L. & Yoon, Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2653–2658 (2006).
256. Miret-Casals, L. *et al.* Identification of New Activators of Mitochondrial Fusion Reveals a Link between Mitochondrial Morphology and Pyrimidine Metabolism. *Cell Chem. Biol.* **25**, 268-278.e4 (2018).
257. Serasinghe, M. N. *et al.* Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors. *Mol. Cell* **57**, 521–536 (2015).
258. DeBerardinis, R. J. & Cheng, T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* **29**, 313–324 (2010).
259. Schultz, B. E. & Chan, S. I. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 23–65 (2001).
260. Yang, L., Venneti, S. & Negrath, D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **19**, 163–194 (2017).
261. Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Wu, N., Asara, J. M. & Cantley, L. C. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* **452**, 181–186 (2008).
262. Yuan, M. *et al.* An allostatic mechanism for M2 pyruvate kinase as an amino-acid sensor. *Biochem. J.* **475**, 1821–1837 (2018).
263. Ye, J. *et al.* Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6904–6909 (2012).
264. Prakasam, G., Iqbal, M. A., Bamezai, R. N. K. & Mazurek, S. Posttranslational Modifications of Pyruvate Kinase M2: Tweaks that Benefit Cancer. *Front. Oncol.* **8**, (2018).
265. Locasale, J. W. *et al.* Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat. Genet.* **43**, 869–874 (2011).

266. Hitosugi, T. *et al.* Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth. *Cancer Cell* **22**, 585–600 (2012).
267. Nathan, C. & Ding, A. SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI). *Cell* **140**, 951-951.e2 (2010).
268. Wellen, K. E. *et al.* The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes Dev.* **24**, 2784–2799 (2010).
269. Hart, G. W. & Copeland, R. J. Glycomics hits the big time. *Cell* **143**, 672–676 (2010).
270. Koehler, S. E. & Ladner, R. D. Small interfering RNA-mediated suppression of dUTPase sensitizes cancer cell lines to thymidylate synthase inhibition. *Mol. Pharmacol.* **66**, 620–626 (2004).
271. Matafome, P., Rodrigues, T., Sena, C. & Seica, R. Methylglyoxal in Metabolic Disorders: Facts, Myths, and Promises. *Med. Res. Rev.* **37**, 368–403 (2017).
272. Ying, H. *et al.* Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism. *Cell* **149**, 656–670 (2012).
273. Funes, J. M. *et al.* Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 6223–6228 (2007).
274. Yun, J. *et al.* Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science* **325**, 1555–1559 (2009).
275. Baracca, A. *et al.* Mitochondrial Complex I decrease is responsible for bioenergetic dysfunction in K-ras transformed cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 314–323 (2010).
276. Rajagopalan, H. *et al.* Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* **418**, 934 (2002).
277. Osthus, R. C. *et al.* Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* **275**, 21797–21800 (2000).
278. Shim, H. *et al.* c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6658–6663 (1997).

279. Wise, D. R. *et al.* Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 18782–18787 (2008).
280. Gao, P. *et al.* c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* **458**, 762–765 (2009).
281. Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R. & Lazebnik, Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J. Cell Biol.* **178**, 93–105 (2007).
282. Mannava, S. *et al.* Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. *Cell Cycle Georget. Tex* **7**, 2392–2400 (2008).
283. Cadoret, A. *et al.* New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* **21**, 8293–8301 (2002).
284. Matsuno, T. & Goto, I. Glutaminase and glutamine synthetase activities in human cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **52**, 1192–1194 (1992).
285. Matoba, S. *et al.* p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* **312**, 1650–1653 (2006).
286. Mathupala, S. P., Heese, C. & Pedersen, P. L. Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J. Biol. Chem.* **272**, 22776–22780 (1997).
287. Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M. & Karnieli, E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res.* **64**, 2627–2633 (2004).
288. Kondoh, H. *et al.* Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res.* **65**, 177–185 (2005).
289. Bensaad, K. *et al.* TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* **126**, 107–120 (2006).
290. Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K. & Tanaka, N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat. Cell Biol.* **10**, 611–618 (2008).
291. Vousden, K. H. & Ryan, K. M. p53 and metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 691–700 (2009).

292. Arena, G. *et al.* Mitochondrial MDM2 Regulates Respiratory Complex I Activity Independently of p53. *Mol. Cell* **69**, 594-609.e8 (2018).
293. Saadi, H., Seillier, M. & Carrier, A. The stress protein TP53INP1 plays a tumor suppressive role by regulating metabolic homeostasis. *Biochimie* **118**, 44–50 (2015).
294. Lui, V. W. Y. *et al.* Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov.* **3**, 761–769 (2013).
295. Wong, K.-K., Engelman, J. A. & Cantley, L. C. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 87–90 (2010).
296. Plas, D. R. & Thompson, C. B. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* **24**, 7435–7442 (2005).
297. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* **7**, 11–20 (2008).
298. Elstrom, R. L. *et al.* Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 3892–3899 (2004).
299. Robey, I. F. *et al.* Regulation of the Warburg effect in early-passage breast cancer cells. *Neoplasia N. Y. N* **10**, 745–756 (2008).
300. Manning, B. D. & Cantley, L. C. United at last: the tuberous sclerosis complex gene products connect the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway to mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 573–578 (2003).
301. Bond, P. Regulation of mTORC1 by growth factors, energy status, amino acids and mechanical stimuli at a glance. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **13**, (2016).
302. Guertin, D. A. & Sabatini, D. M. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* **12**, 9–22 (2007).
303. Csibi, A. *et al.* The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell* **153**, 840–854 (2013).
304. Hoxhaj, G. *et al.* The mTORC1 signaling network senses changes in cellular purine nucleotide levels. *Cell Rep.* **21**, 1331–1346 (2017).

305. Robitaille, A. M. *et al.* Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis. *Science* **339**, 1320–1323 (2013).
306. Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S. J. H., Asara, J. M. & Manning, B. D. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science* **351**, 728–733 (2016).
307. Hardie, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 774–785 (2007).
308. Shaw, R. J. *et al.* The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* **6**, 91–99 (2004).
309. Parker, S. J. *et al.* LKB1 promotes metabolic flexibility in response to energy stress. *Metab. Eng.* **43**, 208–217 (2017).
310. Kim, J. *et al.* CPS1 maintains pyrimidine pools and DNA synthesis in KRAS/LKB1-mutant lung cancer cells. *Nature* **546**, 168–172 (2017).
311. Kapitsinou, P. P. & Haase, V. H. The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ.* **15**, 650–659 (2008).
312. Dang, C. V. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1–11 (1999).
313. Ahuja, P. *et al.* Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 1494–1505 (2010).
314. Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. & Dang, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **3**, 177–185 (2006).
315. Thompson, C. B. Metabolic enzymes as oncogenes or tumor suppressors. *N. Engl. J. Med.* **360**, 813–815 (2009).
316. Sonveaux, P. *et al.* Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 3930–3942 (2008).
317. Kennedy, K. M. & Dewhirst, M. W. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol. Lond. Engl.* **6**, 127–148 (2010).

318. Feron, O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **92**, 329–333 (2009).
319. Semenza, G. L. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J. Clin. Invest.* **118**, 3835–3837 (2008).
320. Kim, J., Gao, P., Liu, Y.-C., Semenza, G. L. & Dang, C. V. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7381–7393 (2007).
321. Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G. A. & Mueller-Klieser, W. Lactate: A Metabolic Key Player in Cancer. *Cancer Res.* **71**, 6921–6925 (2011).
322. Gillies, R. J., Robey, I. & Gatenby, R. A. Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **49 Suppl 2**, 24S-42S (2008).
323. Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* **4**, 891–899 (2004).
324. El-Mir, M. Y. *et al.* Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **275**, 223–228 (2000).
325. Foretz, M. *et al.* Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest.* **120**, 2355–2369 (2010).
326. Fiorillo, M. *et al.* Repurposing atovaquone: Targeting mitochondrial complex III and OXPHOS to eradicate cancer stem cells. *Oncotarget* **7**, 34084–34099 (2016).
327. Trachootham, D. *et al.* Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* **10**, 241–252 (2006).
328. Trachootham, D., Alexandre, J. & Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 579–591 (2009).
329. Luengo, A., Gui, D. Y. & Vander Heiden, M. G. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem. Biol.* **24**, 1161–1180 (2017).
330. Zhou, W. *et al.* Proteomic analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma cells reveals metabolic alterations. *J. Proteome Res.* **10**, 1944–1952 (2011).

331. Sears, R., Leone, G., DeGregori, J. & Nevins, J. R. Ras enhances Myc protein stability. *Mol. Cell* **3**, 169–179 (1999).
332. Son, J. *et al.* Glutamine supports pancreatic cancer growth through a Kras-regulated metabolic pathway. *Nature* **496**, 101–105 (2013).
333. Lyssiotis, C. A., Son, J., Cantley, L. C. & Kimmelman, A. C. Pancreatic cancers rely on a novel glutamine metabolism pathway to maintain redox balance. *Cell Cycle Georget. Tex* **12**, 1987–1988 (2013).
334. DeBerardinis, R. J. *et al.* Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19345–19350 (2007).
335. Shanware, N. P., Mullen, A. R., DeBerardinis, R. J. & Abraham, R. T. Glutamine: pleiotropic roles in tumor growth and stress resistance. *J. Mol. Med.* **89**, 229–236 (2011).
336. Wang, Y.-P. *et al.* Arginine Methylation of MDH1 by CARM1 Inhibits Glutamine Metabolism and Suppresses Pancreatic Cancer. *Mol. Cell* **64**, 673–687 (2016).
337. Viale, A. *et al.* Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* **514**, 628–632 (2014).
338. Hillis, A. L. *et al.* PKM2 is not required for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Metab.* **6**, (2018).
339. Davidson, S. M. *et al.* Direct evidence for cancer-cell-autonomous extracellular protein catabolism in pancreatic tumors. *Nat. Med.* **23**, 235–241 (2017).
340. Olivares, O. *et al.* Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient limited conditions. *Nat. Commun.* **8**, 16031 (2017).
341. Kashatus, J. A. *et al.* Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol. Cell* **57**, 537–551 (2015).
342. Gohil, V. M. *et al.* Discovery and therapeutic potential of drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. *Nat. Biotechnol.* **28**, 249–255 (2010).
343. Bereiter-Hahn, J. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* **122**, 1–63 (1990).

344. Boldogh, I. R. & Pon, L. A. Assaying actin-binding activity of mitochondria in yeast. *Methods Cell Biol.* **65**, 159–173 (2001).
345. Yaffe, M. P. *et al.* Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 11664–11668 (1996).
346. Heggeness, M. H., Simon, M. & Singer, S. J. Association of mitochondria with microtubules in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 3863–3866 (1978).
347. Morris, R. L. & Hollenbeck, P. J. Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J. Cell Biol.* **131**, 1315–1326 (1995).
348. Sarria, A. J., Lieber, J. G., Nordeen, S. K. & Evans, R. M. The presence or absence of a vimentin-type intermediate filament network affects the shape of the nucleus in human SW-13 cells. *J. Cell Sci.* **107 (Pt 6)**, 1593–1607 (1994).
349. da Silva, A. F., Mariotti, F. R., Máximo, V. & Campello, S. Mitochondria dynamism: of shape, transport and cell migration. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2313–2324 (2014).
350. Cunliff, B., McKenzie, A. J., Heintz, N. H. & Howe, A. K. AMPK activity regulates trafficking of mitochondria to the leading edge during cell migration and matrix invasion. *Mol. Biol. Cell* **27**, 2662–2674 (2016).
351. Pearson, G. W. Control of Invasion by Epithelial-to-Mesenchymal Transition Programs during Metastasis. *J. Clin. Med.* **8**, (2019).
352. Roe, J.-S. *et al.* Enhancer Reprogramming Promotes Pancreatic Cancer Metastasis. *Cell* **170**, 875–888.e20 (2017).
353. Nikkanen, J. *et al.* Mitochondrial DNA Replication Defects Disturb Cellular dNTP Pools and Remodel One-Carbon Metabolism. *Cell Metab.* **23**, 635–648 (2016).
354. El-Hattab, A. W. & Scaglia, F. Mitochondrial DNA Depletion Syndromes: Review and Updates of Genetic Basis, Manifestations, and Therapeutic Options. *Neurotherapeutics* **10**, 186–198 (2013).
355. Nishino, I. *et al.* Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: An autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations. *Ann. Neurol.* **47**, 792–800 (2000).

356. Nishino, I., Spinazzola, A. & Hirano, M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* **283**, 689–692 (1999).
357. Song, S., Wheeler, L. J. & Mathews, C. K. Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* **278**, 43893–43896 (2003).
358. Rampazzo, C. *et al.* Mitochondrial Deoxyribonucleotides, Pool Sizes, Synthesis, and Regulation. *J. Biol. Chem.* **279**, 17019–17026 (2004).
359. Pontarin, G., Gallinaro, L., Ferraro, P., Reichard, P. & Bianchi, V. Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: Dynamic relations to cytosolic pools. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 12159–12164 (2003).
360. González-Vioque, E., Torres-Torronteras, J., Andreu, A. L. & Martí, R. Limited dCTP Availability Accounts for Mitochondrial DNA Depletion in Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet.* **7**, (2011).
361. Kühlbrandt, W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* **13**, (2015).
362. Gemble, S., Buhagiar-Labarchède, G., Onclercq-Delic, R., Jaulin, C. & Amor-Guéret, M. Cytidine deaminase deficiency impairs sister chromatid disjunction by decreasing PARP-1 activity. *Cell Cycle* **16**, 1128–1135 (2017).
363. Wong, E. D. *et al.* The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* **160**, 303–311 (2003).
364. Oughtred, R. *et al.* The BioGRID interaction database: 2019 update. *Nucleic Acids Res.* **47**, D529–D541 (2019).
365. Canivet, C. *et al.* A prospective clinical and biological database for pancreatic adenocarcinoma: the BACAP cohort. *BMC Cancer* **18**, 986 (2018).
366. Kamerkar, S. *et al.* Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* **546**, 498–503 (2017).
367. Shajari, N., Mansoori, B., Davudian, S., Mohammadi, A. & Baradaran, B. Overcoming the Challenges of siRNA Delivery: Nanoparticle Strategies. *Curr. Drug Deliv.* **14**, 36–46 (2017).

Annexe

La revue de la littérature intitulée « The emerging role of cytidine deaminase in human diseases: a new opportunity for therapy? » a été acceptée pour publication dans *Molecular Therapy*.

The emerging role of cytidine deaminase in human diseases: a new opportunity for therapy?

Audrey Frances¹, Pierre Cordelier^{1,*}.

1: Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées, Université Toulouse III Paul Sabatier, INSERM, CRCT, Toulouse, France.

*: corresponding author.

Pierre Cordelier, PhD

Cancer Research Centre of Toulouse (CRCT)

INSERM U1037

2, avenue Hubert Curien

31100 Toulouse, France

INTRODUCTION

Cytidine deaminase (CDA) is a ubiquitous enzyme, whose major role is to participate in the recycling of free pyrimidines. The pyrimidine salvage pathway appears to have two different aims: one is the recycling of pyrimidines for the synthesis of other nucleotides that will be integrated into DNA and RNA, the other is the degradation of pyrimidines to ensure a constant source of carbon and nitrogen to the cell. Interestingly, CDA has a pivotal role in both pathways. Over the past decades, cancer researchers also took interest in this enzyme for its additional role on chemoresistance. Accordingly, this review aims to gather known data on CDA, from structure to activity regulation, and the first evidence of CDA relevance to cancer treatment.

CDA GENE ORGANIZATION

CDA (EC 3.5.4.5) can also be referred to as cytidine aminohydrolase, CD or CDD and is responsible for cytidine (and deoxycytidine) transformation to uridine (and deoxyuridine), respectively. This enzyme belongs to the cytidine and deoxycytidylate deaminase family that rely on zinc-binding ¹. *CDA* gene is located on chromosome 1 (1p36.12) ^{2,3}, spans on a 29.961 base pair (bp) region but the open reading frame (divided in 4 exons) is encoded only by 441 bp ^{4,5}. *CDA* gene and protein sequences are well conserved among species. Orthologous *CDA* genes are found in many species with a high percentage of sequence homology with human *CDA* (*hCDA*). For instance *hCDA* gene is 83.79% identical to the mouse *CDA* gene, and 99.77%, 68.99% and 51.88% identical to chimpanzee, zebrafish and *Saccharomyces cerevisiae* *CDA* genes, respectively ³. The protein sequence of *hCDA* is also 39% identical to *Escherichia Coli* *CDA* protein sequence ¹.

CDA PROTEIN STRUCTURE

CDA is composed of a CMP (cytidine monophosphate) /dCMP-type deaminase domain that consists of a central β -sheet with one or more α helix on each side ⁶. This feature is shared with all APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) proteins. However, unlike its counterpart AI-CDA (for activation-induced cytidine deaminase, extensively described by R. Kumar et al. ⁷), CDA does not belong to the APOBEC family and thus, processes only free pyrimidines. The *CDA* gene codes for a 146 amino acid protein (15kDa) that associates with a zinc ion (Zn^{2+}) ⁸ and is organized into a 52kDa homotetramer to ensure its enzymatic function ^{9,10}. The enzyme isoelectric point is 4.5, and the pH range in which it is active is between 3.5 and 10.5 ¹⁰. As the crystallization of the CDA revealed a second order axis of symmetry, it is assumed that the enzyme is actually a dimer of dimers ¹¹. S. Vincenzetti et al. elucidated the roles

of different amino acids in CDA using targeted mutagenesis. They found that each monomer binds to a zinc atom in coordination with the cysteines C99 and C102 while C65 is essential to the correct orientation of zinc ion ¹². E67 has a central role in the initiation of catalysis since it is the glutamate carboxylic moiety that authorizes the deprotonation/protonation of the water molecule/amine group of the substrate respectively, which initiates the nucleophilic attack of the hydroxide on the C4 of the pyrimidic ring ¹³. The reaction intermediate is a tetrahedral interaction between the pyrimidic ring of the substrate, the hydroxyl group formed by the water molecule, the glutamate carboxylate moiety and the zinc ion (Figure 1) ¹⁴. Each catalytic site is formed by the interaction of three monomers, which explains why it needs to be tetrameric to be active ¹¹. Among others, F137, Y33 and R68 are important for interaction with the substrate since they participate in the formation of the catalytic site and Y60 in the recognition of the substrate ^{15,16}. Interestingly, all the amino acids of interest mentioned in this section are conserved in the mouse CDA protein sequence ¹⁷.

CDA FUNCTION

The molecular landmark of CDA is its deaminase function, that catalyzes the transformation of cytidines and deoxycytidines into uridines and deoxyuridines, respectively, ¹⁸ by hydrolyzing the amine moiety into ketone with ammonia release (Figure 2) ¹¹. The deamination of cytidine to uridine contributes, on the one hand, to maintaining nucleotide pool balance for DNA and RNA synthesis. On the other hand, such conversion is also necessary for the catabolism of the pyrimidine cycle, a source of carbon and nitrogen, which results in the formation of beta-alanine (Figure 2) ^{19,20}. Therefore, CDA has a complementary role within the pyrimidine salvage pathway to the *de novo* pyrimidine synthesis pathway (Figure 3). Large scale interactome studies revealed many CDA potential partners (Figure 4A, Table 1), for which gene ontology

analysis is provided (Figure 4B) ²¹. While this could lead to the discovery of new functions and new roles for this enzyme. However, none of these potential molecular interactions have been studied further.

SUBCELLULAR LOCALIZATION OF CDA

Databases describe CDA as a cytoplasmic protein ²², which is in agreement with recycling free pyrimidines from the cytoplasm. Pyrimidines are then passively transported into the nucleus or actively transported into the mitochondria by the family of adenine nucleotide carriers ANT or SLC25A19 where they are integrated into DNA or RNA ^{23,24}. It is therefore commonly accepted that CDA is present mainly in the cytoplasmic fraction of cells. However, A. Somasekaram et al. reported that CDA might also be nuclear, due to a bipartite NLS sequence (a specific nuclear localization signal composed of two clusters of basic amino acids, separated by 10 amino acids) recognized by the importin receptor ²⁵. CDA can also be found in the serum, which demonstrates release from the cell ²⁶. CDA serum activity has been monitored in several cancers and it is correlated with chemotherapy response or chemotherapy-related toxicities ^{27–30}. Moreover, CDA serum activity is measured to predict abnormal pregnancy with complications ³¹, or during acute inflammation in rheumatoid arthritis ³². Indeed, as CDA leaks out into serum when the membrane of PMN (polymorphonuclear neutrophils) is damaged ³³, one can speculate that CDA serum activity increase during may reflect higher numbers of damaged cells in tissues expressing high levels of this enzyme. However, addressing CDA activity in blood is not (yet) part of routine clinical practice.

REGULATION OF CDA EXPRESSION

CDA expression is heterogenous between tissues. CDA is most commonly expressed in bone marrow and liver, and more moderately or even undetectably in other tissues ³⁴. In

white blood cells, CDA activity is 279 nmol/h/mg protein in peripheral lymphocytes, and 2443 nmol/h/mg protein in granulocytes.³⁵ More generally, the activity of CDA is higher in mature hematopoietic cells than in immature cells³⁶. In cancer cells, *CDA* gene is not lost, nor amplified, meaning that regulation of *CDA* expression is mainly at the transcriptional level³⁷. Several binding sites to transcription factors have been described in the literature in *CDA* promoter or enhancer regions (cEBPs, SP1, AP1, Myc/Max, HFH2, Lyf1, ARP1 and GATA1^{5,38}).

As several natural mutations of the *CDA* gene are found in the population, and in particular within the promoter region³⁹, this is likely to modify transcription factors binding sites and to alter the level of transcription of *CDA*, as exemplified by R. E. Ferrell's group³⁹. More recently, M. Amor-Gueret's team showed that the level of expression of *CDA* in tumors is negatively regulated by DNA methylation of the *CDA* promoter, as epigenetic drugs increase *CDA* expression⁴⁰. S. Watanabe and T. Uchida showed that the injection of vitamin D3 induces an increase in the level of expression of *CDA* mRNA in tumors³⁴. S. S. Shord and R. P. Patel showed that the administration of paclitaxel (antineoplastic anticancer agent) induces a decrease in *CDA* mRNA level in cancer cell lines, while not having a significant effect on protein, but nonetheless resulted in *CDA* increased activity⁴¹. In another study, K. K. Frese et al. showed that albumin-conjugated paclitaxel (nab-paclitaxel) reduces *CDA* protein due to reactive oxygen species (ROS) production, and that *CDA* levels can be restored when cells are treated with N-acetylcystein (NAC, a ROS scavenger molecule)⁴². This study demonstrates at least in part why cells treated by taxol are more sensitive to gemcitabine.

CDA expression seems to be finely tuned by microRNAs, a class of short, non-coding RNAs experts in gene silencing. Along this line, Z.-M. Shao's team negatively correlated miR-484 and *CDA* expression in breast cancer cells; they found that miR-484 directly

inhibits CDA translation by targeting CDA 3' UTR, and relieves tumor cells' chemoresistance ⁴³. In another study, A. Rajabpour et al. correlated the decrease of miR-608 and the up-regulation of CDA protein in pancreatic cancer cells resisting to chemotherapy ⁴⁴. Finally, Z. Gil's team showed that tumor-associated macrophages induce CDA expression in response to treatment with gemcitabine ^{45,46}, *via* miR-365 microRNA ⁴⁷.

REGULATION OF CDA PROTEIN ACTIVITY

Many polymorphisms of the *CDA* gene have been identified in the population. The work of K. Kühn et al. ⁴⁸ and J. Laliberté and R. L. Momparler ⁴⁹, supplemented by the numerous studies of Vincenzetti et al. ⁵⁰, have highlighted the existence of two major variants of CDA mRNA that differ by codon 27 (79A>C) that alternatively gives a glutamine or a lysine. These two proteins called CDA1 and CDA2, respectively, are capable of forming the different combinations of tetramers, *i.e.* 5 enzymatic isoforms that have essentially the same physico-chemical and enzymatic properties as the amino acid is not located in the active site of the enzyme ⁵⁰. According to these authors, the only difference would be in the net charge of each monomer, giving them a different capacity for migration under electrophoresis, with CDA1 being revealed slightly lower than CDA2 on polyacrylamide gel (PAGE) ⁵⁰. These polymorphisms are found in the population with variable frequencies according to ethnicity. The CDA2 variant is the one most commonly found in the Caucasian population (65%) ⁵¹. S. Koizumi's team also highlighted another variant in codon 70 (208G>A) which consists of a threonine instead of an alanine, but found in only 4.3% of the Japanese population studied ⁵². Other studies showed that this variant appears to be mostly found in African and Asian populations ^{53,54}. The simple nucleotide substitutions (SNP) 79A>C and 208G>A have been the two most studied polymorphisms.

These works have been supplemented by numerous clinical trials aimed at demonstrating a possible correlation between the numerous variants of CDA and the activity of the enzyme. Indeed, genetic variations can affect the structure of the enzyme, albeit only a few of them have been correlated to a variation in the catalytic activity of the enzyme. In humans, serum CDA activity was measured in a cohort of 150 cancer patients, ranging from 0.6 to more than 18 U/mg, which shows a high degree of inter-individual variability²⁷.

Despite some inconclusive studies and even contradictory results on the correlation between the enzymatic activity of CDA and these SNPs, studies showed that SNP 208G>A (A70T) results in a lower activity of CDA^{30,52} while 79A>C (K27Q) mutation favors cytidine and deoxycytidine deamination^{55,56}. In addition, S. Vincenzetti's group identified an activating haplotype of CDA (-451T/-92G/-31Del/79C/435C)⁵⁷. These polymorphisms also have repercussions on drug metabolism with a 68% decrease in activity of A70T CDA mutants against Ara-C (cytarabine)⁵². The picture is less clear when it comes to K27Q mutation. One group showed that recombinant CDA27Q has a 23% to 70% decrease in activity for Ara-C⁵⁸ and a 34% decrease in activity for gemcitabine⁵⁹, while another study showed an increase in activity for Ara-C but a decrease for decitabine for the exact same mutant⁵⁶. Such discrepancies between CDA activity and SNPs presence strongly suggests that gene polymorphisms cannot fully explain inter-patient heterogeneity in serum CDA activity.

Unfortunately, data about CDA activity modulation mechanisms are rare. Along this line, database mining reveals one potential site of phosphorylation on CDA protein on Y79 residue, documented by seven different large scale studies⁶⁰. However, no functional studies were further carried out to better understand the consequences of CDA post-translational modification nor the mechanism by which CDA is phosphorylated. To date,

CDA activity regulation by the nucleotide pool remains to be documented. Although CDA products such as uridine and its derivatives, or CMP have the ability to inhibit the enzyme by competing with substrates, their affinity for CDA is very moderate and their concentration in the environment is far too low to exert significant inhibition of the enzyme ⁶¹. However, regulation of CDA expression or activity by the nucleotide pool could be further considered, as this was reported for related salvage enzymes, such as cytosine deaminase (COD) ⁶² or adenosine deaminase (ADA) which is regulated by the presence of inosine ⁶³.

CDA INHIBITORS

Current known pharmacological inhibitors of CDA are based on the same mechanism of action. The conversion of cytidine to uridine by CDA goes through a reaction intermediate resulting from the nucleophilic attack of the water/zinc complex on the C4 of the pyrimidine cycle, following which ammonia is released. By replacing the NH₃ moiety with a proton for example (as for zebularin, Figure 5), the reaction intermediate is then blocked. The molecule therefore behaves as a powerful competitive inhibitor of the enzyme. Although other CDA inhibitors such as 3,4,5,5,6-tetrahydrouridine (THU) or 1,3-diazepinone riboside (DR) bear more distant structures (Figure 5), their mechanism of action is also based on blocking the enzyme in an unresolved reaction intermediate state. S. Vincenzetti's group conducted a screening of CDA inhibitors, that were sorted by inhibitory constants (K_i), with best candidates (THU, zebularin and its fluorinated derivative) with K_i less than or equal to the *Michaelis* constant (K_m) of CDA for cytidine (*i.e.* <3.9) ⁶¹. In greater details, THU was first identified and purified in 1967 following affinity capture with CDA as a bait ⁶⁴, and studied by R. Cohen and R. Wolfenden in 1971 in *Escherichia coli* to understand its mechanism of action and pharmacokinetics profile ⁶⁵. THU mechanism of action is based on its C4 hydroxyl moiety in the pyrimidic ring

which binds to zinc instead of the water molecule ⁶⁶. However, Y. Manome's team recently put at stakes the specificity of THU for CDA, as they showed that THU is cytostatic regardless of CDA expression in target cells, strongly suggesting a mechanism of action distinct from CDA inhibition, as THU can impact cell cycle distribution by inhibiting E2F1 transcription factor ⁶⁷. Since the bioavailability of THU is weak (~20% ⁶⁸), T. Tsukamoto's team synthesized new fluorinated versions of the drug, (namely (4R)-2'-Deoxy-2',2'-difluoro-3,4,5,6-tetrahydrouridine), with better oral bioavailability. The IC₅₀ of this new compound is comparable to that of THU (0.4μM versus 0.34μM for THU), and has a better pharmacokinetic profile for CDA inhibition due to its stability ⁶⁹. This team therefore suggests using this compound as an oral complement should improve Ara-C efficacy, yet no clinical trial has been registered to date.

The CDA inhibitor Zebularin was first described by J.S. Driscoll's group in 1980 ⁷⁰. Zebularin blocks CDA in a tetrahedral intermediate thanks to its proton in C4 ¹⁴. The efficacy of this drug was also studied in *Escherichia coli* to understand its precise mechanism of action and the reaction kinetics ⁷¹. However, zebularine is far from being specific to CDA only, as this drug interacts with cytosine-[C5]-DNA methyltransferases (C5 MTases), to regulate DNA methylation on a large scale ⁷². Diazepinone riboside (DR) was discovered in 1981 ⁷³, but its mechanism of action was only elucidated much later. Due to its structure, DR cannot interact with CDA through coordination with the water/zinc complex. Consequently, its mechanism of action is therefore slightly different from the first two above mentioned inhibitors. S. J. Chung et al. demonstrated that DR inhibitory activity on CDA rather results from the electrostatic interaction (π - π type) between the double bond of the DR ring and the aromatic ring of the amino acid Phe137 of the catalytic site of the enzyme ¹¹. However, to date, DR has never been tested in cell

cultures. Several groups recently investigated for more stable inhibitors of CDA, such as pseudoisocytidine ⁶¹, often at the expense of specificity or inhibitory potential.

ROLE OF CDA IN PHYSIOLOGY AND PHYSIOPATHOLOGY

Animal models for CDA knockout are still cruelly lacking, meaning that the role of CDA during development is unknown to date. Historically, CDA deficiency has been long associated with Bloom's syndrome ⁷⁴, due to the pioneering work of Pr M. Amor-Guérêt. Bloom syndrome is a rare autosomal disease caused by mutation of the Bloom (*BLM*) gene on both alleles that results in high genetic instability ⁷⁵. *BLM* encodes for a DNA helicase, which main function is to maintain genomic integrity ⁷⁶. *BLM* is relocated to DNA breaks in a complex that also contains RAD51, which reports DNA damages and thus contributes to their management by repair mechanisms. Generally, mutations found in *BLM* are deletions or base insertions that result in decreased gene transcription or termination of translation due to a nonsense mutation of mRNA ⁷⁶. Therefore, defect or alteration of this protein induces a malfunction of the homologous recombinant repair system. Spontaneous mutations of somatic cells are thus much more frequent than in WT *BLM* genetic background. A systematic feature of genetic instability associated with Bloom syndrome is the presence of segment exchanges between sister chromatids of a chromosome, which has long been a method of diagnosing this disease, now confirmed by sequencing ⁷⁷. As a result, patients with this condition develop congestive redness of the skin, called telangiectatic erythema, as well as growth retardation and other malformations ⁷⁸. These patients are also more predisposed to cancer, in particular hematologic cancers and carcinomas of diverse organs, which considerably reduces their life expectancy ⁷⁴. Pr Amor-Guérêt's group nicely showed that loss of CDA expression is concomitant to *BLM* mutation. They found that CDA has an important role in maintaining the nucleotide pool, to prevent from replicative stress that is harmful to the

cell ⁷⁹. Among the many chromatid segregation defects, chromatin bridge formation (consequences of poor sister chromatid segregation) is directly due to the absence of BLM, while the presence of ultra-fine bridges (UFB) (which follow incomplete DNA replication when cells enter mitosis) results from an imbalance in the pyrimidine pool due to CDA deregulation ⁸⁰. The mechanism explaining this phenomenon is the accumulation of dCTP due to the absence of CDA, which induces a decrease in the activity of PARP-1, a protein involved in the response to DNA damage ⁸⁰. C.P. Witte's team supplemented this hypothesis by showing that the accumulation of intermediate species of pyrimidine catabolism due to CDA invalidation is toxic ¹⁹.

As stated before, a significant functional aspect of CDA is the ability to deaminate synthetic or natural cytidine analogues. This is the reason why numerous studies have been focusing on CDA expression as a marker of cancer chemoresistance since the 1960s, with the emergence of the first anti-metabolites anticancer analogs of cytidine and deoxycytidine such as cytarabine (or Ara-C) ⁸¹. Indeed, CDA is recognized as a key chemo-resistance factor to cytidine and deoxycytidine analogues such as Ara-C, Gemcitabine (dFdC), or Decitabine (5-Aza-dC) ⁸² *in vitro* (Figure 5), since it catalyzes their transformation into inactive metabolites ^{81,83}. Indeed, CDA proceeds synthetic metabolites and natural substrates with similar affinities ($K_m=11\mu\text{M}$ for Ara-C, $K_m=3.9\mu\text{M}$ for cytidine) ^{61,84}. In mice, CDA largely participate in gemcitabine inactivation and clearance ²⁷. In humans, 80% of intravenous Ara-C bolus is eliminated in the urine, 90% of which in its uracil form, thus strongly suggesting direct and active “detoxification” by CDA ⁸⁵. Further, a study conducted on 40 patients with pancreatic cancers treated with gemcitabine correlated high activity of CDA ($>6\text{ U/mg}$) with progressive disease and concluded that patient with high CDA activity are five times more likely to progress following gemcitabine-based therapy ⁸⁶. Very recently, commensal

CDA was identified as a key player of chemoresistance originating from the tumor microbiome. L. T Geller et al. identified that 76% of patients with pancreatic cancer are positive for γ proteobacteria, which possesses an orthologous CDA capable of deaminating gemcitabine and so to participate in resistance to treatment ⁸⁷. Quite the contrary, capecitabine, a synthetic deoxycytidine analogue, has to be deaminated to be active. Enforced CDA expression consequently improves capecitabine chemotherapy efficacy, *in vitro* ⁸⁸.

Therefore, CDA has an important therapeutic role since its modulation would make it possible to defeat the chemoresistance of some cancers. On the other hand, CDA levels may also predict toxicities associated with chemotherapies; indeed, patients with lower CDA activity than normal treated with chemotherapy (Gemcitabine or Ara-C) have serious side effects due to exacerbated toxicity of the treatment ^{27,89,90}. Along the same line, J. Ciccolini et al. showed that CDA-deficient patients (*i.e* with a CDA activity <1.3 U/mg) develop serious adverse effects (grade 3-4) when treated with Gemcitabine ²⁷. Thus, CDA may have a role in genetic diseases and in response to treatment in cancer patients. CDA might be an appealing molecular target, particularly in patients treated with chemotherapy.

THERAPEUTIC STRATEGIES BASED ON CDA EXPRESSION

Given the high heterogeneity of expression of CDA, different therapeutic strategies can be considered depending on the pathological context. Most cancers under-express CDA compared to healthy tissues ^{91,40}. Prof. Amor-Gueret's team focused on breast tumors that poorly express CDA due to DNA methylation. They showed that tumors with low CDA expression are more sensitive to aminoflavone derivative AFP464 ⁴⁰. Tissues that express higher levels of CDA are, on the other hand, resistant to these drugs, which would place

CDA as a predictive biological marker of response. High-CDA expressing tumors should be in theory more resistant to cytidine-based therapies. In line with this assumption, several studies combining various chemotherapy and CDA inhibitors have been conducted so far ^{68,92–95}. However, only few clinical trials resulted from these studies. Phase I clinical trials studied the effects of 5-fluoro-2'-deoxycytidine with THU (NCT00359606, NCT01041443, available at ClinicalTrial.gov) and two Phase II clinical trials were completed recently combining 5-fluoro-2'-deoxycytidine with THU and another combining THU and decitabine with nivolumab (NCT00978250, NCT02664181, available on ClinicalTrials.gov) but none of them shared the results yet. Another interesting hypothesis made by Z. Gil's group could be to target macrophages in order to reduce CDA levels and thus chemo-sensitize the tumor to gemcitabine ⁴⁵. M. Zauri's group recently performed an elegant study, focusing on tissues that express high levels of CDA, including pancreatic cancer, in which CDA appears to be expressed mainly in epithelial tumor cells and not in the stroma ⁹⁶. They took advantage of CDA-overexpression to metabolize synthetic deoxycytidine analogues to be inserted into DNA ⁹¹. In greater details, overexpression of CDA provokes the deamination of deoxycytidine analogues 2'-Deoxy-5-(hydroxymethyl)cytidine (5hmdC) and 5-formyl-2'deoxycytidine (5fdC) into 5hmdU and 5fdU respectively, which are then phosphorylated and incorporated into DNA, triggering cell cycle arrest and cell death ⁹¹, due to activation of surveillance factors such as uracil glycosylase, which causes multiple DNA breaks ⁹⁷. In normal cells, these nucleotides are not integrated into DNA due to the presence of cytidine monophosphate kinase 1 (CMPK1), involved in nucleoside recycling and metabolism pathways, that acts as barrier to protect the genome. These observations clearly provide a therapeutic opportunity to treat cancers that overexpress CDA.

Another interesting issue is that CDA, through induction of chemoresistance, also protects tissues from the toxic effect of such intravenous drugs throughout the body, as severe toxicity is observed in rapidly proliferating tissues with low levels of CDA ^{27,89,90}. A therapeutic strategy developed by T. Moritz consists in overexpressing CDA in these tissues using gene transfer, to protect them from side effects ^{98,99}. This group demonstrated the interest of such an approach in acute leukaemia treated with Ara-C post-transplantation to protect the healthy marrow.

Lastly, stepping back from cancer management, CDA can also be also considered as a target *per se*. Indeed, CDA, as well as other enzymes from the pyrimidine salvage pathway, may represent interesting targets for killing pathogens such as trypanosomiasis (flagellated protozoa causing, for example, sleeping sickness or leishmaniasis) that do not produce some enzymes in the *de novo* pathway and are therefore dependent on CDA for their nucleotide synthesis ¹⁰⁰.

CONCLUSION

CDA is historically known to be involved in the salvage of pyrimidines by recycling free cytidines and deoxycytidines into uridines and deoxyuridines, respectively, for DNA and RNA synthesis. This enzyme is well conserved among species, highlighting the importance of this pathway during evolution. In Bloom syndrome, CDA defects induces replicative stress. In cancer, CDA detoxifies cytidine and deoxycytidine analogue-based therapies such as gemcitabine and Ara-C and can be considered as a key player in tumor resistance to treatment. Taking advantage or modulating CDA activity in patients is at reach of hand and might constitute a promising strategy in cancer therapy. On the other, CDA can be heterogeneously expressed in tumors, regardless of chemotherapeutic

treatment. This advocates for a better understanding of the molecular mechanisms involved in CDA regulation of expression, but also suggest a new and undiscovered role of CDA in oncogenesis. Thus, better understanding the role and function of CDA may not only help overcome chemo-resistance and improve the management of patients with cancer, notably pancreatic cancer, and may also reveal the unforeseen role of CDA during carcinogenesis to help develop new therapeutic strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is supported by grants from *Fondation Toulouse Cancer Santé* and by *Fondation d'Entreprise TOTAL* (Grant # 2016CS051)

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.F. and P.C. conducted the bibliographic search and wrote the paper.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to disclose.

REFERENCES

1. Reizer, J, Buskirk, S, Bairoch, A, Reizer, A and Saier, MH (1994). A novel zinc-binding motif found in two ubiquitous deaminase families. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **3**: 853–856.
2. Saccone, S, Besati, C, Andreozzi, L, Della Valle, G, Garattini, E and Terao, M (1994). Assignment of the human cytidine deaminase (CDA) gene to chromosome 1 band p35-p36.2. *Genomics* **22**: 661–662.
3. Stelzer, G, Rosen, N, Plaschkes, I, Zimmerman, S, Twik, M, Fishilevich, S, *et al.* (2016). The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **54**: 1.30.1-1.30.33.
4. CDA (Cytidine Deaminase)at <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_CDA.html>.
5. Demontis, S, Terao, M, Brivio, M, Zannota, S, Bruschi, M and Garattini, E (1998). Isolation and characterization of the gene coding for human cytidine deaminase. *Biochim. Biophys. Acta* **1443**: 323–333.
6. Johansson, E, Mejlhede, N, Neuhard, J and Larsen, S (2002). Crystal Structure of the Tetrameric Cytidine Deaminase from *Bacillus subtilis* at 2.0 Å Resolution,. *Biochemistry* **41**: 2563–2570.
7. Kumar, R, DiMenna, LJ, Chaudhuri, J and Evans, T (2014). Biological function of activation-induced cytidine deaminase (AID). *Biomed. J.* **37**: 269–283.
8. Vincenzetti, S, Cambi, A, Neuhard, J, Garattini, E and Vita, A (1996). Recombinant human cytidine deaminase: expression, purification, and characterization. *Protein Expr. Purif.* **8**: 247–253.
9. Vincenzetti, S, Cambi, A, Maury, G, Bertorelle, F, Gaubert, G, Neuhard, J, *et al.* (2000). Possible role of two phenylalanine residues in the active site of human cytidine deaminase. *Protein Eng.* **13**: 791–799.
10. Cacciamani, T, Vita, A, Cristalli, G, Vincenzetti, S, Natalini, P, Ruggieri, S, *et al.* (1991). Purification of human cytidine deaminase: Molecular and enzymatic characterization and inhibition by synthetic pyrimidine analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **290**: 285–292.
11. Chung, SJ, Fromme, JC and Verdine, GL (2005). Structure of human cytidine deaminase bound to a potent inhibitor. *J. Med. Chem.* **48**: 658–660.
12. Cambi, A, Vincenzetti, S, Neuhard, J, Costanzi, S, Natalini, P and Vita, A (1998). Identification of four amino acid residues essential for catalysis in human cytidine deaminase by site-directed mutagenesis and chemical modifications. *Protein Eng.* **11**: 59–63.
13. Costanzi, S, Vincenzetti, S, Vita, A, Lambertucci, C, Taffi, S, Volpini, R, *et al.* (2003). Human cytidine deaminase: understanding the catalytic mechanism. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **22**: 1539–1543.
14. Betts, L, Xiang, S, Short, SA, Wolfenden, R and Carter, CW (1994). Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex. *J. Mol. Biol.* **235**: 635–656.
15. Vincenzetti, S, Quadrini, B, Mariani, P, De Sanctis, G, Cammertoni, N, Polzonetti, V, *et al.* (2008). Modulation of human cytidine deaminase by specific aminoacids involved in the intersubunit interactions. *Proteins* **70**: 144–156.
16. Vincenzetti, S, Pucciarelli, S, Carpi, FM, Micozzi, D, Polzonetti, V, Natalini, P, *et al.* (2013). Site directed mutagenesis as a tool to understand the catalytic mechanism of human cytidine deaminase. *Protein Pept. Lett.* **20**: 538–549.
17. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* **47**: D506–D515.
18. Nygaard, P (1986). On the role of cytidine deaminase in cellular metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **195 Pt B**: 415–420.

19. Chen, M, Herde, M and Witte, C-P (2016). Of the Nine Cytidine Deaminase-Like Genes in Arabidopsis, Eight Are Pseudogenes and Only One Is Required to Maintain Pyrimidine Homeostasis in Vivo. *Plant Physiol.* **171**: 799–809.
20. Pyrimidine Biosynthesis and Catabolism. *BrainKartat* <https://www.brainkart.com/article/Pyrimidine-Biosynthesis-and-Catabolism_27712/>.
21. Oughtred, R, Stark, C, Breitkreutz, B-J, Rust, J, Boucher, L, Chang, C, *et al.* (2019). The BioGRID interaction database: 2019 update. *Nucleic Acids Res.* **47**: D529–D541.
22. Binder, JX, Pletscher-Frankild, S, Tsafou, K, Stolte, C, O'Donoghue, SI, Schneider, R, *et al.* (2014). COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence. *Database J. Biol. Databases Curation* **2014**: bau012.
23. Alexander, SP, Christopoulos, A, Davenport, AP, Kelly, E, Marrion, NV, Peters, JA, *et al.* (2017). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* **174 Suppl 1**: S17–S129.
24. Mitochondrial nucleotide transporter subfamily | Transporters | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGYat <<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=206>>.
25. Somasekaram, A, Jarmuz, A, How, A, Scott, J and Navaratnam, N (1999). Intracellular localization of human cytidine deaminase. Identification of a functional nuclear localization signal. *J. Biol. Chem.* **274**: 28405–28412.
26. Chalmers, IM, Thomson, GT and Desjardins, P (1988). Serum cytidine deaminase as a laboratory test for acute inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **47**: 173–174.
27. Ciccolini, J, Dahan, L, André, N, Evrard, A, Duluc, M, Blesius, A, *et al.* (2010). Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**: 160–165.
28. DeAngelis, LM, Kreis, W, Chan, K, Dantis, E and Akerman, S (1992). Pharmacokinetics of ara-C and ara-U in plasma and CSF after high-dose administration of cytosine arabinoside. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **29**: 173–177.
29. Peters, GJ, Honeywell, RJ, Maulandi, M, Giovannetti, E, Losekoot, N, Etienne-Grimaldi, M-C, *et al.* (2014). Selection of the best blood compartment to measure cytidine deaminase activity to stratify for optimal gemcitabine or cytarabine treatment. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **33**: 403–412.
30. Sugiyama, E, Kaniwa, N, Kim, S-R, Hasegawa, R, Saito, Y, Ueno, H, *et al.* (2010). Population pharmacokinetics of gemcitabine and its metabolite in Japanese cancer patients: impact of genetic polymorphisms. *Clin. Pharmacokinet.* **49**: 549–558.
31. Jones, DD, Bahijri, S, Roberts, EL and Williams, GF (1982). Activity of serum cytidine deaminase during pregnancy. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **89**: 314–317.
32. Thompson, PW, Jones, DD and Currey, HL (1986). Cytidine deaminase activity as a measure of acute inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **45**: 9–14.
33. Taysi, S, Polat, MF, Sari, RA and Bakan, E (2005). Serum Adenosine Deaminase and Cytidine Deaminase Activities in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40**: 493–495.
34. Watanabe, S and Uchida, T (1996). Expression of cytidine deaminase in human solid tumors and its regulation by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochim. Biophys. Acta* **1312**: 99–104.
35. Mejer, J and Nygaard, P (1979). Adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase levels in acute myeloblastic leukemia cells. Relationship to diagnosis and clinical course. *Leuk. Res.* **3**: 211–216.

36. (1986). Purine and pyrimidine metabolism in man V. Part B: Basic science aspects. Festschrift for J.E. Seegmiller. *Adv. Exp. Med. Biol.* **195 Pt B**: 1–701.
37. Schröder, JK, Kirch, C, Seeber, S and Schütte, J (1998). Structural and functional analysis of the cytidine deaminase gene in patients with acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **103**: 1096–1103.
38. Ge, Y, Jensen, TL, Stout, ML, Flatley, RM, Grohar, PJ, Ravindranath, Y, *et al.* (2004). The role of cytidine deaminase and GATA1 mutations in the increased cytosine arabinoside sensitivity of Down syndrome myeloblasts and leukemia cell lines. *Cancer Res.* **64**: 728–735.
39. Fitzgerald, SM, Goyal, RK, Osborne, WRA, Roy, JD, Wilson, JW and Ferrell, RE (2006). Identification of functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the cytidine deaminase promoter. *Hum. Genet.* **119**: 276–283.
40. Mameri, H, Bièche, I, Meseure, D, Marangoni, E, Buhagiar-Labarchède, G, Nicolas, A, *et al.* (2017). Cytidine Deaminase Deficiency Reveals New Therapeutic Opportunities against Cancer. *Clin. Cancer Res.* **23**: 2116–2126.
41. Shord, SS and Patel, SR (2009). Paclitaxel alters the expression and specific activity of deoxycytidine kinase and cytidine deaminase in non-small cell lung cancer cell lines. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **28**: 76.
42. Frese, KK, Neesse, A, Cook, N, Bapiro, TE, Lolkema, MP, Jodrell, DI, *et al.* (2012). nab-paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Discov.* **2**: 260–269.
43. Ye, F-G, Song, C-G, Cao, Z-G, Xia, C, Chen, D-N, Chen, L, *et al.* (2015). Cytidine Deaminase Axis Modulated by miR-484 Differentially Regulates Cell Proliferation and Chemoresistance in Breast Cancer. *Cancer Res.* **75**: 1504–1515.
44. Rajabpour, A, Afgar, A, Mahmoodzadeh, H, Radfar, J-E-D, Rajaei, F and Teimoori-Toolabi, L (2017). MiR-608 regulating the expression of ribonucleotide reductase M1 and cytidine deaminase is repressed through induced gemcitabine chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **80**: 765–775.
45. Amit, M and Gil, Z (2013). Macrophages increase the resistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine by upregulating cytidine deaminase. *Oncoimmunology* **2**: e27231.
46. Weizman, N, Krelin, Y, Shabtay-Orbach, A, Amit, M, Binenbaum, Y, Wong, RJ, *et al.* (2014). Macrophages mediate gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma by upregulating cytidine deaminase. *Oncogene* **33**: 3812–3819.
47. Binenbaum, Y, Fridman, E, Yaari, Z, Milman, N, Schroeder, A, Ben David, G, *et al.* (2018). Transfer of miRNA in Macrophage-Derived Exosomes Induces Drug Resistance in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **78**: 5287–5299.
48. Kühn, K, Bertling, WM and Emmrich, F (1993). Cloning of a functional cDNA for human cytidine deaminase (CDD) and its use as a marker of monocyte/macrophage differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**: 1–7.
49. Laliberté, J and Momparler, RL (1994). Human cytidine deaminase: purification of enzyme, cloning, and expression of its complementary DNA. *Cancer Res.* **54**: 5401–5407.
50. Vincenzetti, S, Mariani, PL, Cammertoni, N, Polzonetti, V, Natalini, P, Quadrini, B, *et al.* (2004). Isoenzymatic forms of human cytidine deaminase. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* **17**: 871–877.
51. Serdjebi, C, Milano, G and Ciccolini, J (2015). Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **11**: 665–672.
52. Yue, L, Saikawa, Y, Ota, K, Tanaka, M, Nishimura, R, Uehara, T, *et al.* (2003). A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity. *Pharmacogenetics* **13**: 29–38.

53. Sugiyama, E, Lee, S-J, Lee, SS, Kim, W-Y, Kim, S-R, Tohkin, M, *et al.* (2009). Ethnic Differences of two Non-synonymous Single Nucleotide Polymorphisms in CDA Gene. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **24**: 553–556.
54. Fukunaga, AK, Marsh, S, Murry, DJ, Hurley, TD and McLeod, HL (2004). Identification and analysis of single-nucleotide polymorphisms in the gemcitabine pharmacologic pathway. *Pharmacogenomics J.* **4**: 307–314.
55. Giovannetti, E, Laan, AC, Vasile, E, Tibaldi, C, Nannizzi, S, Ricciardi, S, *et al.* (2008). Correlation between cytidine deaminase genotype and gemcitabine deamination in blood samples. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **27**: 720–725.
56. Micozzi, D, Carpi, FM, Pucciarelli, S, Polzonetti, V, Polidori, P, Vilar, S, *et al.* (2014). Human cytidine deaminase: a biochemical characterization of its naturally occurring variants. *Int. J. Biol. Macromol.* **63**: 64–74.
57. Carpi, FM, Vincenzetti, S, Ubaldi, J, Pucciarelli, S, Polzonetti, V, Micozzi, D, *et al.* (2013). CDA gene polymorphisms and enzyme activity: genotype-phenotype relationship in an Italian-Caucasian population. *Pharmacogenomics* **14**: 769–781.
58. Kirch, HC, Schröder, J, Hoppe, H, Esche, H, Seeber, S and Schütte, J (1998). Recombinant gene products of two natural variants of the human cytidine deaminase gene confer different deamination rates of cytarabine in vitro. *Exp. Hematol.* **26**: 421–425.
59. Gilbert, JA, Salavaggione, OE, Ji, Y, Pelleymounter, LL, Eckloff, BW, Wieben, ED, *et al.* (2006). Gemcitabine Pharmacogenomics: Cytidine Deaminase and Deoxycytidylate Deaminase Gene Resequencing and Functional Genomics. *Clin. Cancer Res.* **12**: 1794–1803.
60. Hornbeck, PV, Zhang, B, Murray, B, Kornhauser, JM, Latham, V and Skrzypek, E (2015). PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* **43**: D512–D520.
61. Costanzi, S, Vilar, S, Micozzi, D, Carpi, FM, Ferino, G, Vita, A, *et al.* (2011). Delineation of the molecular mechanisms of nucleoside recognition by cytidine deaminase through virtual screening. *ChemMedChem* **6**: 1452–1458.
62. West, TP and O'Donovan, GA (1982). Repression of cytosine deaminase by pyrimidines in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **149**: 1171.
63. Tozzi, MG, Sgarrella, F and Ipata, PL (1981). Induction and repression of enzymes involved in exogenous purine compound utilization in *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **678**: 460–466.
64. Hanze, AR (1967). Nucleic acids. IV. The catalytic reduction of pyrimidine nucleosides (human liver deaminase inhibitors). *J. Am. Chem. Soc.* **89**: 6720–6725.
65. Cohen, RM and Wolfenden, R (1971). Cytidine Deaminase from *Escherichia coli* PURIFICATION, PROPERTIES, AND INHIBITION BY THE POTENTIAL TRANSITION STATE ANALOG 3,4,5,6-TETRAHYDROURIDINE. *J. Biol. Chem.* **246**: 7561–7565.
66. Teh, A-H, Kimura, M, Yamamoto, M, Tanaka, N, Yamaguchi, I and Kumasaka, T (2006). The 1.48 Å Resolution Crystal Structure of the Homotetrameric Cytidine Deaminase from Mouse. *Biochemistry* **45**: 7825–7833.
67. Funamizu, N, Lacy, CR, Fujita, K, Furukawa, K, Misawa, T, Yanaga, K, *et al.* (2012). Tetrahydrouridine Inhibits Cell Proliferation through Cell Cycle Regulation Regardless of Cytidine Deaminase Expression Levels. *PLoS ONE* **7**.
68. Beumer, JH, Eiseman, JL, Gilbert, JA, Holleran, JL, Yellow-Duke, AE, Clausen, DM, *et al.* (2011). Plasma pharmacokinetics and oral bioavailability of the 3,4,5,6-tetrahydrouridine (THU) prodrug, triacetyl-THU (taTHU), in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **67**: 421–430.

69. Ferraris, D, Duvall, B, Delahanty, G, Mistry, B, Alt, J, Rojas, C, *et al.* (2014). Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Fluorinated Tetrahydrouridine Derivatives as Inhibitors of Cytidine Deaminase. *J. Med. Chem.* **57**: 2582–2588.
70. McCormack, JJ, Marquez, VE, Liu, PS, Vistica, DT and Driscoll, JS (1980). Inhibition of cytidine deaminase by 2-oxopyrimidine riboside and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **29**: 830–832.
71. Schroeder, GK, Zhou, L, Snider, MJ, Chen, X and Wolfenden, R (2012). Flight of a Cytidine Deaminase Complex with an Imperfect Transition State Analogue Inhibitor: Mass Spectrometric Evidence for the Presence of a Trapped Water Molecule. *Biochemistry* **51**: 6476–6486.
72. Zhou, L, Cheng, X, Connolly, BA, Dickman, MJ, Hurd, PJ and Hornby, DP (2002). Zebularine: A Novel DNA Methylation Inhibitor that Forms a Covalent Complex with DNA Methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **321**: 591–599.
73. Liu, PS, Marquez, VE, Driscoll, JS, Fuller, RW and McCormack, JJ (1981). Cyclic urea nucleosides. Cytidine deaminase activity as a function of aglycon ring size. *J. Med. Chem.* **24**: 662–666.
74. German, J (1997). Bloom's syndrome. XX. The first 100 cancers. *Cancer Genet. Cytogenet.* **93**: 100–106.
75. Bloom, D (1954). Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs; probably a syndrome entity. *AMA Am. J. Dis. Child.* **88**: 754–758.
76. Chu, WK and Hickson, ID (2009). RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. *Nat. Rev. Cancer* **9**: 644–654.
77. Amor-Gu  ret, M, Dubois-d'Enghien, C, Laug  , A, Onclercq-Delic, R, Barakat, A, Chadli, E, *et al.* (2008). Three new BLM gene mutations associated with Bloom syndrome. *Genet. Test.* **12**: 257–261.
78. German, J (1993). Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)* **72**: 393–406.
79. Gemble, S, Buhagiar-Labarchède, G, Onclercq-Delic, R, Biard, D, Lambert, S and Amor-Gu  ret, M (2016). A balanced pyrimidine pool is required for optimal Chk1 activation to prevent ultrafine anaphase bridge formation. *J Cell Sci* **129**: 3167–3177.
80. Gemble, S, Ahuja, A, Buhagiar-Labarchède, G, Onclercq-Delic, R, Dairou, J, Biard, DSF, *et al.* (2015). Pyrimidine Pool Disequilibrium Induced by a Cytidine Deaminase Deficiency Inhibits PARP-1 Activity, Leading to the Under Replication of DNA. *PLoS Genet.* **11**.
81. Camiener, GW and Smith, CG (1965). Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside—I: Enzyme distribution and species specificity. *Biochem. Pharmacol.* **14**: 1405–1416.
82. Neff, T and Blau, CA (1996). Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp. Hematol.* **24**: 1340–1346.
83. Ebrahim, Q, Mahfouz, R, Ng, KP and Sauntharajah, Y (2012). High cytidine deaminase expression in the liver provides sanctuary for cancer cells from decitabine treatment effects. *Oncotarget* **3**: 1137–1145.
84. Abbruzzese, JL, Grunewald, R, Weeks, EA, Gravel, D, Adams, T, Nowak, B, *et al.* (1991). A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **9**: 491–498.
85. Crooke, ST and Prestayko, AW (2013). *Antineoplastic Agents*, Elsevier, 415pp.
86. Serdjebi, C, Seitz, J-F, Ciccolini, J, Duluc, M, Norguet, E, Fina, F, *et al.* (2013). Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen. *Pharmacogenomics* **14**: 1047–1051.

87. Geller, LT, Barzily-Rokni, M, Danino, T, Jonas, OH, Shental, N, Nejman, D, *et al.* (2017). Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science* **357**: 1156–1160.
88. Morita, T, Matsuzaki, A, Kurokawa, S and Tokue, A (2003). Forced Expression of Cytidine Deaminase Confers Sensitivity to Capecitabine. *Oncology* **65**: 267–274.
89. Mercier, C, Raynal, C, Dahan, L, Ortiz, A, Evrard, A, Dupuis, C, *et al.* (2007). Toxic death case in a patient undergoing gemcitabine-based chemotherapy in relation with cytidine deaminase downregulation. *Pharmacogenet. Genomics* **17**: 841–844.
90. Serdjebi, C, Gagnière, J, Desramé, J, Fein, F, Guimbaud, R, François, E, *et al.* (2015). FFCD-1004 Clinical Trial: Impact of Cytidine Deaminase Activity on Clinical Outcome in Gemcitabine-Monotherapy Treated Patients. *PLoS ONE* **10**.
91. Zauri, M, Berridge, G, Thézénas, M-L, Pugh, KM, Goldin, R, Kessler, BM, *et al.* (2015). CDA directs metabolism of epigenetic nucleosides revealing a therapeutic window in cancer. *Nature* **524**: 114–118.
92. Guo, D, Myrdal, PB, Karlage, KL, O'Connell, SP, Wissinger, TJ, Tabibi, SE, *et al.* (2010). Stability of 5-fluoro-2'-deoxycytidine and tetrahydrouridine in combination. *AAPS PharmSciTech* **11**: 247–252.
93. Laliberté, J, Marquez, VE and Momparler, RL (1992). Potent inhibitors for the deamination of cytosine arabinoside and 5-aza-2'-deoxycytidine by human cytidine deaminase. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **30**: 7–11.
94. Lemaire, M, Momparler, LF, Raynal, NJ-M, Bernstein, ML and Momparler, RL (2009). Inhibition of cytidine deaminase by zebularine enhances the antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **63**: 411–416.
95. Wong, PP, Currie, VE, Mackey, RW, Krakoff, IH, Tan, CT, Burchenal, JH, *et al.* (1979). Phase I evaluation of tetrahydrouridine combined with cytosine arabinoside. *Cancer Treat. Rep.* **63**: 1245–1249.
96. Hessmann, E, Patzak, MS, Klein, L, Chen, N, Kari, V, Ramu, I, *et al.* (2018). Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. *Gut* **67**: 497–507.
97. Boorstein, RJ, Chiu, LN and Teebor, GW (1992). A mammalian cell line deficient in activity of the DNA repair enzyme 5-hydroxymethyluracil-DNA glycosylase is resistant to the toxic effects of the thymidine analog 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5536–5540.
98. Lachmann, N, Brenig, S, Pfaff, N, Schermeier, H, Dahlmann, J, Phaltane, R, *et al.* (2013). Efficient *in vivo* regulation of cytidine deaminase expression in the haematopoietic system using a doxycycline-inducible lentiviral vector system. *Gene Ther.* **20**: 298–307.
99. Lachmann, N, Brenig, S, Phaltane, R, Flasshove, M, Dilloo, D and Moritz, T (2013). Myeloprotection by Cytidine Deaminase Gene Transfer in Antileukemic Therapy. *Neoplasia N. Y. N* **15**: 239–248.
100. Leija, C, Rijo-Ferreira, F, Kinch, LN, Grishin, NV, Nischan, N, Kohler, JJ, *et al.* (2016). Pyrimidine Salvage Enzymes Are Essential for De Novo Biosynthesis of Deoxypyrimidine Nucleotides in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* **12**.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Tetrahedral reaction intermediate of cytidine following deamination to uridine by cytidine deaminase.

Figure 2 : Cytidine deaminase reaction equation from cytidine to uridine and catabolism of uridine to β -alanine.

Figure 3 : *de novo* pyrimidine synthesis, pyrimidine salvage pathways and metabolism of pyrimidine nucleosides to nucleotides.

Figure 4A: Theoretical interactome network of CDA using BioGRID (www.thebiogrid.org). Physical edges are shown in yellow.

Figure 4B: Gene ontology analysis of CDA potential partners. Pie charts were generated with PANTHER14.1 from the 2018_04 release.

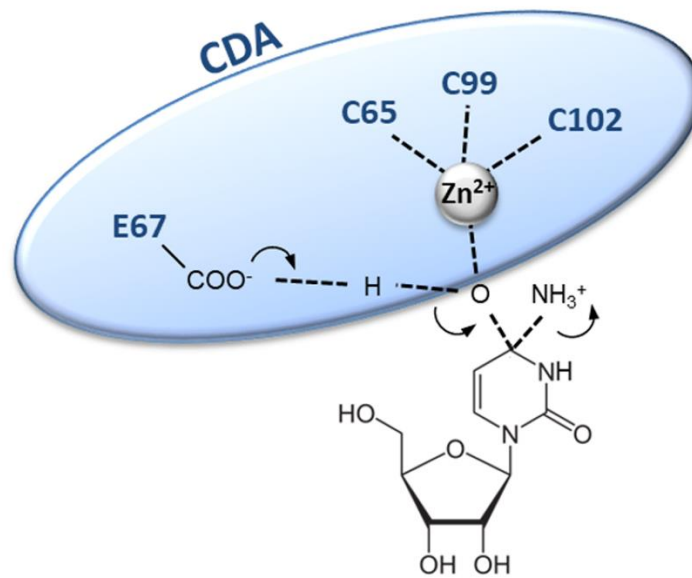
Figure 5: Schematic representation of the natural substrates, substrates analogues used as chemotherapies and inhibitors of CDA.

TABLES

Acronym	Full name
AAR2	AAR2 splicing factor homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
APBA3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 3
C20ORF195	chromosome 20 open reading frame 195
CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
CLIC4	chloride intracellular channel 4
CPNE1	copine I
CPNE3	copine III
DPH2	DPH2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
DPYSL2	dihydropyrimidinase-like 2
EVPL	envoplakin
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
GBE1	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1
LIN7A	lin-7 homolog A (<i>C. elegans</i>)
LNK1	ligand of numb-protein X 1, E3 ubiquitin protein ligase
LYPLA1	lysophospholipase I
MCM2	minichromosome maintenance complex component 2
MPP2	membrane protein, palmitoylated 2 (MAGUK p55 subfamily member 2)
MPP6	membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily member 6)
MTMR6	myotubularin related protein 6
MTMR9	myotubularin related protein 9
PFKP	phosphofructokinase, platelet
PLEKHB2	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 2
PSMA1	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1
PTGER3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)
RC3H1	ring finger and CCH-type domains 1
RNF181	ring finger protein 181
SDCBP	syndecan binding protein (syntenin)
SH3KBP1	SH3-domain kinase binding protein 1
TIMM8A	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A (yeast)
TRIM25	tripartite motif containing 25
TTC38	tetratricopeptide repeat domain 38
WARS	tryptophanyl-tRNA synthetase
WDYHV1	WDYHV motif containing 1
WIBG	within bgcn homolog (<i>Drosophila</i>)
XPO1	exportin 1
ZBTB24	zinc finger and BTB domain containing 24
ZMYM6	zinc finger, MYM-type 6

Table 1: abbreviated and full name of CDA potential interactants.

FIGURE 1



Tetrahedral reaction intermediate

FIGURE 2

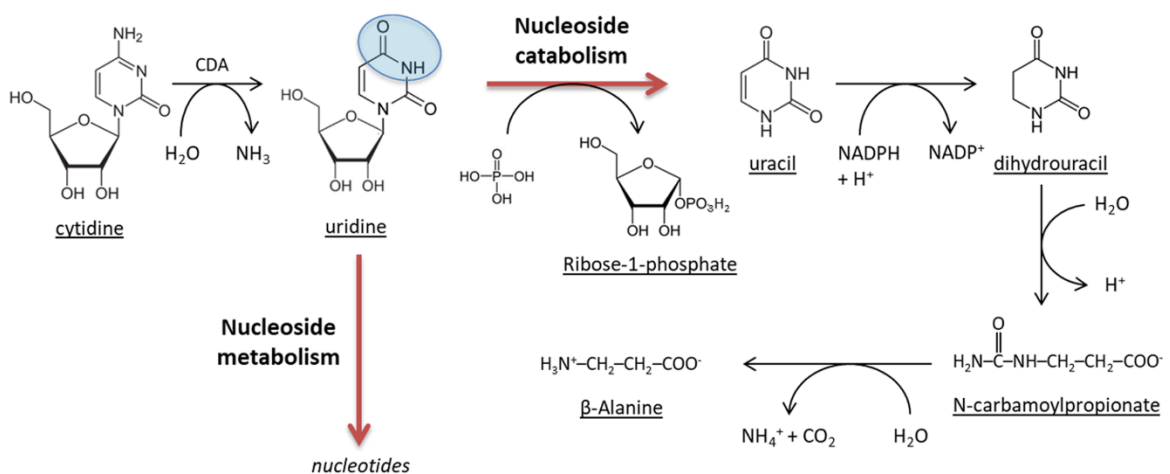


FIGURE 3

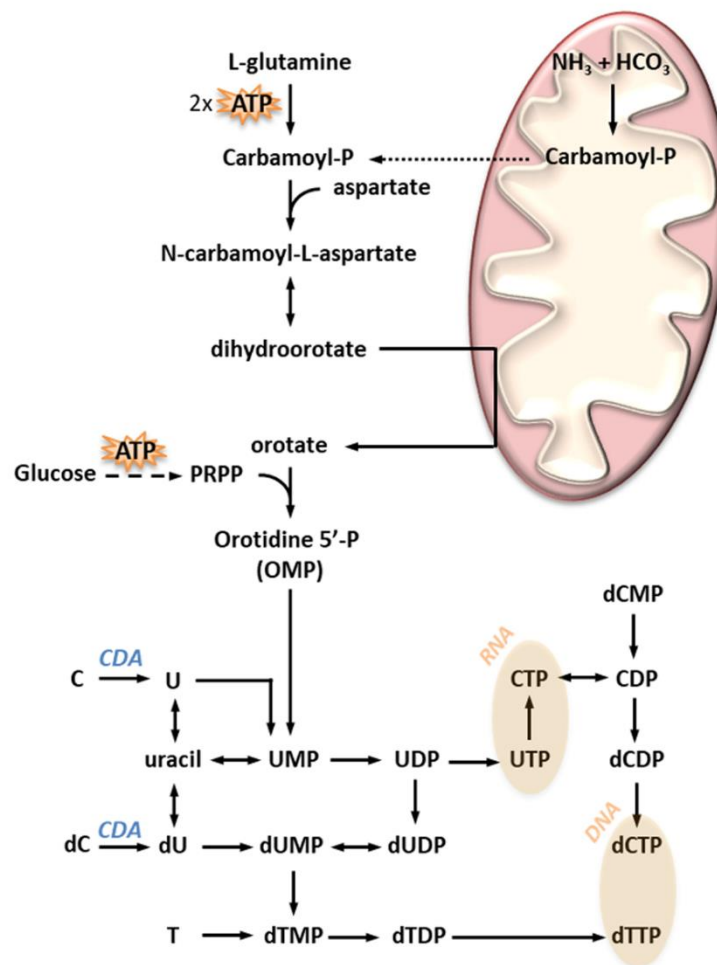


FIGURE 4A

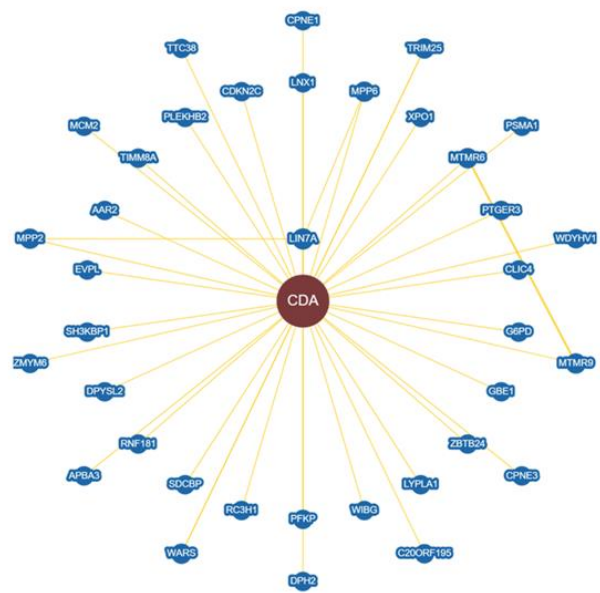


FIGURE 4B

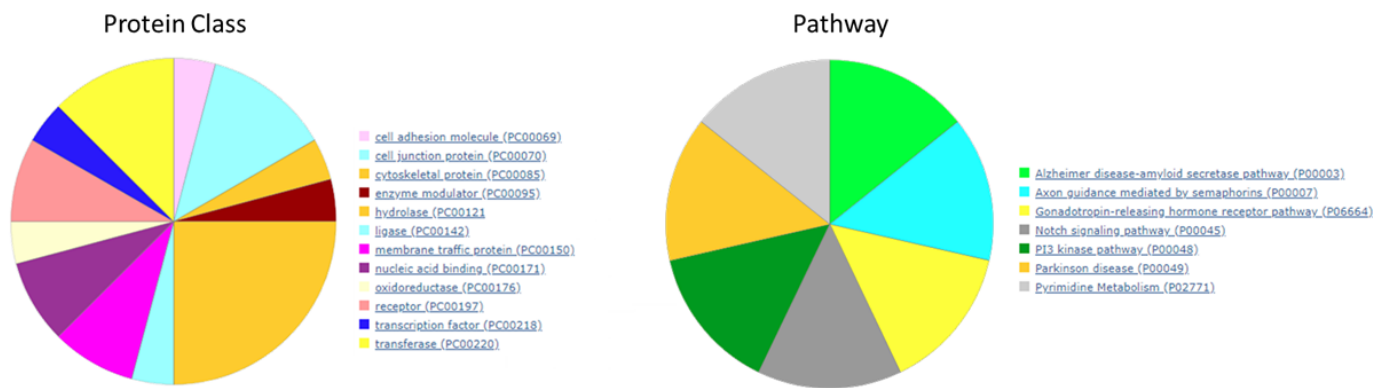


FIGURE 5

