

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	6
AVANT PROPOS.....	10
INTRODUCTION.....	11
I. NSCLC, Cisplatine, et modalités de résistance au cisplatine	11
1) NSCLC: épidémiologie et stratification des patients	11
A. Epidémiologie et principaux facteurs de risques	11
B. Classification pathologique des cancers du poumon et Traitements adaptés	12
2) Cisplatine: structure et modes d'action	15
A. Historique de la découverte du cisplatine	15
B. Modes d'action du cisplatine	15
3) Mécanismes moléculaires de la résistance au cisplatine	17
A. Mécanismes de résistance en amont de la cible	19
B. Mécanismes de résistance “on target”	22
C. Mécanismes de résistance en aval de la cible	26
D. Mécanismes de résistance “off target”	29
II. Métabolisme et cancer: le rôle central de la glutamine	31
1) Métabolisme altéré des cancers: ré-émergence d'une idée ancienne	31
2) Glutamine, glucose et cancer: histoire d'une dépendance Avérée	31
A. Stratégies pour l'augmentation de l'import de glutamine et glucose.....	33
B. De l'augmentation des imports en glutamine et glucose aux applications cliniques	39
3) Des altérations métaboliques au service des biosynthèses	39
A. L'effet Warburg	39
B. Glutamine et synthèse d'ATP via le TCA	43
C. Glutamine, glutamate et biosynthèses d'acides aminés	45

D. Synthèse des acides gras et carboxylation réductive via la glutamine.....	47
E. Glutamine et synthèse des nucléotides	49
F. Rôle de la glutamine dans le contrôle redox	53
G. Glutamine et autophagie dans les cellules cancéreuses	54
 III. Cibler le métabolisme pour traiter les cancers	58
1) Ciblage des principales voies métaboliques	58
A. Ciblage de l'import de glucose et de la glycolyse	58
B. Ciblage du cycle de l'acide citrique	60
C. Ciblage de la phosphorylation oxydative	60
D. Ciblage de la voie de synthèse des lipides	61
E. Ciblage de la voie de synthèse des nucléotides	64
F. Ciblage de la voie m-TOR	64
2) Applications thérapeutiques du catabolisme de la glutamine dans les cancers	64
A. Les analogues structuraux de la glutamine	65
B. Les inhibiteurs de glutaminase	65
C. Les inhibiteurs de la conversion du glutamate en α -cétoglutarate.....	66
D. Les inhibiteurs de l'import de glutamine	66
E. Les stratégies de dépléction en glutamine au niveau systémique.....	66
F. Les inhibiteurs d'isocitrate déshydrogénases	67
3) Cibler le métabolisme pour potentialiser les effets chimiothérapeutiques	70
A. Restriction calorique, jeûne et potentialisation des effets chimiothérapeutiques	70
B. Cibler le métabolisme pour contourner les résistances chimiothérapeutiques	72
OBJECTIFS	76
RESUME	77
ABSTRACT	78
RESULTS	79
Cisplatin-resistant cancer cells are sensitive to starvation	79
Glutamine dependency of cisplatin-resistant cancer cells	80

Glutamine-fueled nucleoside synthesis in cisplatin resistance	81
Selective susceptibility of cisplatin-resistant cells to antimetabolites targeting nucleotide biosynthesis.....	82
FIGURES	84
DISCUSSION	108
PERSPECTIVES	114
MATERIALS AND METHODS	117
BIBLIOGRAPHIE	123

Note: Conformément à ce qui est autorisé par l'école doctorale, les parties “Results” et “Materials and methods”, issues directement de l'article “Metabolic vulnerability of cisplatin-resistant cancers” actuellement en révisions au journal “EMBO”, ont été conservées en langue anglaise.

ABREVIATIONS

2-DG : 2-deoxy-D-glucose

2-HG : 2-hydroxyglutarate

3-BP : 3-bromopyruvate

5-FU : 5-fluorouracile

ACC : Acetyl-CoA cytosolique par l'acetyl-CoA carboxylase

ACLY : ATP citrate lyase

ADP : adénosine diphosphate

AML : leucémies myéloïdes aigues

AMM : autorisation de mise sur le marché

AMPK : AMP-activated protein Kinase

AOA : aminoxyacetate

ARF1 : ADP ribosylation factor 1

ATC : American Thoracic Society

ATP : adénosine triphosphate

ATP11B : ATPase phospholipid transporting 11B

ATP7A : ATPase copper transporting alpha

ATP7B : ATPase copper transporting beta

BAK1 : BCL2 antagonist/killer 1

BAX : BCL2 associated X, apoptosis regulator

BCL-2 : B-cell lymphoma 2

BRCA1 : breast cancer 1, DNA repair associated

BRCA2 : breast cancer 1, DNA repair associated

BSO : buthionine sulfoximine

c-myc : myc proto-oncogene

CAD : carbamoyl-phosphate synthétase 2, aspartate transcarbamylase, dihydroorotase

CDDP : cisplatin

Cis-R : résistant(es) au cisplatine

Cis-S : sensible(s) au cisplatine

Copper Transporter 1 : CTR1

Copper Transporter 2 : CTR2

CTP : cytosine triphosphate

DCA : dichloroacetate
DHAP : dihydroxyacétone phosphate
DMKG : dimethyl α -ketoglutarate
dTMP : déoxythymidine monophosphate
dUMP : déoxyuridine 5'-monophosphate
EGCG : epigallocatechin gallate
EGFR : Epidermal Growth Factor
EIPA : 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride
EML4 : echinoderm microtubule associated protein like 4
ERCC1 : excision repair cross-complementing 1
ERCC1-XPF : excision repair 4
ERS : European Respiratory Society
FA: Fanconi Anemia
FANCL: Fanconi anemia complementation group L
FASN : fatty acid synthase
FDA : Food and Drug Administration
FDA : food and Drug Administration
G6PD : glucose-6-phosphate deshydrogenase
GCN2 : general control nonderepressible 2
GFPT1 : glutamine fructose-6-phosphate aminotransferase 1
GlcNac : N-acetylglucosamine
GLS : glutaminase
GLUD : glutamate déshydrogénase
GLUT1 : Glucose Transporter 1
GLUT3 : Glucose Transporter 3
GMP : guanosine monophosphate
AMP : adénosine monophosphate
IMP : inosine monophosphate
GMPS : GMP synthétase
GOT : glutamate-oxaloacetate transaminase
GPD1 : glycerol-3-phosphate deshydrogenase 1
GPNA : L- γ -glutamyl-p-nitroanilide
GPT : glutamate-pyruvate transaminase
GSH : glutathion réduit

GSH : glutathion réduit
GSSG : glutathion oxydé
GTP : guanosine triphosphate
HK : hexokinase
HMGCR : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
IASLC : International Association for the Study of Lung Cancer
IDH : isocitrate déshydrogénase
IGF-1 : insulin like growth factor 1
IMPDH 1/2 : l'inosine monophosphate deshydrogenase 1/2
INPP4B : inositol polyphosphate-4-phosphatase type II B
KRAS : Kirsten rat sarcoma viral proto-oncogène
L-DON : 6-diazo-5-oxo-l-norleucine
LDHA : lactate deshydrogenase A
MCT1 : transporteur de monocarboxylate 1
MDR : Multi drug resistance proteins
MLH1 : mutL homolog 1
MMR : mismatch repair
MRP1 : multidrug resistant protein 1
MRP2 : multidrug resistant protein 2
MRP3 : multidrug resistant protein 3
MRP4 : multidrug resistant protein 4
MRP5 : multidrug resistant protein 5
MSH2 : mutS homolog 2
mTORC1 : mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1
NER : Nucleotide Excision Repair
NOS : Not Otherwise Specified
NSCLC : Non Small Cell Lung Cancer
PARP1 : poly(ADP-ribose) polymerase 1
PDK : Pyruvate Deshydrogénase Kinase 1
PFK : phosphofructokinase
PHGDH : 3-phosphoglycerate deshydrogenase
PK : pyruvate kinase
PKL : pyruvate kinase liver
PKM1 : pyruvate kinase muscle 1

PKM2 : pyruvate kinase muscle 2
PKR : pyruvate kinase kidney
POLH : DNA polymerase eta
pRB : protéine du rétinoblastome
PRPP : 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate
PRPS2 : phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2
PSAT1 : phosphosérine aminotransférase 1
PTEN : phosphatase and tensin homolog
RAD18 : E3 ubiquitin protein ligase
RAG : RAS-related GTPase complex
RAS : sarcoma viral oncogene
REV3 : DNA polymerase zeta
ROS : Reactive Oxygen Species
SAM : S-adenylmethionine
SLC1A5 : solute carrier family 1 member 5
SLC38A9 : solute carrier family 38 member 9
SLC3A2 : solute carrier family 3 member 2
SLC7A5 : solute carrier family 7 member 5
TALDO : transaldolase
TCA : tricarboxylic acid
TKTL1 : transcétolase-like 1
TP53 : tumor protein p53
UDP : uridine 5'-diphosphate
UMP : uridine 5'-monophosphate
UTP : uridine 5'-triphosphate
VDAC1 : voltage dependent anion channel 1

AVANT-PROPOS

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde, et la sous-catégorie du cancer du poumon non à petites cellules (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC) représente la grande majorité des cancers bronchiques (80%). Pour le traitement de ce type de cancers, les chimiothérapies à base de platine restent l'option principale, et le cisplatine est l'agent à base de sels de platine le plus efficace pour le traitement des patients présentant un NSCLC avancé. Cependant, la résistance des cellules néoplasiques à ce composé cyotoxique est fréquente, et pose un problème majeur en oncologie clinique. Des efforts se sont donc portés sur la compréhension des mécanismes de résistance au cisplatine, et l'élaboration de nouveaux modes de traitements pour contrer ces résistances. C'est ce thème que j'ai choisi d'explorer durant ma thèse, en me focalisant sur les vulnérabilités métaboliques potentielles des cellules résistantes au cisplatine (Cis-R), pouvant servir de talon d'Achille de ces cellules pour induire leur mort. Afin d'aborder ce sujet, j'ai établi une introduction en trois parties. La première partie portera sur le NSCLC et les modalités de traitement de cette pathologie par le cisplatine, ainsi que les modes de résistance développés par les cellules cancéreuses pour survivre malgré ces traitements. Ma thèse portant sur les altérations métaboliques présentées par les cellules Cis-R, je poursuivrai par une seconde partie traitant des altérations métaboliques majeurs observées dans les cellules tumorales en général, en me focalisant davantage sur le rôle principal de la glutamine dans le métabolisme des cellules cancéreuses. J'ai choisi de détailler le rôle métabolique central de cet acide aminé, car mes résultats ont mis en évidence l'importance de la glutamine dans la survie des cellules Cis-R en conditions de stress. Enfin, je finirai cette introduction par une troisième partie portant sur les potentiels traitements étudiés en recherche pré-clinique et actuellement testés, pour certains, en essais cliniques visant à cibler le métabolisme des cellules cancéreuses pour induire leur mort, et plus particulièrement pour contrer les résistances aux chimiothérapies conventionnelles. Cette dernière partie traitera également du jeûne comme option thérapeutique car, comme nous allons le voir, nous avons montré qu'il constitue une approche prometteuse pour éradiquer les cancers Cis-R.

INTRODUCTION

I. NSCLC, Cisplatine, et modalités de résistance au cisplatine

1) NSCLC: épidémiologie et stratification des patients

A. Epidémiologie et principaux facteurs de risques

Le cancer est la principale cause de mortalité dans le monde, quelque soit le niveau de revenu du pays (Torre et al., 2016). En 2012, 14,1 millions de nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués dans le monde, et 8,2 millions de décès dus au cancer ont été dénombrés (Ferlay et al., 2015). Il est attendu que le nombre de nouveaux cas de cancers, ainsi que les décès qui y sont associés, augmentent encore dans les prochaines années, particulièrement dans les pays en voie de développement. Cela s'explique par la persistance des principaux facteurs de risques, à savoir l'inactivité physique, le surpoids, la présence de perturbateurs endocriniens, la consommation de tabac (mais qui tend quand même à s'amenuiser), dans les pays développés, et leur augmentation dans les pays en voie de développement.

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer dans le monde avec 1,8 millions de nouveaux cas diagnostiqués en 2012 (Ferlay et al., 2015). La consommation de tabac est responsable d'au moins 80% des cas de cancer du poumon dans les pays développés (Agudo et al., 2012). Le pic d'incidence de ce type de cancer, dans un pays donné, a lieu généralement entre 20 et 30 années après la période de prévalence de tabagisme massif. Dans les pays développés, pour les hommes, la mortalité due au cancer des poumons a précédemment atteint un pic mais décroît actuellement, reflétant un déclin dans la prévalence du tabagisme. L'incidence des nouveaux cas de cancers du poumon chez les femmes tarde à décroître quant à elle, la période de prévalence de tabagisme massif ayant eu lieu plus tard que celle des hommes (Torre et al., 2014).

Les nombreuses causes de survenue des cancers des poumons sont les suivantes:

- **Le tabagisme actif :** Des études épidémiologiques ont montré que le tabagisme actif est responsable de près de 90 % des cancers du poumon. Fait important, la durée du tabagisme semble être beaucoup plus importante que le nombre de cigarettes fumées par jour. Par conséquent, l'arrêt du tabac à n'importe quel âge se traduit par une réduction

plus importante du risque de cancer du poumon que la simple réduction du nombre de cigarettes fumées par jour.

- **Le tabagisme passif :** l'exposition passive à la fumée de cigarette augmente le risque de cancer du poumon non à petites cellules, mais de manière nettement moins marquée que par le tabagisme actif.
- **Le radon:** le radon est un gaz radioactif produit par la désintégration naturelle de l'uranium. Ce gaz est omniprésent à des niveaux très faibles dans l'air extérieur et peut s'accumuler à l'intérieur des bâtiments par des fissures dans les planchers, les murs ou les fondations. D'autre part, le radon joue un rôle particulièrement important dans le risque de cancer du poumon chez les mineurs de fond qui sont habituellement exposés à des taux élevés de ce gaz (Torres-Duran et al., 2015).
- **L'amiante :** ce minéral est cancérigène pour les personnes exposées par leur profession. Il a été utilisé dans une grande gamme de produits d'isolation thermique, de protection anti- incendie, d'isolation acoustique, de toiture, et de sol. L'association du tabagisme actif et de l'exposition à l'amiante multiplie le risque de cancer du poumon. Compte tenu de la forte relation existant entre l'exposition à l'amiante et le mésothéliome, de nombreux pays (dont ceux de l'Union européenne) ont interdit, totalement ou partiellement, l'usage de ce minéral.
- **La pollution de l'air atmosphérique:** L'OMS a classé en 2013 la pollution de l'air extérieur comme facteur cancérigène pour l'homme. Les hydrocarbures et les métaux lourds générés par les transports et la production électrique se diffusent dans l'atmosphère. Ces particules fines, d'un diamètre de 2,5 micromètres, s'infiltrent dans l'organisme par les voies respiratoires. L'exposition à long terme à ces polluants environnementaux augmenterait de 80% et 36% les décès par cancer du poumon chez les femmes et les hommes respectivement (Wong et al., 2016).

B. Classification pathologique des cancers du poumon et traitements adaptés

Les cancers du poumon, ou cancers bronchiques, se subdivisent en plusieurs sous-catégories selon leurs caractéristiques histologiques. Les cancers à petites cellules (Small Cell Lung Cancer, SCLC) représentent 20% des cancers bronchiques. Ils présentent des tumeurs développées à partir des cellules neuroendocrines qui sont dispersées à l'état normal dans tout l'épithélium bronchique. Ils se caractérisent par un pouvoir métastatique très important, par voie lymphatique

et sanguine, et une grande sensibilité à la chimiothérapie et radiothérapie (Travis et al., 2013). Les cancers du poumon non à petites cellules (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC) représentent la grande majorité des cancers bronchiques (80%). Ils peuvent apparaître n'importe où dans les tissus qui tapissent les voies aériennes des poumons. Parmi ceux-ci, on distingue, selon la classification WHO de 2004 (Travis et al., 2013):

- les carcinomes épidermoïdes (Squamous Cell Carcinoma), qui se développent à partir de la paroi interne de la bronche, à la bifurcation des grosses bronches. Ils représentent 25 à 30 % des NSCLC et sont plus fréquents chez l'homme.
- les adénocarcinomes bronchiques, qui sont des tumeurs naissant à partir des glandes de la muqueuse bronchique en situation périphérique du poumon. Ils représentent 30% des NSCLC et sont davantage observés chez les sujets jeunes, les femmes, et touchent à la fois les fumeurs et non-fumeurs.
- les carcinomes à grandes cellules, qui représentent 10 à 15% des NSCLC. Leur foyer peut se trouver en tout site du poumon, et leur croissance et dissémination sont rapides. Ils sont liés à 90% au tabagisme (Fernandez and Battafarano, 2006).

En 2011, l'association internationale pour l'étude du cancer des poumons (International Association for the Study of Lung Cancer, IASLC), la société américaine thoracique (American Thoracic Society, ATC) ainsi que la société respiratoire européenne (European Respiratory Society, ERS) se sont associées afin d'éditer la nouvelle classification pathologique des cancers du poumon, et plus précisément une nouvelle classification des adénocarcinomes bronchiques (Travis et al., 2013). Celle-ci se base (1) sur l'analyse de petites biopsies pour les patients présentant un stade avancé de la maladie (2) sur l'analyse des résections chirurgicales pour les patients présentant des stades précoces de la maladie, et donc éligibles à la résection chirurgicale. La majeure avancée de cette nouvelle classification réside dans la nouvelle approche de médecine personnalisée qu'elle offre, en se basant sur des caractéristiques histologiques et génétiques des tumeurs. En effet, dans le passé, les carcinomes épidermoïdes ainsi que les adénocarcinomes bronchiques étaient traités de la même manière. Récemment, l'identification d'anomalies génétiques présentes dans certains types d'adénocarcinomes a permis d'offrir une médecine plus personnalisée aux patients. Ainsi, les mutations du récepteur au facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor, EGFR), ainsi que les réarrangements occasionnés par la fusion du gène codant la protéine associée aux microtubules EML4 et du gène

codant le récepteur tyrosine kinase ALK (nommée « fusion EML4-ALK »), sont dorénavant recherchés chez les patients présentant des adénocarcinomes bronchiques avancés. L'identification de ces anomalies moléculaires est cruciale car elle oriente le traitement des patients vers des thérapies ciblées efficaces spécifiquement:

- Les inhibiteurs de tyrosines kinases dirigés contre l'EGFR (erlotinib, gefitinib) ont été adoptés en thérapies de première ligne pour les patients présentant des adénocarcinomes avancés avec des mutations de l'EGFR (Maemondo et al., 2010; Rosell et al., 2012).
- Le Crizotinib (association d'inhibiteurs de tyrosines kinases) a été approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) pour les adénocarcinomes avancés présentant des réarrangements ALK (Sasaki and Janne, 2011).

Cependant, la mutation EGFR n'est présente dans la population caucasienne qu'à hauteur de 10% environ, et la fusion EML4-ALK n'est présente que dans 4% des cancers bronchiques environ (Reck et al., 2014). Ainsi, seule une très faible proportion de la population présentant un cancer bronchique avancé est éligible pour ces thérapies ciblées.

Pour la population inéligible à ces thérapies ciblées pour cause d'absence de ces anomalies moléculaires (approximativement 85 à 90% des patients), les chimiothérapies à base de platine restent les thérapies standards. En outre, le cisplatine est l'agent à base de sels de platine le plus efficace pour les patients présentant un NSCLC avancé (Ardizzoni et al., 2007). Ainsi, dans les cas de cancers bronchiques peu avancés de stade II, le traitement post chirurgical de référence est composé de cisplatine associé à un inhibiteur de la polymérisation des microtubules, la Vinorelbine. Dans les cancers de stade III, plus avancés, le cisplatine est associé à la Vinorelbine ou à l'Etoposide, qui est un inhibiteur de la topoisomérase II (Vansteenkiste et al., 2013). Enfin, les traitements de référence des stades IV métastatiques constituent des associations entre le cisplatine et l'un des quatre agents suivants: pemetrexed (un analogue de l'acide folique), gemcitabine (un analogue de la déoxycytidine), docetaxel ou paclitaxel, tous deux des inhibiteurs de dépolymérisation des microtubules (Vansteenkiste et al., 2013).

2) Cisplatine: structure et modes d'action

A. Historique de la découverte du cisplatine

Le cisplatine a été décrit pour la première fois par Michele Peyrone dans les années 1840. Il a été initialement connu sous le nom du sel de Peyrone. Plus d'un siècle plus tard, en 1965, Rosenberg s'intéressa à ce composé lors d'une expérience où il souhaitait initialement étudier l'influence du champ électrique sur le processus de croissance de bactéries *Escherichia Coli* (Rosenberg et al., 1965). En observant que la division cellulaire était stoppée, mais que la croissance des cellules continuait, Rosenberg montra que l'effet inhibiteur n'était pas dû au courant parcourant le milieu de culture, mais à la formation d'un complexe entre le platine libéré par les électrodes et le chlorure d'ammonium contenu dans le milieu. Quatre années plus tard, Rosenberg montrait qu'en administrant du cis-diamminedichloroplatinum (cisplatin, CDDP) par voie intrapéritonéale à des souris portant des tumeurs (sarcoma-180), il observait une régression tumorale remarquable (Rosenberg et al., 1969). L'activité antitumorale du cisplatine a ensuite été confirmée dans de multiples cancers à partir des années 1970, notamment dans les cas de cancers ovariens (Wiltshaw and Kroner, 1976), testiculaires (Einhorn, 1990) ainsi que dans les cancers pulmonaires (Gralla et al., 1981).

B. Modes d'action du cisplatine

B.1. Les lésions à l'ADN

Le cisplatine est administré par voie veineuse. Le complexe reste dans son état neutre tant qu'il circule dans les voies sanguines. La concentration en ions chlorures y est relativement forte (100 mM), et empêche l'hydrolyse du composé. Le cisplatine entre ensuite dans la cellule par diffusion passive à travers la membrane, ou par l'intermédiaire de transporteurs, comme le transporteur CRT1 (Sinani et al., 2007). La faible concentration en ions chlorures du milieu intracellulaire (2-10 mM) facilite alors l'hydrolyse du cisplatine : ce complexe, non encombré en position axiale, peut échanger facilement ses radicaux chlore contre des molécules d'eau, lors du processus d'« aquation », qui se fait spontanément dans le cytoplasme. Le départ de chaque radical chlore se traduit par l'élimination d'un ion chlorure : le complexe issu de l'échange est donc chargé positivement. Les complexes résultant, contenant une ou deux molécules d'eau, sont hautement électrophiles et se lient avec une haute affinité à l'ADN nucléaire, préférentiellement au niveau des sites nucléophiles N7 des purines. La liaison du CDDP à l'ADN peut produire des adduits monofonctionnels (liaison d'une molécule de CDDP à une seule purine), des adduits

intra-brins (entre deux purines adjacentes par exemple), des adduits inter-brins, et enfin des adduits intermoléculaires composés de complexes ADN-protéine (**Figure 1**).

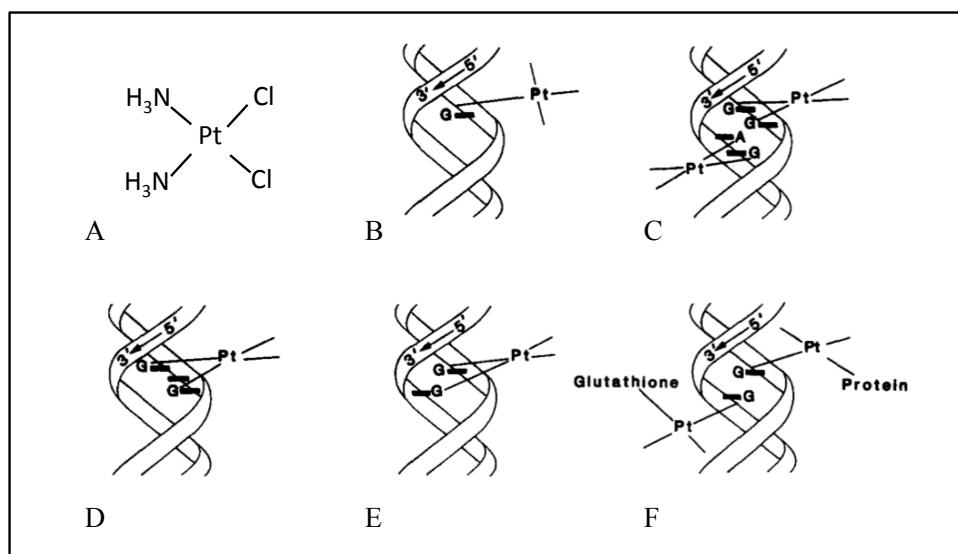


Figure 1: La structure du CDDP et des différents adduits produits par sa liaison à l'ADN (Modifié, d'après Eastman, 1987)

A. Structure du Cis-DDP; B-F. Structure d'un adduit (B) monofonctionnel (C-D) intra-brins (E) inter-brins (F) intermoléculaire.

Lorsque les dommages à l'ADN sont limités, les distorsions causées par les adduits induisent un arrêt du cycle cellulaire en phases S et G2. Cela a pour effet de protéger la cellule en (1) permettant aux mécanismes de réparation de rétablir l'intégrité de l'ADN, (2) empêchant les mitoses anormales ou abortives (Vitale et al., 2011). Les distorsions de l'ADN causées par les adduits peuvent être reconnues par une multitude de voies de réparation (Bellon et al., 1991), notamment par la voie de réparation par excision de nucléotide (Nucleotide Excision Repair, NER) qui semblerait être la plus courante pour éliminer les adduits de cisplatine (Chaney and Sancar, 1996; Furuta et al., 2002), mais également par la voie du “mismatch repair” (MMR) (Kunkel and Erie, 2005). Lorsque les dommages sont trop importants et irréparables, soit les cellules entrent en senescence, soit elles s'engagent dans une voie de mort, le plus souvent dans la voie apoptotique mitochondriale (Kunkel and Erie, 2005).

B.2. Interactions avec les nucléophiles cytoplasmiques

Après son entrée dans la cellule, environ 1% seulement du CDDP se lie de façon covalente à l'ADN nucléaire (Gonzalez et al., 2001). En outre, il a été démontré à maintes reprises que le CDDP pouvait exercer son activité cytotoxique dans des cellules énucléées (Berndtsson et al., 2007; Mandic et al., 2003). Cela s'explique par le fait qu'avant de rejoindre le noyau, le CDDP se lie à des nucléophiles cytoplasmiques, et forme ainsi des liaisons covalentes avec un large panel de peptides et polypeptides contenant des cystéines, notamment le glutathion réduit (GSH) et des metallothioneïnes, mais également avec des méthionines (Timerbaev et al., 2006). Compte tenu de sa faculté à se lier à ces éléments cytoplasmiques, il a été montré que le CDDP exerce son action毒 via diverses mécanismes : (i) L'interaction entre le CDDP et le glutathion réduit déplete le cytosol en équivalents réducteurs, augmentant ainsi le stress oxydatif intracellulaire. Ceci entraîne, de fait, des effets cytotoxiques ainsi que des dommages à l'ADN (Jordan and Carmo-Fonseca, 2000) De plus, l'accumulation cytoplasmique d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que d'oxyde nitrique (Srivastava et al., 1996) induites par les traitements au CDDP favorise directement l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (Permeability Transition Pore Complex, PTPC) (Brenner and Grimm, 2006; Godoy et al., 2012; Kroemer et al., 2007) (ii) le CDDP peut activer le stress du réticulum (Mandic et al., 2003); (iii) le CDDP active une voie de signalisation létale induisant la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Cette voie implique BAK1 et BAX, membres de la famille pro-apoptotique BCL-2 ainsi que le canal mitochondrial voltage dépendant VDAC1 (Sharaf el dein et al., 2012; Tajeddine et al., 2008); (iv) le CDDP active le pool cytoplasmique du suppresseur de tumeur p53, induisant la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Chipuk et al., 2004; Mihara et al., 2003; Vaseva et al., 2012). La contribution relative de tous ces effets cytoplasmiques et nucléaires est dépendante du contexte.

3) Mécanismes moléculaires de la résistance au cisplatine

La chimiothérapie à base de platine utilisée dans les traitements des NSCLC avancés n'est malheureusement pas curative et les taux de réponses complètes dans le cas de chimiothérapies néo-adjuvantes s'élèvent à peine à 10% (Depierre et al., 2002). Ceci s'explique par les résistances « *de novo* » et acquises, qui représentent un réel frein à l'amélioration des résultats à long terme.

Les mécanismes moléculaires régissant la résistance au cisplatine sont nombreux, et résultent d'altérations qui peuvent être classées en quatre catégories : (i) les altérations touchant des processus précédant la liaison du CDDP à ses cibles cytoplasmiques ou nucléaires (« pre-target resistance ») ; (ii) des altérations directement liées aux dommages provoqués par le CDDP (« on-target resistance ») ; (iii) des altérations de la voie de signalisation de mort engendrée par les lésions induites par le CDDP (« post-target resistance ») ; (iv) des altérations dans des voies de signalisations qui ne sont pas directement affectées par le CDDP (« off-target resistance »).

Les 4 types d'altérations, que nous allons développer dans le paragraphe suivant, sont résumés dans la **Figure 2**.

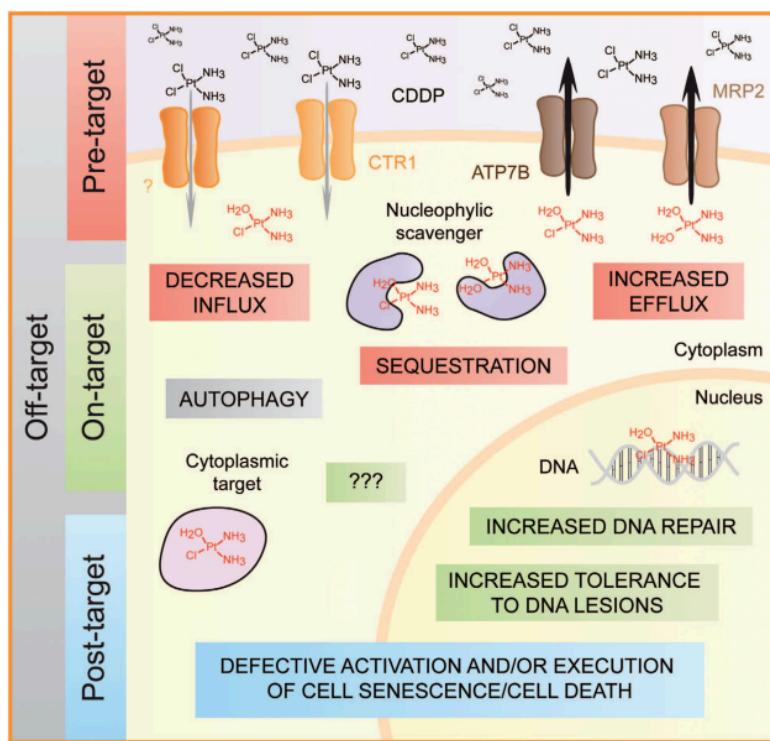


Figure 2: Les mécanismes moléculaires de la résistance au cisplatine (Modifié, d'après Galluzzi et al., 2014).

Les cellules cancéreuses peuvent perdre leur sensibilité au cisplatine suite à diverses altérations possibles. Celles-ci peuvent (i) affecter des processus qui précèdent la fixation du CDDP sur sa cible: « pre-target resistance », (ii) potentialiser les processus de réparation des dommages causés par le cisplatine: « on-target resistance », (iii) affecter la transmission du signal de mort engendré par les lésions induites par le CDDP: « post-target resistance », (iv) stimuler la génération de signaux en faveur de la survie: « off-target resistance ».

A. Mécanismes de résistance en amont de la cible

A.1. Réduction de l'accumulation intracellulaire de cisplatine

Les transporteurs de cuivre CTR1 et CTR2

Il a été démontré que de nombreuses lignées résistantes au cisplatine montraient une réduction significative de l'accumulation de la drogue (Loh et al., 1992; Mellish et al., 1993). Cette accumulation réduite peut provenir d'une diminution de l'entrée du cisplatine dans les cellules. Initialement, on considérait que le cisplatine entrait dans les cellules principalement par diffusion passive à travers la membrane plasmique. Mais en 2002, le rôle crucial du transporteur de cuivre CTR1 (Copper Transporter 1), dans l'entrée du cisplatine dans la cellule a été mis en évidence. Ainsi, il a été montré que des fibroblastes d'embryons murins $\text{Ctr1}^{-/-}$ accumulaient bien moins de cisplatine que leurs homologues Wild Type, et étaient deux à trois fois plus résistants à ses effets cytotoxiques (Holzer and Howell, 2006; Holzer et al., 2006; Ishida et al., 2002; Katano et al., 2002). Il a été également montré que le co-traitement de cellules avec du cisplatine et de l'EGCG (epigallocatechin-3-gallate), qui augmente l'ARNm et l'expression protéique de CTR1, induisait une augmentation du cisplatine intracellulaire, et une sensibilisation accrue à cette drogue (Wang et al., 2015c). Dans le même sens, il a été montré que des cellules pré-traitées avec du cuivre, le principal substrat de CTR1, sont protégées des effets cytotoxiques du cisplatine (More et al., 2010), alors que des traitements avec des chélateurs du cuivre augmentent l'accumulation intracellulaire du cisplatine et exacerbant sa cytotoxicité (Ishida et al., 2010). En outre, deux études cliniques ont montré que les patients traités à base de sels de platine, et présentant une surexpression de CTR1 dans leurs tumeurs, avaient une meilleure survie globale, ainsi qu'une meilleure survie sans progression, en comparaison avec les patients sans surexpression de CTR1 (Chen et al., 2012; Kim et al., 2014). Enfin, de façon intéressante, il a été montré que le traitement de fibroblastes embryonnaires murins par du cisplatine entraîne une sous-expression de CTR1, en raison de son internalisation suivie de sa dégradation par le protéasome (Holzer and Howell, 2006), pouvant ainsi expliquer une des modalités de résistance acquise au cisplatine.

Le cisplatine est également transporté par un autre transporteur de cuivre, le CTR2 (Copper Transporter 2). CTR2 se trouve au niveau de la membrane plasmique comme CTR1, mais également au niveau des membranes des organites intracellulaires (van den Berghe et al., 2007). En terme de corrélation avec la résistance au cisplatine, l'effet opposé à celui de CTR1 a été observé : la sous-expression de CTR2 induit une augmentation de l'entrée, la cytotoxicité, et la sensibilité au cisplatine (Blair et al., 2009). En outre, deux études cliniques ont montré que des

niveaux faibles de CTR2 étaient associés à de meilleurs résultats suite à des traitements au cisplatine (Lee et al., 2011; Yoshida et al., 2013). Enfin, il semblerait que le ratio CTR1/CTR2 soit un bon biomarqueur de la sensibilité des tumeurs au cisplatine (Yoshida et al., 2013).

Les transporteurs P-type ATPase

Après la découverte de l'implication de CTR1 dans l'import cellulaire du cisplatine, les recherches se sont focalisées sur deux transporteurs exportateurs de cuivre, l' ATPase transporteuse de cuivre alpha (ATP7A) et l'ATPase transporteuse de cuivre beta (ATP7B), qui sont toutes deux des ATPases de type P. Leur sur-expression a été démontrée dans des cellules résistantes au cisplatine (Safaei et al., 2004), et leur surexpression expérimentale par transfection entraîne l'acquisition d'une résistance au cisplatine (Samimi et al., 2004). De plus, la sous-expression d'ATP7A *in vivo* augmente la sensibilité au cisplatine (Zhu et al., 2017b). En outre, le niveau d'expression d'ATP7B chez les patients atteints de cancers de l'ovaire et de l'endomètre prédirait la sensibilité au cisplatine (Aida et al., 2005; Nakayama et al., 2002). Il est à noter qu'une autre ATPase de type P, l'ATP11B (ATPase phospholipid transporting 11B), serait impliquée dans la résistance au cisplatine. En effet, son expression est corrélée à la résistance au cisplatine dans des lignées de cancer de l'ovaire et il a été montré qu'elle participe à l'export du cisplatine en contribuant au transport vésiculaire du cisplatine depuis le Golgi jusqu'à la membrane plasmique (Moreno-Smith et al., 2013).

Les transporteurs ATP-binding cassette (ABC)

Un large spectre d'agents anti-cancéreux est sujet aux protéines de résistance aux drogues multiples (multidrug resistance proteins, MRP). Il s'agirait également du cas du cisplatine. En effet, il a été montré que MRP1, MRP2, MRP3 et MRP5 jouent un rôle dans la résistance au cisplatine en augmentant son export (Borst et al., 2000).

En particulier, des manipulations génétiques (surexpression et utilisation d'ARN interférence) ont permis d'identifier MRP2 comme acteur majeur de l'augmentation de l'export du cisplatine au sein des cellules résistantes (Cui et al., 1999; Koike et al., 1997; Liedert et al., 2003). Sa diminution pharmacologique entraîne une re-sensibilisation au cisplatine de cellules résistantes au cisplatine (Cis-R) (Zhang et al., 2016b). En outre, il a été montré que le traitement par le cisplatine augmente l'expression de MRP2, pouvant ainsi expliquer une des modalités de résistance acquise au cisplatine (Ke et al., 2013). De plus, deux études réalisées sur des biopsies/résections de patients indiquent que le niveau d'expression de MRP2 serait prédictif de la réponse au cisplatine (Korita et al., 2010; Yamasaki et al., 2011). Enfin, de façon intéressante,

il a été montré que la surexpression des transporteurs MRP1 et MRP4, ayant des profils de N-glycosylation anormaux, était associée à des chimiorésistances aux dérivés du platine, et notamment le cisplatine (Beretta et al., 2010). Ceci nous intéresse tout particulièrement car lors de mon travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur le rôle de la glutamine dans la résistance au cisplatine, comme nous le verrons plus tard.

A.2. Séquestration du cisplatine par les nucléophiles cytoplasmiques

Inactivation par la conjugaison au glutathion

Comme nous l'avons vu précédemment, le cisplatine est très avide de liaisons avec les nucléophiles cytoplasmiques incluant le GSH, les méthionines, les métallothionéines, et autres protéines riches en cystéines. Cette avidité, expliquant en partie la cytotoxicité du cisplatine, a également pour conséquence de diminuer la quantité intracellulaire de cisplatine libre et réactif qui pourrait parvenir jusqu'au noyau (Kasahara et al., 1991; Sakamoto et al., 2001). Ainsi, il a été montré que des niveaux élevés de GSH, de gamma-glutamylcysteine synthétase (l'enzyme qui catalyse la synthèse du GSH), et de glutathione S-transferase (l'enzyme permettant la conjugaison entre le cisplatine et le GSH) ont été observés dans des contextes de résistance au cisplatine, à la fois *in vitro* et *ex vivo* (Lewis et al., 1988; Tonigold et al., 2014), bien que cette relation soit controversée, notamment dans le cancer de l'ovaire (Nikounezhad et al., 2017). Les MRP1, et MRP2 antérieurement cités ont d'ailleurs la capacité d'exporter les conjugués formés par le GSH et le cisplatine (Ishikawa, 1992).

Inactivation par la liaison aux métallothionéines

Des manipulations génétiques effectuées sur des lignées murines et humaines ont permis d'établir une relation entre des niveaux élevés de métallothionéines (des protéines de faibles poids moléculaire (6-10 kDa), riches en cystéines, se caractérisant par leur haute affinité pour les ions métalliques, et contrôlant la biodisponibilité des métaux essentiels comme le cuivre et le zinc) et les phénotypes de résistance au cisplatine (Kasahara et al., 1991; Kelley et al., 1988). *In vivo*, la co-administration d'un agent ARN interférant ciblant les métallothioneines et de cisplatine a permis de réverter le phénotype de résistance au cisplatine de tumeurs murines et d'améliorer l'activité anticancéreuse du cisplatine (Lee et al., 2015). Cependant, chez les patients, l'expression des métallothionéines dans des tumeurs de cellules germinales testiculaires ne s'est pas avérée être un bon facteur prédictif de la réponse au cisplatine (Tuzel et al., 2015).

B. Mécanismes de résistance “on target”

B.1. Les altérations du NER

La sensibilité des cellules cancéreuses aux effets cytotoxiques et cytostatiques du cisplatine est limitée par la présence d'un système efficace de réparation de l'ADN. En particulier, il a été montré que le NER répare la majorité des lésions induites par le cisplatine (Chaney and Sancar, 1996; Furuta et al., 2002), bien que le MMR soit aussi impliqué dans la détection des lésions (Kunkel and Erie, 2005). Spécifiquement, les adduits intrabrins N7-d(CpG) et les N7-d(ApG) formés par les liaisons du cisplatine à l'ADN induisent des distorsions dans l'ADN qui sont repérées et réparées par le NER, voie de réparation qui requiert plus de 30 protéines. L'adduit ADN-Cisplatine est tout d'abord reconnu par XPE et XPC-DDB1/2 (**Figure 3**). Le complexe de facteur de transcription TFIIH vérifie les dommages et assemble le complexe de pré-incision formé par RPA, XPA et XPG. L'ADN est ensuite déroulé par les hélicases XPB et XPD. Ensuite, les endonucléases ERCC1-XPF et XPG créent une excision de plusieurs bases en amont et en aval de l'adduit. Les bases manquantes sont ensuite remplacées par un complexe de synthèse comprenant RPA, RFC, PCNA et Pol δ/ε. Enfin, l'ADN nouvellement synthétisé est lié au reste par la DNA ligase 1. La balance entre dommages et réparations à l'ADN dicte l'issue de survie ou de mort après traitement au cisplatine. Des changements dans l'efficacité de la machinerie de réparation induisent donc des changements dans la sensibilité au cisplatine.

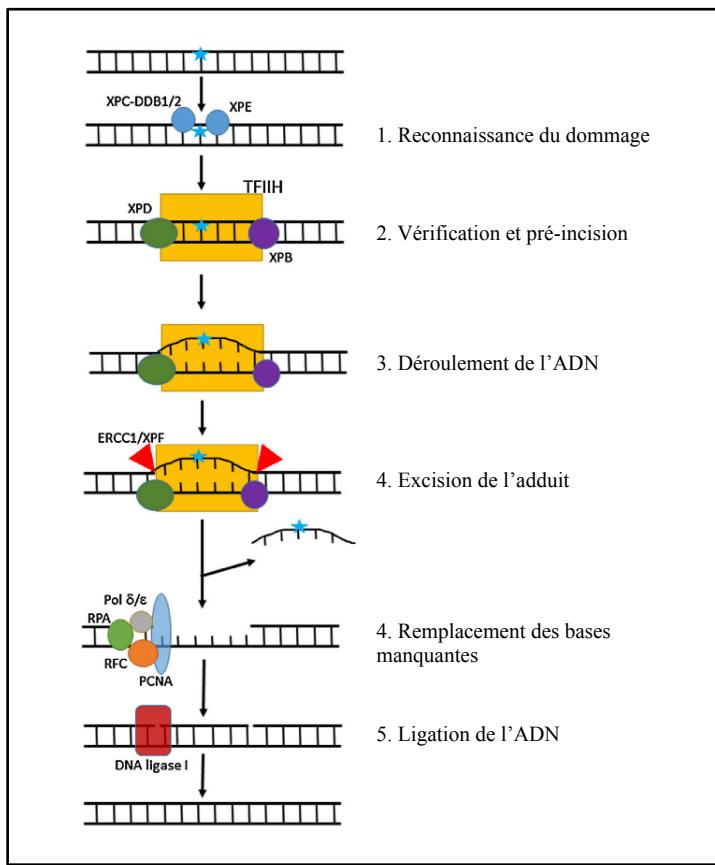


Figure 3: Représentation schématique de la suppression des adduits de cisplatine par le NER (Modifié, d'après Amable, Pharmacological research, 2016).

L'adduit ADN-Cisplatin est reconnu par XPE et XPC-DDB1/2. 2. Le complexe de facteur de transcription TFIIDH vérifie les dommages et assemble le complexe de pré-incision formé par RPA, XPA et XPG. 3. L'ADN est ensuite déroulé par les hélicases XPB et XPD. 4. Puis, les endonucléases ERCC1-XPF et XPG créent une excision de plusieurs bases en amont et en aval de l'adduit. Les bases manquantes sont ensuite remplacées par un complexe de synthèse comprenant RPA, RFC, PCNA et Pol δ/ε. 5. Enfin, l'ADN nouvellement synthétisé est lié au reste par la DNA ligase I.

ERCC1 (ERCC1 : excision repair cross-complementing 1) est l'un des biomarqueurs les plus étudiés pour la résistance au cisplatine. L'excision de l'adduit par le dimère ERCC1-XPF est l'étape limitante de la voie NER. Il a été montré qu'une augmentation de l'efficacité du NER a été associée à la résistance au cisplatine *in vitro* et *in vivo* (Li et al., 1998; Li et al., 2000; Metzger et al., 1998). En outre, l'expression de ERCC1, mesurée par le niveau de l'ARNm ou de protéines, a été négativement corrélée avec la survie des patients ou la réponse au cisplatine dans de multiples cancers tels que l'ovaire (Deloia et al., 2012; Ulker et al., 2015), l'œsophage (Huang et al., 2013), le col de l'utérus (Bai et al., 2012; Karageorgopoulou et al., 2017; Zwenger et al., 2015), le carcinome squameux tête et cou (Ciaparrone et al., 2015; Xuelei et al., 2015), le foie (Ueda et al., 2011), le mésothéliome (Ting et al., 2013), l'adénocarcinome pulmonaire (Ting et al., 2013), l'estomac (Metzger et al., 1998), le sein (MA and El Kashef, 2017) ainsi que le

NSCLC (Li et al., 2014; Olaussen et al., 2006; Tiseo et al., 2013). Cependant, l'utilisation de biomarqueurs adéquats pour mesurer l'efficacité du NER pose actuellement question, notamment dans le NSCLC. En effet, la détection spécifique de l'unique isoforme fonctionnel de ERCC1 n'est plus possible aujourd'hui en raison de l'évolution de l'anticorps utilisé lors de l'étude de Olaussen et al. en 2006. L'utilisation de 16 autres anti-corps commerciaux dirigés contre ERCC1 n'a pas permis la détection spécifique de l'isoforme fonctionnel, seul prédictif de la réponse au cisplatine (Friboulet, 2013). En conséquence, l'utilisation de ces anti-corps afin d'évaluer l'expression de ERCC1 n'est plus conseillée pour guider les décisions thérapeutiques dans le NSCLC.

Alors que la majorité des études s'est focalisée sur ERCC1, plusieurs travaux suggèrent que d'autres gènes ayant un rôle dans le NER sont impliqués dans la résistance au cisplatine. Dabholkar et al. ont montré que d'autres gènes impliqués dans le NER étaient surexprimés chez les patients résistants au cisplatine, notamment XPA, membre du complexe de pré-incision, et l'hélicase XPB, qui sont tous deux surexprimés dans des tumeurs ovariennes résistantes au cisplatine (Dabholkar et al., 2000; Yu et al., 1996). Cependant, des études cliniques additionnelles sont nécessaires pour valider ces marqueurs dans d'autres types tumoraux.

La protéine XPF, qui dimérisé avec ERCC1 pour catalyser l'incision en amont et en aval de l'adduit pourrait également constituer un biomarqueur intéressant de la résistance au cisplatine. Dans des lignées de cancer du colon, de l'ovaire et du rein, l'augmentation de l'expression de XPF a été corrélée avec le degré de résistance au cisplatine (Yu et al., 1996; Zhang et al., 2016a). De plus, deux études cliniques, réalisées dans les cancers tête et cou, ont montré qu'une augmentation de l'expression de XPF était corrélée avec une augmentation de la résistance au cisplatine (Koberle et al., 2010; Vaezi et al., 2011).

B.2. Les altérations du MMR

Les lésions de l'ADN induites par le cisplatine peuvent être détectées (mais pas réparées) par le MMR, qui repère en temps normal les erreurs d'insertions ou les délétions qui se produisent lors de la réPLICATION ou de la recombinaison. MutS homolog 2 (MSH2) et mutL homolog 1 (MLH1) font partie des acteurs du MMR qui participent à la reconnaissance des adduits CpG interbrins (Mello et al., 1996; Sawant et al., 2015; Vaisman et al., 1998). *A priori*, les protéines du MMR tentent de réparer les lésions dues aux adduits de cisplatine, échouent, et transmettent alors un signal pro-apoptotique (Vaisman et al., 1998). Il paraît donc cohérent que MSH2 et MLH1 soient

souvent mutés ou sous-exprimés dans des contextes de résistance acquise au cisplatine (Aebi et al., 1991; Brown et al., 1997; Drummond et al., 1996; Fink et al., 1998), diminuant ainsi l'apoptose induite par le traitement. En outre, Bassett et al. ont montré que des défauts dans MLH1 ou MSH6 (un autre acteur du MMR) sont associés à des taux élevés de synthèse trans-lésionnelle, phénomène par lequel la synthèse d'ADN se poursuit malgré la présence d'adduits dûs au cisplatine (Bassett et al., 2002). La synthèse trans-lésionnelle est réalisée par une multitude d'ADN polymérases, dont l'ADN polymerase eta (POLH) et l'ADN polymerase zeta (REV3). Or des défauts de POLH et REV3 ont été liés à une augmentation de la sensibilité au cisplatine *in vitro* (Albertella et al., 2005; Yang et al., 2015b) et la surepression ainsi que la mutation de REV3 ont été décrites dans le contexte de la résistance au cisplatine (Huang et al., 2016; Wang et al., 2015b).

B.3. BRCA1/2 et altérations du HR

La présence d'adduits inter-brins dus au cisplatine peut aboutir à des coupures double-brins (Frankenberg-Schwager et al., 2005), qui sont réparées en phase S par la machinerie de recombinaison homologue (Homologous recombination, HR) (Smith et al., 2010). Les acteurs du HR sont notamment codés par les gènes BRCA1 et BRCA2, deux gènes fréquemment mutés dans les formes familiales de cancers du sein et de l'ovaire (Black, 1994). De façon intéressante, les cancers HR-déficients, notamment BRCA1 et BRCA2 mutés (mutations pertes de fonctions) présentent une sensibilité accrue au cisplatine (Farmer et al., 2005). En outre, il a été montré que des cellules exposées de façon prolongé au cisplatine devenues résistantes (résistance acquise) présentaient une augmentation des capacités de recombinaison homologue (Chen et al., 2016).

B.4. La voie de réparation Fanconi Anemia (FA)

Le cisplatine induit des pontages intra-brins qui bloquent les fourches de réPLICATION lors de la réPLICATION de l'ADN. Le rôle de la voie FA est d'empêcher l'effondrement de la fourche de réPLICATION (Grompe and D'Andrea, 2001). Une récente étude a montré que les capacités de réparation via la voie FA étaient augmentées dans des lignées de NSCLC résistantes au cisplatine (A549), et que le silencing des gènes FANCL et RAD18 codant des éléments de la voie de réparation FA induisait une augmentation de la sensibilité au cisplatine (Chen et al., 2016).

B.5. L'hyperactivation de PARP1

La poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) est une enzyme de la famille des poly(ADP-ribose) polymérases. Cette enzyme est impliquée, directement ou indirectement, dans les réparations simple-brin, le NER, les réparations double-brins et la modulation de la structure de la chromatine (Ray Chaudhuri and Nussenzweig, 2017). Avant mon arrivée dans notre laboratoire, Judith Michels et ses collègues ont démontré que la résistance au cisplatine pouvait être associée à une hyperactivation de PARP1 (Michels et al., 2013), et donc une accumulation de résidus de parylation au sein des cellules. Ainsi, il a été montré que les cellules résistantes au cisplatine présentant une hyperactivation de PARP1 étaient particulièrement sensibles aux inhibiteurs de PARP, entrant ainsi en apoptose. En outre, l'administration de l'inhibiteur de PARP PJ-34 permet le ralentissement de la croissance de xenogreffes résistantes au cisplatine et présentant une hyperactivation de PARP.

C. Mécanismes de résistance en aval de la cible

La résistance au cisplatine en aval de la cible peut résulter de diverses altérations telles que (1) des défauts dans la voie de transduction du signal induisant l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN ; (2) des problèmes liés à la machinerie d'exécution de la mort cellulaire. Les dommages à l'ADN non réparables induits par le cisplatine mènent à l'activation d'une voie de signalisation pro-apoptotique faisant intervenir de multiples acteurs (voir **tableau 1**). Des altérations génétiques et épigénétiques des composants de ce réseau de signalisation ont été associées à la résistance au cisplatine.

Les altérations étant explicitées dans le tableau 1, nous n'aborderons pas ici l'implication de tous les acteurs présents dans le tableau. Cependant, nous pouvons nous attarder sur l'un des mécanismes prédominants de résistance en aval de la cible, impliquant l'inactivation de la protéine p53 (TP53) (Vousden and Lane, 2007), présente dans la moitié des cancers chez l'humain (Kirsch and Kastan, 1998). Cela a été documenté *in vitro*, en comparant la sensibilité au cisplatine d'un large panel de lignées cellulaires tumorales déficientes ou non en TP53 (Branch et al., 2000; O'Connor et al., 1997). En outre, des patients atteints de cancer ovarien, et présentant une version wild-type de TP53 sont plus sensibles au cisplatine que les patients présentant un TP53 muté (Gadducci et al., 2002). Il est intéressant de noter que les tumeurs testiculaires, particulièrement sensibles au cisplatine, sont un des seuls types de tumeurs dans lesquels TP53 est rarement inactivé (Peng et al., 1993). Les rôles d'autres acteurs intervenant

dans les mécanismes de résistance au cisplatine en aval de la cible sont spécifiés dans le **tableau 1.**

Factor	Mode-of-action	Relevance	Ref.
BAX-like proteins	Pro-apoptotic members of the BCL-2 protein family.	BAX/BAK-deficiency confers resistance to CDDP and to several other stressors, <i>in vitro</i> . Conclusive clinical data are missing.	{Castedo, 2006, 16675948} (Kroemer et al., 2007) (Tajeddine et al., 2008)
BCL-2-like proteins	Anti-apoptotic members of the BCL-2 protein family.	Overexpression of BCL-2, BCL-X _L and MCL-1 confers resistance to several stressors, <i>in vitro</i> . Clinical data link the expression levels of anti-apoptotic BCL-2 proteins with CDDP resistance and recurrent disease. Chemical inhibitors of BCL-2-like proteins are being clinically tested to overcome resistance.	{Han, 2003, 14716031} (Kroemer et al., 2007) {Williams, 2005, 15661210} {Erovic, 2005, 16361547} {Michaud, 2009, 19240170} {Jain, 2011, 21169413} (http://clinicaltrials.gov)
BIRC5 (Survivin)	Caspase inhibitor of the IAP family that is often upregulated in response to PI3K signaling. Component of CPC, a complex involved in the regulation of chromosome segregation.	BIRC5 overexpression is associated with chemoresistance and poor prognosis in multiple types of cancer. BIRC5 inhibitors are currently being evaluated in clinical trials.	{Kato, 2001, 11241318} {Nakamura, 2004, 14720326} {Karczmarek-Borowska, 2005, 16382892} {Altieri, 2008, 18075512} {Ryan, 2009, 19559538} (http://clinicaltrials.gov)
Calpains	Non-caspase proteases that participate in the execution of multiple cell death subroutines.	<i>In vitro</i> , galectin-3 inhibition exacerbates CDDP responses by enhancing calpain activation.	{Wang, 2010, 21368866}
Caspases	Mediate the initiator (caspase-9 and -8) and executioner (caspase-3, -6 and -7) phase of apoptosis.	<i>In vitro</i> , acquired resistance to CDDP is linked to modifications in the caspase activation cascade.	{Janson, 2011, 21364680}
MAPKs	Members of the JNK, ERK and SAPK family transmit pro- and/or anti-apoptotic signals in response to CDDP, with a high degree of variability in different experimental settings.	JNK, ERK and SAPK inhibition has been associated with both increased and decreased sensitivity to CDDP, depending on the experimental setting. Conclusive data are missing.	{Persons, 2000, 10958792} {Wang, 2000, 10993883} {Dent, 2001, 11309321} {Yeh, 2002, 11996883} {Mansouri, 2003, 12637505} {Brozovic, 2004, 15386344}
ΔNp63α	TP53 protein family member	<i>In vitro</i> , transduces pro-survival signals in response to CDDP.	{Yuan, 2010, 21364617}
TP53	Tumor suppressive protein that controls DNA repair and apoptosis in response to stress. Also implicated in senescence, autophagy and genomic stability	CDDP-resistant tetraploid cells exhibit an increased transcription of specific TP53 target genes. Tumors harboring wild type TP53 respond better to CDDP-based chemotherapy.	(Peng et al., 1993) (Gadducci et al., 2002) {Castedo, 2006, 16675948} (Vousden and Lane, 2007) (Feldman et al., 2008)
XAF1	Nuclear protein that antagonizes the activity of IAPs, thus acting as a pro-apoptotic factor.	High levels of XAF1 correlate with improved progression-free survival in advanced bladder cancer patients.	{Plenckette, 2007, 17621877} {Pinho, 2009, 18555708}

Tableau 1: mécanismes de résistance en aval de la cible (Galluzzi et al., 2012)

Abbreviations: CDDP, cisplatin; CPC, chromosome passenger complex; ERK, extracellular signal-regulated kinase; IAP, inhibitory apoptosis protein; JNK, c-JUN N-terminal kinase; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; SAPK, stress-activated protein kinase; XAF1 X-linked IAP-associated factor 1.

D. Mécanismes de résistance “off target”

De plus en plus de résultats suggèrent que la résistance au cisplatine peut être générée par des altérations de voies de signalisation qui ne sont pas directement engagées par le cisplatine, mais qui compensent le signal léthal qu'il induit. Nous n'aborderons pas tous les acteurs impliqués dans ce type de résistance, ceux-ci étant mentionnés dans le **tableau 2**. Cependant, nous nous attarderons sur l'un des mécanismes prédominant impliqués dans cette résistance, à savoir l'autophagie.

L'autophagie est un mécanisme très conservé, impliquant la séquestration et la dégradation lysosomale d'une portion cytoplasmique ou d'organites (Kroemer et al., 2010). Il a été montré que dans des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire et de NSCLC, l'acquisition progressive de la résistance au cisplatine se faisait en parallèle d'une augmentation des composants de la voie autophagique (Ren et al., 2010; Yu et al., 2011). Dans le même sens, il a également été montré que l'inhibition de l'autophagie peut restaurer la sensibilité au cisplatine dans plusieurs types de cancer notamment le NSCLC (Circu et al., 2017; Ren et al., 2010; Yuwen et al., 2017), le cancer de l'ovaire (Qiu et al., 2017), le carcinome nasopharyngé (Su et al., 2017), le cancer de la prostate (Zhu et al., 2017a) ou encore le cholangiocarcinome (Qu et al., 2017). Cependant, il a également été montré que le temsirolimus (qui stimule l'autophagie) agit de façon synergique avec le cisplatine pour tuer les cellules de carcinome oropharyngé (Gaur et al., 2011). Cette apparente contradiction reflète l'existence de multiples mécanismes, parfois lignée-dépendants, menant à la résistance au cisplatine.

Factor	Mode-of-action	Relevance	Ref.
Autophagy	Evolutionarily conserved response to multiple stress conditions.	Ovarian and NSCLC cells upregulate autophagy while acquiring CDDP resistance.	(Kroemer et al., 2010) (Ren et al., 2010)
	Often activated in response to chemotherapy.	Autophagy-targeting agents are clinically available.	(Yu et al., 2011)
DYRK1B	Conserved kinase that mediates differentiation in multiple tissues. Overexpressed or hyperactivated in several neoplasms, in which it mediates anti-apoptotic effects.	DYRK1B depletion increases sensitivity to CDDP in vitro by favoring ROS generation.	{Friedman, 2007, 17583556} {Deng, 2009, 19351855} {Gao, 2009, 19633423} {Hu, 2010, 21113238}
ERBB2 (HER-2)	Oncogenic EGFR-like receptor that is overactivated in multiple types of cancer. ERBB2 conveys pro-survival signals via PI3K and MAPK.	Might contribute in a dual fashion to CDDP resistance. ERBB2 overexpression has been associated with CDDP resistance in NSCLC patients.	{Mitsuuchi, 2000, 11034077} {Zhou, 2001, 11231573} {Ikeguchi, 2001, 11712083} {Citri, 2006, 16829981} {Fijolek, 2006, 16847810}
HSPs	Chaperones that exert pro-survival functions in response to a variety of stress conditions. Upregulated in multiple cancers.	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> , HSPs protects cells against CDDP toxicity by several mechanisms. HSP27 expression might predict CDDP chemosensitivity in ESCC patients.	{Yamamoto, 2001, 11403922} {Miyazaki, 2005, 16080521} {Zhang, 2007, 17504983} {Ren, 2008, 18381433}
TMEM205	Hypothetical transmembrane protein.	TMEM205 expression might be associated with CDDP resistance. <i>In vivo</i> data are missing.	{Shen, 2010, 20589834}

Tableau 2: Mécanismes de résistance “off target” (Galluzzi et al., 2012)

Abbreviations: CDDP, cisplatin; DYRK1B, dual-specificity Y-phosphorylation regulated kinase 1B; EGFR, epidermal growth factor receptor; ESCC, esophageal squamous cell carcinoma; HSPs, heat-shock proteins; NSCLC, non-small cell lung cancer; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; ROS, reactive oxygen species.

Ainsi, nous avons vu que les modalités de résistance au cisplatine peuvent être multiples, et faire intervenir de nombreux acteurs aux différentes étapes du mécanisme d'action du cisplatine. Récemment, l'étude de la cancérogénèse et des mécanismes de chimiorésistance a impliqué l'étude d'un autre champs d'investigation : le métabolisme des cellules cancéreuses. Nous allons étudier dans cette seconde partie, les spécificités métaboliques des cellules cancéreuses. Nous accorderons une place importante à l'étude du rôle de la glutamine dans le métabolisme des cellules cancéreuses, car les recherches effectuées durant ma thèse se sont portées principalement sur le rôle de la glutamine dans la survie de cellules résistantes au cisplatine. De ce fait, afin de comprendre comment la glutamine assure la survie de ces cellules, il est important d'avoir une vision d'ensemble des altérations métaboliques présentes dans les cancers, et du rôle prépondérant de la glutamine spécifiquement dans ces voies métaboliques.

II. Métabolisme et cancer: le rôle central de la glutamine

1) Métabolisme altéré des cancers: ré-émergence d'une idée ancienne

Alors que les premières caractérisations du métabolisme altéré des tumeurs datent de près de cent ans, ce domaine a connu un nouvel essor depuis ces dix dernières années.

Grâce aux nouvelles techniques de biochimie et biologie moléculaire, de récentes études ont permis de préciser les mécanismes et les conséquences fonctionnelles des altérations métaboliques associées aux tumeurs, et d'en définir six caractéristiques principales (Pavlova and Thompson, 2016): (1) la dérégulation de l'influx de glucose et d'acides aminés, (2) l'utilisation de moyens opportunistes pour l'acquisition de nutriments, (3) l'utilisation d'intermédiaires de la glycolyse et du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) pour les biosynthèses et la production de NADPH, (4) une demande accrue en azote, (5) des altérations des gènes régulant le métabolisme, (6) des interactions métaboliques avec le micro-environnement.

Dans cette seconde partie de l'introduction, nous aborderons les altérations métaboliques principales exhibées par les cellules cancéreuses, en développant plus particulièrement les altérations liées au métabolisme de la glutamine, car elles jouent un rôle essentiel dans la tumorigénèse, et qu'elles sont directement liées aux caractéristiques sus-citées par Pavlova et al.

2) Glutamine, glucose et cancer: histoire d'une dépendance avérée

Afin de répondre aux forts besoins en biosynthèses associés à une prolifération rapide, les cellules cancéreuses doivent augmenter l'import de nutriments depuis leur environnement. Deux principaux éléments sont essentiels aux biosynthèses et à la survie des cellules de mammifères: le glucose et la glutamine. Grâce au catabolisme du glucose et de la glutamine, la cellule peut maintenir son pool d'intermédiaires contenant du carbone, qui seront utilisés comme blocs élémentaires pour l'assemblage de macromolécules diverses. En outre, l'oxydation des squelettes carbonés du glucose et de la glutamine permet à la cellule de capter leur pouvoir réducteur, soit sous forme de NADH, H⁺ ou FADH₂ qui serviront au transport des électrons permettant la synthèse d'ATP, soit sous forme de NADPH, H⁺, qui fournira le pouvoir réducteur nécessaire à une multitude de réactions de biosynthèse.

L'augmentation de la consommation en glucose par les tumeurs, en comparaison à d'autres tissus, sains et non prolifératifs, a été décrite il y a plus de 90 ans par Otto Warburg (Warburg et

Negelein, 1924 ; Warburg, 1927). Cette observation a été confirmée dans une multitude de contextes tumoraux, et corrèle avec un mauvais pronostic (Som et al., 1980).

La glutamine est l'acide aminé circulant le plus abondant du corps humain, représentant plus de 20% des acides aminés libres du sang, et 40% de ceux du muscle (Bergstrom et al., 1974). C'est un acide aminé non essentiel, apporté en partie par l'alimentation, et également synthétisé *de novo* grâce à l'action de la glutamine synthétase, qui combine le glutamate et l'ammoniac (Medina et al., 1992). La glutamine existe sous forme libre circulante dans le sang, et sous forme de stockage, principalement dans les muscles squelettiques, et en faibles proportions dans les poumons, le cerveau et les tissus adipeux (Newsholme et al., 2003). Elle est maintenue à un niveau constant dans la circulation, en raison de sa synthèse *de novo*, et de sa libération par les organes de stockage (Felig et al., 1973; Hensley et al., 2013; Stumvoll et al., 1999). La glutamine revêt des multiples fonctions: (a) physiologiquement, la glutamine est utilisée par l'intestin grêle et les cellules épithéliales rénales pour la balance acido-basique (Brosnan, 2003); (b) en outre, elle sert de véhicule pour le transport de l'ammoniac sous une forme non toxique, depuis les tissus périphériques, vers les organes viscéraux, où il est excrété sous forme d'ammonium dans l'urine, et d'urée dans le foie (Edson and Krebs, 1936). (c) Enfin, la glutamine est un important fournisseur d'azote et de carbone. Dans les cellules à divisions rapides, telles que les lymphocytes, les entérocytes mais aussi les cellules cancéreuses, la glutamine est consommée massivement comme source de carbone et d'azote nécessaires aux biosynthèses, ainsi que pour la synthèse d'énergie.

La forte demande en glutamine des cellules tumorales a été abordée pour la première fois dans les années cinquante par Eagle (Eagle, 1955), qui a montré que le milieu de culture optimal pour les cellules HeLa contenait 10 à 100 fois plus de glutamine en comparaison aux autres acides aminés. Trente ans plus tard, Reitzer et al. montraient que la glutamine, et non le glucose, était la source d'énergie majeure utilisée par les cellules HeLa (Reitzer et al., 1979). En outre, la glutamine est l'acide aminé le plus rapidement consommé par des carcinomes et hépatomes *in vivo* (Marquez et al., 1989; Sauer et al., 1982). D'une manière générale, la plupart des cancers sont de gros consommateurs de glutamine (Mashimo et al., 2014), ce qui induit, dans divers types de cancers, un appauvrissement de l'environnement tumoral en glutamine, en comparaison à l'environnement tissulaire sain équivalent (Marquez et al., 1989; Rivera et al., 1988; Roberts et al., 1956; Yuneva et al., 2007). Il a d'ailleurs été démontré que de nombreuses lignées cancéreuses sont dépendantes de la glutamine pour leur croissance et leur survie ; c'est

notamment le cas de lignées de myélome (Bolzoni et al., 2016), de très nombreuses lignées de NSCLC (van den Heuvel et al., 2012), ou encore de cellules de glioblastome (Wise et al., 2008). Il est alors aisément de comprendre que pour répondre à ces besoins accrus en glutamine, les cellules cancéreuses ont développé des mécanismes pour augmenter leur approvisionnement, comme nous allons le voir.

A. Stratégies pour l'augmentation de l'import de glutamine et glucose

A.1. Les altérations oncogéniques à l'origine de l'import exacerbé de glucose et glutamine

Les altérations oncogéniques affectant l'import de glucose

Dans les cellules saines, les imports de nutriments sont en grande partie régulés par les facteurs de croissance (Thompson, 2011), quelle que soit la richesse du plasma ou du milieu extracellulaire. Ainsi, lorsque des cellules hématopoïétiques ou des neurones sont privés de facteurs de croissance, leur import en glucose est si faible qu'il ne leur permet même pas de maintenir un bon fonctionnement bioénergétique, si bien que la synthèse d'ATP, le potentiel mitochondrial et la taille des cellules sont négativement affectés, et ce, malgré l'abondance de glucose dans le milieu de culture (Lindsten et al., 2003; Rathmell et al., 2000). Dans ce même contexte de privation, l'induction expérimentale de l'expression du transporteur membranaire de glucose GLUT1 (Glucose Transporter 1, GLUT1) et de l'hexokinase, permet la survie des cellules (Rathmell et al., 2003). Cependant, il est à noter que, même si dans les cellules de mammifères, la prise de glucose est régulée de manière prédominante par les facteurs de croissance, elle peut également être secondairement modulée par des senseurs cellulaires intrinsèques tels que l'AMPk (Thompson et al., 2017). En outre HIF1-alpha, facteur induit par l'hypoxie d'une part (Thompson et al., 2017), et le détachement de la matrice extracellulaire d'autre part, sont également des éléments qui modulent la prise cellulaire de glucose (Grassian et al., 2011).

On peut en conclure qu'en conditions physiologiques, d'une manière générale, l'import de glucose dans les cellules est plutôt dicté par des stimuli extracellulaires que par les besoins bioénergétiques des cellules.

Contrairement aux cellules saines, les cellules cancéreuses accumulent des altérations oncogéniques leur permettant d'assurer leur survie et leur prolifération avec un certain degré d'indépendance vis à vis des stimuli extracellulaires (Hanahan and Weinberg, 2000) (**Figure 4**).

En particulier, des altérations touchant la voie PI3 Kinase/Akt ainsi que ses régulateurs négatifs PTEN (phosphatase and tensin homolog) et INPP4B (inositol polyphosphate-4-phosphatase type II B), et des mutations activatrices ou des amplifications de gènes touchant les récepteurs tyrosine-kinase induisent un métabolisme et un import de glucose constitutifs. Plus précisément, la signalisation de la voie PI3K/Akt favorise l'expression du transporteur de glucose GLUT1 (Barthel et al., 1999; Wieman et al., 2007). Dans le même sens, en imagerie PET-scan, l'intensité du signal du ¹⁸F-fluorodésoxyglucose dans les tumeurs corrèle avec le niveau d'activité de la voie PI3K/Akt, et peut être atténuée par l'utilisation d'inhibiteurs de la voie PI3K.

En outre, Akt potentialise d'une part l'activité de l'hexokinase (HK), enzyme phosphorylant le glucose en glucose-6-phosphate afin de prévenir l'efflux du glucose, et d'autre part la phosphofructokinase (PFK), enzyme qui catalyse une étape irréversible de la glycolyse, et ce, en l'absence de facteurs extrinsèques (Deprez et al., 1997; Gottlob et al., 2001; Rathmell et al., 2003).

D'autres voies oncogéniques, notamment la voie comportant RAS augmentent l'expression de GLUT1 et la consommation intracellulaire de glucose (Murakami et al., 1992).

Les altérations oncogéniques affectant l'import de glutamine

La glutamine est le second substrat, essentiel pour la croissance des cellules. Elle fournit le carbone et l'azote nécessaires aux biosynthèses *de novo*. Elle fournit notamment l'azote indispensable à la synthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques, à la glucosamine-6-phosphate, et aux acides aminés non essentiels. En outre, grâce à l'antiport membranaire LAT1 (un hétérodimère du solute carrier family 3 member 2 (SLC3A2) et du solute carrier family 7 member 5 (SLC7A5)), l'import de leucine, acide aminé essentiel, est possible grâce à l'export de glutamine. En outre, cet export permettrait l'influx de bon nombre d'acides aminés essentiels, LAT1 transportant également l'isoleucine, valine, méthionine, tyrosine, tryptophane, et phénylalanine (Nicklin et al., 2009; Yanagida et al., 2001; Zhao et al., 2015).

Le facteur de transcription c-myc, surexprimé dans les cellules prolifératives et amplifié dans de nombreux cancers, induit la transcription des transporteurs importateurs de glutamine tels que ASCT2 (aussi connu sous le nom de SLC1A5) et SN2 (transporteur qui couple l'import de glutamine et de sodium à l'export de protons) (Nakanishi et al., 2001; Wise et al., 2008) (**Figure 4**). En outre, c-myc favorise également l'expression des enzymes du métabolisme de la glutamine telles que la glutaminase GLS1 (qui catalyse la transformation de glutamine en glutamate), la phosphoribosyl pyrophosphate synthétase PRPS2 (enzyme jouant un rôle central

dans la synthèse des purines et des pyrimidines, en catalysant la synthèse du 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate, PRPP), et l'enzyme trifonctionnelle CAD qui combine la carbamoyl-phosphate synthétase 2, (qui synthétise le carbamoyl-phosphate dans la voie de synthèse des pyrimidines), l'aspartate transcarbamylase, et la dihydroorotate (Eberhardy and Farnham, 2001; Gao et al., 2009; Mannava et al., 2008). Une récente étude réalisée au sein d'une cohorte de 90 patients atteints de cancer du sein triple négatif a d'ailleurs montré qu'une hausse de l'expression de Myc était corrélée avec une surexpression de ASCT2 et de la GLS1, et que cette association était de mauvais pronostic (van Geldermalsen et al., 2016).

En induisant l'utilisation de la glutamine par ces enzymes et sa transformation en glutamate, c-myc entraîne ainsi l'augmentation de son import. Le glutamate résultant ne peut plus ressortir de la cellule par les modalités de transport propres à la glutamine, et s'accumule, entraînant l'anaplérose via le cycle du TCA, et stimule également l'influx de cystéine en agissant comme monnaie d'échange pour l'antiport cystéine-glutamate xCT (Conrad and Sato, 2012).

La protéine du rétinoblastome (pRB), suppresseur de tumeur, est connue pour réguler négativement l'entrée de la glutamine dans la cellule et son métabolisme. En effet, la délétion de protéines de la famille Rb entraîne la surexpression de ASCT2, ainsi que celle de la GLS1, et ceci, dépendamment du facteur de transcription E2F (Reynolds et al., 2014).

Ainsi, c-myc et E2F, deux intervenants clés pour la division cellulaire, exercent en partie leurs effets via l'accès et l'utilisation de la glutamine par les cellules.

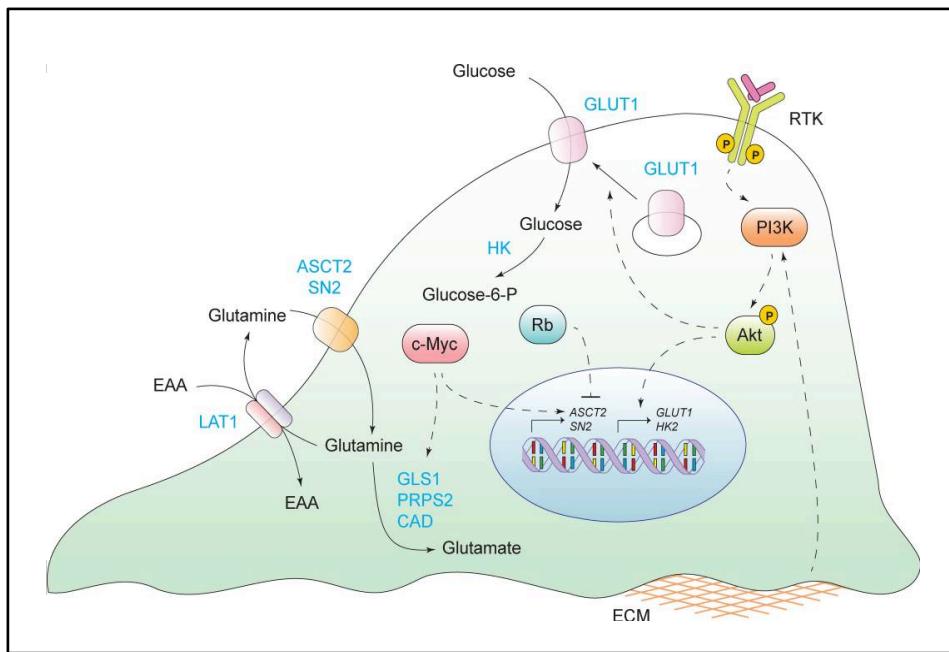


Figure 4: Dérégulation de l'import de glucose et glutamine au sein des cellules cancéreuses (Pavlova et al., 2016).

L'activation des oncogènes et la perte des suppresseurs de tumeurs dérégulent l'import de glucose et glutamine au sein des cellules cancéreuses. Les flèches pleines représentent le mouvement des métabolites ou des protéines et le sens des réactions métaboliques. Les flèches en pointillé représentent les effets régulateurs positifs et négatifs des composants des voies de transduction du signal. RTK, récepteur tyrosine kinase; GLUT1, transporteur 1 du glucose; ASCT2/SN2, transporteurs de glutamine; LAT1, transporteur d'acides aminés neutres; EAA, acides aminés essentiels; GLS1, glutaminase 1; PRPS2, phosphoribosyl pyrophosphate synthétase 2; CAD, carbamoyl-phosphate synthétase; HK, hexokinase; ECM, matrice extra-cellulaire.

A.2. Utilisation de voies alternatives pour l'import d'acides aminés; macropinocytose entosis et macro-autophagie

Les cellules tumorales, très demandeuses en acides aminés, et notamment en glutamine, ont développé des voies alternatives afin d'augmenter leur accès à ces briques élémentaires nécessaires à leurs biosynthèses. Ces méthodes alternatives sont au nombre de trois : la macropinocytose, l'entosis et la macro-autophagie (**Figure 5**).

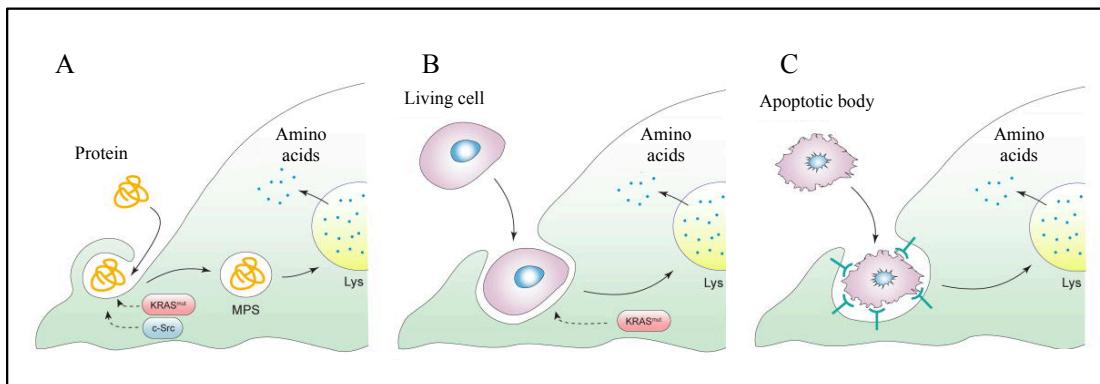


Figure 5: Utilisation de modalités opportunistes pour l'acquisition des acides aminés (Pavlova et al., 2016).

Lorsque des acides aminés libres sont indisponibles dans leur milieu environnant, les cellules cancéreuses se fournissent en acides aminés via (A) la macropinocytose de protéines extracellulaires; (B) l'entosis de cellules vivantes; (C) la phagocytose de corps apoptotiques. Les flèches pleines représentent le mouvement des protéines, acides aminés ou vésicules. Les flèches en pointillé représentent les effets régulateurs des composants des voies de transduction du signal. MPS, macropinosome; Lys, lysosome.

La macropinocytose. Les cellules tumorales se retrouvent fréquemment dans des environnements appauvris en nutriments. Ceci s'explique d'une part par leur forte consommation en glucose et acides aminés, qui aboutit à un appauvrissement de leur milieu environnant, et d'autre part par l'insuffisance de vascularisation au sein des tumeurs. Pour faire face aux fortes demandes de précurseurs anaboliques, certaines cellules cancéreuses ont développé des modes de nutrition alternatifs et opportunistes pour obtenir les nutriments nécessaires à leur forte prolifération. Par exemple, en situation normale, les protéines extracellulaires, abondantes dans le plasma et le liquide interstitiel des tissus, ne sont pas considérées comme des sources d'acides aminés. Cependant, en situation de manque en nutriments et notamment en glutamine au sein d'une tumeur, il a été démontré que les protéines extracellulaires peuvent être internalisées par macropinocytose, un processus impliquant l'« engloutissement » non sélectif de liquide extracellulaire, formant ainsi de grandes vésicules, les macropinosomes (Kerr and Teasdale, 2009). Une fois englouties, les macromolécules et protéines sont digérées par des protéases lysosomales permettant ainsi la mise à disposition d'acides aminés. Ce phénomène de macropinocytose a été décrit dans des cellules normales stimulées par des facteurs croissance, mais il est notablement augmenté par la signalisation de la voie Ras (Bar-Sagi and Feramisco, 1986). Ainsi, il a été montré que l'incubation cellules mutantes pour KRAS (Kirsten rat sarcoma viral proto-oncogène) avec des protéines solubles marquées au ^{13}C et de faibles concentrations de glutamine, permettait l'obtention d'acides aminés libres marqués, essentiels et non essentiels et notamment la glutamine, ainsi que des intermédiaires du cycle du TCA marqués, indiquant la

synthèse *de novo* de glutamine pour l’alimentation du cycle du TCA (Commisso et al., 2013). Ainsi dans cette étude, l’adjonction d’albumine soluble au milieu de culture, en condition de restriction en glutamine, était suffisante pour induire la prolifération des cellules mutantes pour KRAS. En outre, le traitement par un inhibiteur de macropinocytose, le 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA), s’est révélé être suffisant pour diminuer la croissance tumorale, indiquant ici un rôle primordial de la macropinocytose pour l’approvisionnement en acides aminés *in vivo*.

L’entosis et phagocytose de corps apoptotiques. L’engloutissement et la digestion de cellules entières et vivantes peuvent aussi être utilisées comme mode de récupération d’acides aminés. Ainsi, la croissance de cellules épithéliales mammaires MCF10A en l’absence d’acides aminés peut être maintenue grâce à l’ingestion de cellules vivantes par entosis, et ce processus peut être réversé par blocage de la digestion lysosomale (Krajcovic et al., 2013). Ainsi,似ilairement à la macropinocytose, le cargo englouti est digéré dans les lysosomes, permettant l’apport d’acides aminés nécessaires à la survie et à la prolifération. Dans cette même étude, des effets similaires ont été obtenus dans des macrophages ingérant des corps apoptotiques (Krajcovic et al., 2013; Stolzing and Grune, 2004). De façon intéressante, les cellules mutantes pour KRAS présentent une propension plus importante à engloutir leurs voisines qu’être consommées elles-mêmes par entosis. Ceci représente donc un exemple de compétition entre cellules au sein des tumeurs, aboutissant à l’émergence d’une population cellulaire plus agressive.

L’auto-catabolisme par macro-autophagie. Même en l’absence de nutriments extracellulaires disponibles, les cellules tumorales peuvent utiliser des voies métaboliques alternatives pour assurer leur survie. En particulier, elles peuvent faire face à de longues périodes de privation nutritionnelle, et notamment de privation en acides aminés, en utilisant la macro-autophagie (Boya et al., 2013). Lors de ce processus, des macromolécules intracellulaires ainsi que des organelles dans leur globalité sont enveloppées par une double membrane avant de fusionner avec un lysosome. S’ensuit une dégradation protéases- et lipases-dépendante, aboutissant à la libération d’acides gras et d’acides aminés libres. Ce mode d’auto-nutrition permet à des cellules de maintenir leur survie pendant des semaines, alors qu’elles sont cultivées dans des milieux de privation nutritionnelle, dépourvus de facteurs de croissance (Lum et al., 2005). Ce mode de nutrition, contrairement à la macro-pinocytose et à l’entosis, peut uniquement maintenir les cellules en vie, mais ne peut pas leur fournir de la nouvelle biomasse, rendant ainsi la prolifération en conditions de privation nutritionnelle impossible par cette voie.

L'autophagie revêt d'autres rôles au sein des cellules cancéreuses, qui seront abordés ci-après, dans le paragraphe « II.3.G Glutamine et autophagie dans les cellules cancéreuses ». Nous aborderons plus précisément dans ce paragraphe les mécanismes moléculaires de régulation de l'autophagie par la glutamine.

B. De l'augmentation des imports en glutamine et glucose aux applications cliniques

L'avidité des tumeurs pour le glucose a été utilisée afin de développer des techniques d'imagerie pour le diagnostic et la délimitation des tumeurs. Ainsi, le PET-scan (Positron Emission Tomography), qui se base sur l'influx d'un analogue radioactif du glucose (^{18}F -fluorodeoxyglucose) permet de visualiser l'emplacement des tumeurs, et de suivre la réponse au traitement (Almuhaideb et al., 2011).

L'influx exacerbé de glutamine a permis lui aussi le développement de techniques d'imagerie permettant de visualiser les tumeurs. Ainsi, l'utilisation d'un analogue radioactif de la glutamine (^{18}F -fluoroglutamine) s'est montré prometteuse dans de récentes études précliniques et cliniques (Lieberman et al., 2011; Venneti et al., 2015), en particulier pour des localisations de fortes consommations de glucose, comme le cerveau, où l'utilisation de ^{18}F -fluorodeoxyglucose est inefficace en raison d'un trop fort bruit de fond. L'imagerie à base de ^{18}F -fluoroglutamine serait particulièrement recommandée dans le diagnostic et le suivi des gliomes (Venneti et al., 2015).

3) Des altérations métaboliques au service des biosynthèses

A. L'effet Warburg

A.1. La synthèse d'ATP via le cycle du TCA relayée au second plan

Dans une cellule quiescente, le glucose est principalement utilisé pour la synthèse d'acétyl-CoA au niveau mitochondrial, qui entre ensuite dans le cycle de Krebs ou cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) (Figure 6A). Les électrons extraits des réactions d'oxydation ayant lieu dans le cycle du TCA sont acheminés vers la chaîne de transport des électrons (via le NADH et le FADH_2) créant un gradient électrochimique qui permet la synthèse d'ATP. Dans une cellule en prolifération intense, telle qu'une cellule cancéreuse, cette gestion des ressources en carbone diffère de celle d'une cellule quiescente (Vander Heiden et al., 2009). Dans ce contexte, le

carbone réduit est principalement consacré à la biosynthèse de diverses molécules indispensables au bon fonctionnement de la cellule, notamment les acides gras, le cholestérol, les pentoses et hexoses, les nucléotides et les acides aminés non essentiels, pour ne citer qu'eux (**Figure 6A**). Pour aboutir à la synthèse de ces diverses molécules, les cellules prolifératives doivent d'abord orienter leur métabolisme vers la synthèse d'intermédiaires structurels, et de pouvoir réducteur, sous forme de NADPH. Les intermédiaires structurels sont notamment l'acétyl-CoA cytosolique, les molécules à un carbone du cycle du folate et la S-adenylmethionine (SAM) ainsi qu'un bon nombre d'intermédiaires de la glycolyse et du cycle du TCA.

Warburg a été le premier à montrer, à l'aide de coupes tumorales incubées avec du glucose *ex vivo*, qu'en dépit d'une consommation accrue en glucose, et une exposition à l'oxygène de l'air ambiant, les cellules cancéreuses privilégiaient la synthèse d'ATP via la glycolyse à elle seule, et non le cycle du TCA couplé à la chaîne respiratoire. Cultivées en milieu riche en glucose, les cellules cancéreuses convertissent plutôt le surplus de pyruvate en lactate, sécrété ensuite dans le milieu extracellulaire (Warburg, 1956). Ces observations ont d'abord été interprétées comme une incapacité des cellules cancéreuses à produire de l'ATP efficacement via la voie mitochondriale. Cependant, des investigations ultérieures ont montré que les cellules tumorales possédaient des mitochondries fonctionnelles, et qu'elles étaient capables de faire de la phosphorylation oxydative. Plus tard, la conversion préférentielle du glucose en lactate a également été mise en évidence dans des cellules prolifératives non cancéreuses, ainsi que dans des cellules infectées par des virus (Brand et al., 1986; Chambers et al., 2010; Noch and Khalili, 2012). Tous ces éléments laissent à penser que, contrairement à l'idée initiale, l'effet Warburg serait plutôt une adaptation procurant un bénéfice aux cellules en division, plutôt qu'une adaptation à un défaut de respiration.

Alors pourquoi les cellules en prolifération convertissent-elles l'excès de pyruvate en lactate plutôt que de l'adresser vers la mitochondrie pour alimenter le cycle du TCA ?

Il faut savoir que les cellules prolifératives ne montrent qu'une légère augmentation de leur consommation en ATP, contre une forte augmentation de leurs besoins en intermédiaires structurels sus-cités et en NADPH. La glycolyse permet de fournir une grande partie de ces intermédiaires ainsi que du pouvoir réducteur, alors que le cycle du TCA, bien que fournisseur d'intermédiaires structurels lui aussi, génère aussi du NADH et de l'ATP en grandes quantités, qui sont des régulateurs négatifs du métabolisme du glucose. Ainsi, en convertissant l'excès de pyruvate en lactate, les cellules prolifératives empêchent l'accumulation de NADH cytosolique

et réduisent la production d'ATP, permettant le métabolisme du glucose en continu, et donc les biosynthèses qui lui sont liées, sans répression due à un rétrocontrôle négatif (Pavlova and Thompson, 2016). L'effet Warburg apparaît ainsi plus comme un état métabolique d'adaptation, qui s'avère être bénéfique durant une période d'augmentation des demandes en biosynthèses.

A.2. Effet Warburg: la synthèse exacerbée d'intermédiaires glycolytiques

Dans les cellules cancéreuses présentant un effet Warburg important, le découplage de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative permet la synthèse de nombreux intermédiaires glycolytiques qui sont des précurseurs biosynthétiques (**Figure 6B**). Nous allons voir que ces voies de biosynthèses sont régulées par des oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, eux-mêmes dérégulés dans les cancers.

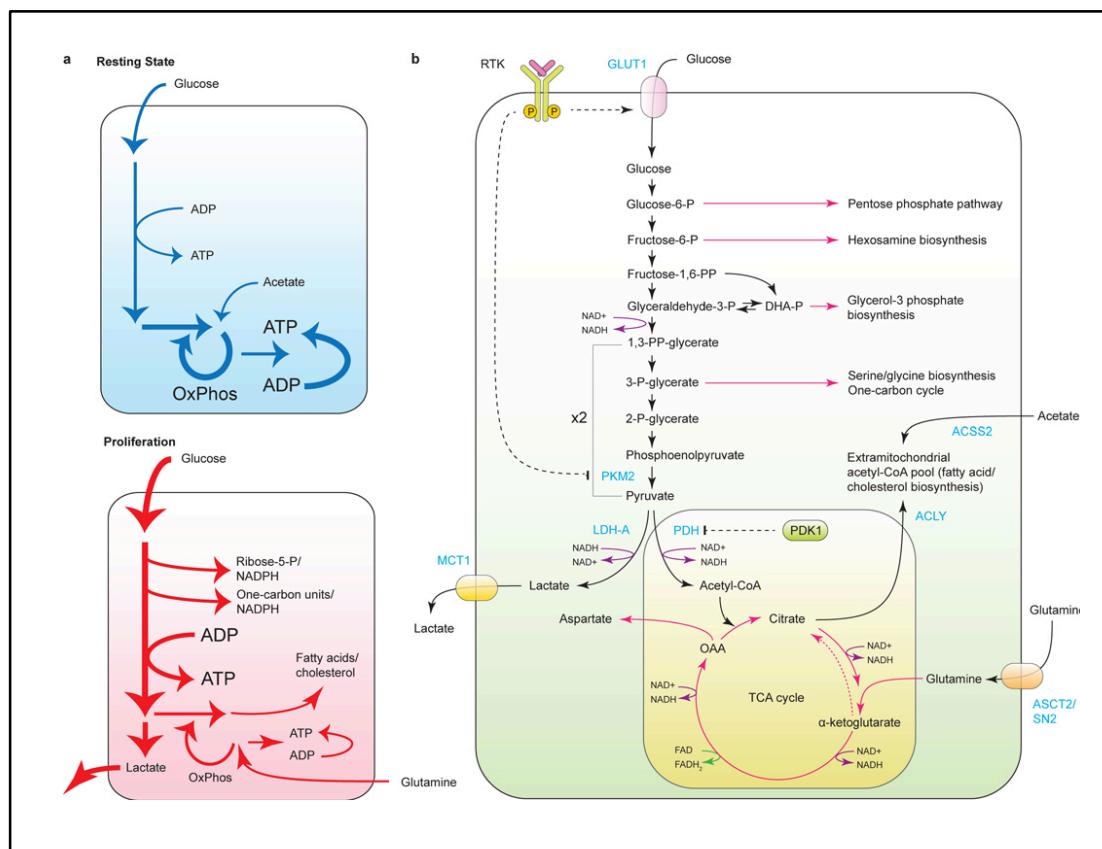


Figure 6: Utilisation des intermédiaires de la glycolyse et du cycle du TCA pour les biosynthèses et la production de NADH, H⁺ (Pavlova et al., 2016).

(A) Différences concernant le métabolisme du carbone, entre une cellule quiescente et une cellule en prolifération.
 (B) Les différentes voies de biosynthèse à partir du métabolisme du carbone. RTK, récepteur tyrosine kinase; GLUT1, transporteur du glucose 1; PKM2, pyruvate kinase 2; ACSS2, acetyl-CoA synthétase 2; LDH-A, lactate déshydrogénase A; PDH, pyruvate déshydrogénase; PDK1, pyruvate déshydrogénase kinase 1; ACLY, ATP-citrate lyase; MCT1, monocarboxylate transporteur 1; ASCT2/SN2, transporteurs de glutamine.

La voie des pentoses phosphate (PPP). Dans cette voie, le glucose-6-phosphate devient partiellement oxydé pour former du NADPH, H⁺ et du ribose-5-phosphate, un composant structurel des nucléotides. L'utilisation de la voie des PPP est fréquemment augmentée dans la tumorigénèse. Ainsi, les enzymes clés de cette voie, la transcétolase-like 1 (TKTL1) et la transaldolase (TALDO) sont souvent surexprimées dans les cancers (Wang et al., 2011; Xu et al., 2009). Il a été montré que les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs étaient impliqués dans la régulation de la voie des PPP. Par exemple, l'oncogène du sarcome viral RAS qui induit une augmentation de la transcription d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du ribose-5-phosphate (Ying et al., 2012). Par ailleurs, les mutants p53 n'ont plus la capacité d'inactiver la voie des PPP par liaison directe de p53 à la glucose-6-phosphate deshydrogenase (G6PD) (Jiang et al., 2011).

La biosynthèse des hexosamines. Le fructose-6-phosphate, qui suit le glucose-6-phosphate dans la glycolyse, peut également quitter cette voie pour être utilisé comme substrat pour la voie de biosynthèse des hexosamines. La glutamine joue un rôle dans cette voie. En effet, la première étape de cette voie, catalysée par la glutamine fructose-6-phosphate aminotransferase 1 (GFPT1), permet la production de glucosamine-6-phosphate à partir du fructose-6-phosphate et de glutamine. Grâce à la synthèse, *in fine*, de N-acetylglucosamine (GlcNac), un substrat pour les N- et O-glycosylations, la voie des hexosamines fournit les substrats nécessaires à la fois pour les réactions de glycosylation, mais également pour la synthèse de sulfate d'héparane et d'acide hyaluronique. De façon intéressante, les N- et O-glycosylations, qui sont impliquées dans la régulation de la stabilité de différentes protéines, jouent notamment un rôle dans la stabilité de c-myc (Itkonen et al., 2016; Itkonen et al., 2013).

La biosynthèse des phospholipides. L'intermédiaire suivant de la glycolyse utilisé dans les synthèses macromoléculaires est le dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Il est converti par la glycerol-3-phosphate deshydrogenase 1 (GPD1) en glycérol-3-phosphate, qui participe à la biosynthèse de divers phospholipides composant les membranes cellulaires.

L'utilisation du 3-phosphoglycéate. Le 3-phosphoglycéate, en aval dans la réaction glycolytique, peut être utilisé comme précurseur pour la biosynthèse de sérine et de glycine, ainsi que pour générer des groupes donneurs de méthyl et du NADPH. En outre, il est intéressant de souligner que l'enzyme 3-phosphoglycerate deshydrogenase (PHGDH) est fréquemment

amplifiée dans les cancers du sein et les mélanomes (Locasale et al., 2011; Possemato et al., 2011).

Afin de réguler la part de synthèse d'intermédiaires glycolytiques dédiés aux biosynthèses par rapport à la synthèse de pyruvate destiné à être utilisé dans le cycle du TCA, les cellules prolifératives ont développé des mécanismes pour contrôler la dernière étape de la glycolyse. Cette étape est régulée par la pyruvate kinase (PK), l'enzyme convertissant le phosphoenolpyruvate en pyruvate. Il existe trois isoformes de cette enzyme ; la première isoforme est spécifique du foie (Pyruvate kinase liver, PKL) ; la seconde, est spécifique du rein (Pyruvate kinase kidney, PKR), et tous les autres tissus expriment la troisième isoforme, dénommée PKM (Pyruvate kinase muscle, PKM). La PKM existe sous deux formes variantes d'épissage, PKM1 et PKM2 (Noguchi et al., 1986). Alors que PKM1 produit plus efficacement du pyruvate, la majorité des cellules prolifératives, et surtout les cellules cancéreuses, expriment la PKM2 (Christofk et al., 2008a; Shiroki et al., 2017). Contrairement à PKM1, l'activité de PKM2 est hautement régulée. Elle est inhibée par la phosphorylation des tyrosines et activée par la sérine (Chaneton et al., 2012; Christofk et al., 2008b; Ye et al., 2012) et le fructose-1,6-bisphosphate. De cette façon, la transduction du signal dépendante des facteurs de croissance inhibe PKM2, ce qui mène à l'accumulation des intermédiaires glycolytiques jusqu'à ce qu'il y ait assez de sérine pour activer PKM2. En outre, la suppression de PKM2 et son remplacement par PKM1 expérimentalement induisent la réversion de l'effet Warburg (Christofk et al., 2008a) et la simple réintroduction de l'isoforme PKM1 compromet la prolifération des cellules cancéreuses, ainsi que la tumorigénèse *in vivo* (Ye et al., 2012).

Ainsi, dans le cas des cellules cancéreuses, la glycolyse serait plutôt considérée telle une chaîne de production versatile d'intermédiaires métaboliques pour de nombreuses voies de biosynthèse particulièrement sollicitées lors de la prolifération.

B. Glutamine et synthèse d'ATP via le cycle du TCA

Après son entrée dans la cellule, la glutamine peut subir différents devenirs. Elle peut être convertie par les glutaminases mitochondrielles (GLS) en ion ammonium et en glutamate. Ensuite, le glutamate peut-être catabolisé de deux manières différentes pour donner de l' α -cétoglutarate, qui pourra, lui, entrer dans le cycle du TCA. Comme l'a décrit Lehninger (Moreadith and Lehninger, 1984), le glutamate peut être converti en α -cétoglutarate, soit par la glutamate déshydrogénase (GLUD), soit par différentes aminotransférases. L' α -cétoglutarate peut ainsi entrer dans le cycle du TCA afin de générer du pouvoir réducteur, pouvant servir *in*

fine à la synthèse d'ATP (**Figure 7**). Mais est-ce vraiment là le rôle principal de la glutamine en tant que donneur de carbone pour le cycle du TCA ?

Nous avons vu jusqu'à présent qu'en présence de glucose, les cellules cancéreuses privilégieraient plutôt la glycolyse pour la synthèse d'ATP (et non la glycolyse couplée au cycle du TCA et à la phosphorylation oxydative). En ce sens, une étude menée par Javesghani et al. a montré la chose suivante : en présence de glucose en fort excès, le fait d'inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire avec la metformine n'aboutit pas à une altération notable du niveau d'ATP intracellulaire, indiquant que les cellules synthétisent assez d'ATP via la glycolyse (Javesghani et al., 2012). Par contre, en présence de glutamine et en absence de glucose, le traitement à la metformine induit une diminution de 75% de l'ATP intracellulaire et une diminution de 80% du nombre de cellules, montrant ainsi que dans ce cas, c'est le cycle du TCA qui est utilisé pour produire l'ATP à partir de la glutamine. Cette voie est donc privilégiée pour la synthèse d'ATP au sein de cellules cancéreuses ou transformées, mais spécifiquement en conditions de privation en glucose par exemple. De façon intéressante, cette étude montre également qu'au sein de lignées présentant une surexpression de myc, impliquant une addiction à la glutamine, les effets antiprolifératifs de la metformine sont exacerbés. Parallèlement, une étude menée par Weinberg et al. a montré que la glutamine pouvait augmenter la consommation en oxygène et la production d'ATP dans des mutants KRAS afin de promouvoir la tumorigénèse (Weinberg et al., 2010). Une autre étude réalisée par Fan et al. a montré que des cellules épithéliales de rein transformées après activation de Kras et Akt présentaient une production de NADH et FADH₂ due au métabolisme de la glutamine exacerbée (60%) et une production de ces mêmes équivalents réducteurs due au glucose diminuée (30%) (Fan et al., 2013a). Enfin, il est important de noter que la GLUD est régulée de façon allostérique notamment par l'ADP et inactivée par le GTP. Cela suggère qu'un niveau énergétique bas peut induire l'activation de la GLUD via l'ADP afin d'augmenter la production en ATP.

Ainsi, ces données suggèrent que, dans les cellules cancéreuses, la glutamine peut être utilisée à des fins de production énergétique, mais que l'implication de la glutamine dans la production d'ATP en présence de glucose dépend probablement du contexte et des altérations génétiques (myc, kras) présentes dans les cellules cancéreuses. Cependant, le cycle du TCA, alimenté par la glutamine, est surtout utilisé dans les cellules cancéreuses, pour la production d'intermédiaires de biosynthèses, indispensables aux cellules prolifératives, comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants

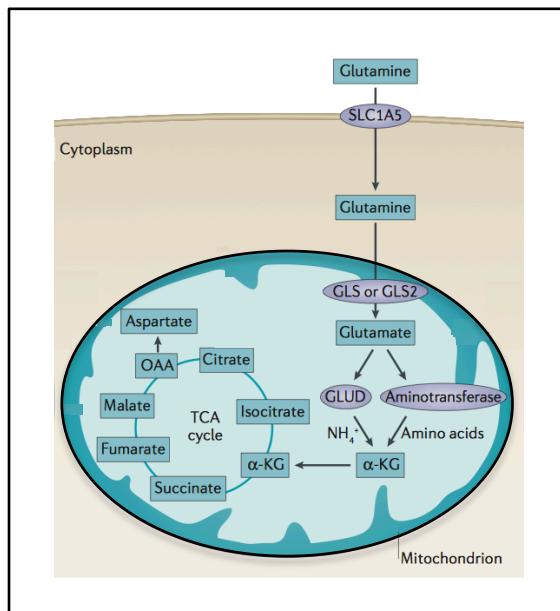


Figure 7: La glutamine peut participer à la synthèse d'ATP via son entrée dans le cycle du TCA (modifié, d'après Altman et al., Nature, 2016).

Après son entrée dans la cellule, la glutamine peut être convertie par les glutaminases mitochondrielles (GLS) en ion ammonium et en glutamate. Ensuite, le glutamate peut-être catabolisé de deux manières différentes pour donner de l' α -cétoglutarate (α -KG), qui pourra, lui, entrer dans le TCA. Comme l'a décrit Lehninger (Moreadith and Lehninger, 1984), le glutamate peut être converti en α -kétoglutarate, soit par la glutamate déshydrogénase (GLUD), soit pas différentes aminotransférases. L' α -cétoglutarate peut ainsi entrer dans le TCA afin de générer du pouvoir réducteur, pouvant servir *in fine* à la synthèse d'ATP. SLC1A5, solute carrier family 1 member 5; OAA, oxaloactéate.

C. Glutamine, glutamate et biosynthèses d'acides aminés

Comme nous l'avons vu, le glutamate peut être converti en α -cétoglutarate soit par la GLUD, soit par des aminotransférases (Figure 8). Ces dernières sont des enzymes qui convertissent le glutamate en α -cétoglutarate sans production collatérale d'ammonium. Ces transaminases sont au nombre de trois. La première, la glutamate-pyruvate transaminase (GPT, aussi connue sous le nom d'alanine aminotransferase), transfère l'azote du glutamate au pyruvate, pour synthétiser de l'**alanine** et de l' α -cétoglutarate. La GPT est encodée par deux gènes, une forme cytoplasmique, GPT, et une forme mitochondriale, GPT2. Récemment, il a été montré que la GPT2 est sur-régulée dans le cancer colorectal et dans le cancer du foie (Hao et al., 2016; Xu et al., 2016).

La seconde transaminase est la glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT, aussi connue sous le nom d'aspartate aminotransférase) qui transfère l'azote du glutamate à l'oxalo-acétate pour produire de l'**aspartate** et de l' α -cétoglutarate. Elle aussi possède une isoforme cytoplasmique (GOT1) et une isoforme mitochondriale (GOT2). Dans le cancer du foie notamment, il a été montré que GOT1 est sur-régulée (Xu et al., 2016).

Enfin, la troisième transaminase est la phosphoséride aminotransférase 1 (PSAT1), qui transfère l'azote du glutamate au 3-phosphohydroxypyruvate pour donner de la **phosphoséride** et de l' α -céto glutarate. L'expression de ces différentes aminotransférases varie en fonction du tissu considéré, mais il apparaît que la PSAT1 soit exprimée de manière inappropriée dans les tumeurs (Snell, 1984). En effet, la surexpression de PSAT1 confère un avantage de croissance et de résistance à la chimiothérapie dans le cancer colorectal (Vie et al., 2008). En outre, l'expression élevée de PSAT1 corrèle avec un mauvais pronostic chez les patients atteints de carcinome épidermoïde de l'œsophage (Liu et al., 2016).

Ainsi, les réactions de transamination permettent à elles seules de générer lalanine, l'aspartate, ainsi que de la phosphoséride à partir du glutamate.

En dehors des mécanismes de transamination sus-cités, le glutamate fournit également l'azote ainsi que le carbone nécessaires pour la biosynthèse de la proline, qui a notamment un rôle dans la production du collagène (**Figure 8**). Notablement, l'oncogène c-myc peut induire une altération de l'expression des enzymes de biosynthèse et de dégradation de la proline, pour promouvoir la synthèse nette de proline à partir du glutamate dérivé de la glutamine (Liu et al., 2012a).

D'une manière générale, l'utilisation d'atomes marqués a permis de montrer qu'au moins 50% des acides aminés non essentiels utilisés dans la synthèse des protéines dans des cellules cancéreuses *in vitro* peuvent être directement dérivés de la glutamine (Wise and Thompson, 2010). Parmi les nombreux acides aminés dérivés de la glutamine contribuant à la survie des cellules cancéreuses, de récentes études ont montré que la biosynthèse d'aspartate est cruciale en raison de son rôle clé dans la synthèse des purines et des pyrimidines, comme nous le verrons ci-après.

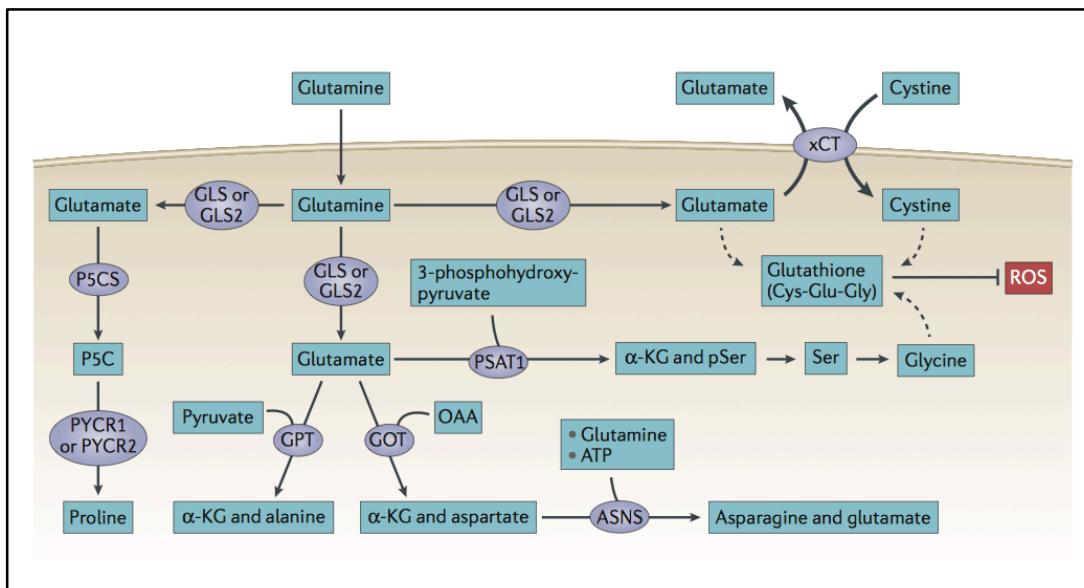


Figure 8: Le contrôle par la glutamine du pool d'acides aminés et des espèces réactives de l'oxygène (Altman, Nature, 2016).

Après conversion de la glutamine en glutamate par la glutaminase (GLS) ou glutaminase 2 (GLS2), le glutamate agit comme un donneur d'hydrogène pour les réactions de transamination impliquées dans la synthèse des acides aminés non essentiels - alanine, aspartate et sérine – par l'action de trois enzymes: la glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT), la glutamate-pyruvate transaminase (GPT) et la phosphoséride aminotransférase 1 (PSAT1). La glutamine peut aussi agir comme un donneur d'azote pour la synthèse d'asparagine via l'asparagine synthétase (ASNS). Lors d'une réaction indépendante des transaminations, la proline peut être synthétisée par la conversion du glutamate en pyroline-5-carboxylate (P5C) par la pyrroline-5-carboxylate réductase 1 (PYCR1) et la pyrroline-5-carboxylate réductase 2 (PYCR2). La glutamine contribue aussi à la synthèse du glutathion (composé de glutamate, cystéine et glycine) qui neutralise les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Afin de disposer de la cystéine nécessaire pour la synthèse du glutathion, le glutamate peut être échangé avec la cystine (rapidement réduite en cystéine dans la cellule) grâce à l'antiport xCT. Enfin, le glutamate peut aboutir indirectement à la synthèse de la glycine puisque la sérine peut être convertie en glycine. OAA, oxaloacétate.

D. Synthèse des acides gras et carboxylation réductive via la glutamine

Cancer et production exacerbée de lipides. En temps normal, la biosynthèse des acides gras est faible dans les tissus des adultes, mis à part dans les tissus lipogéniques tels que le foie, le tissu adipeux et l'épithélium mammaire en période de lactation. Cependant, en contexte tumoral, une augmentation importante de la production de lipides est observée car cela confère aux cellules tumorales des avantages conséquents en terme de croissance et de survie (Li and Cheng, 2014; Menendez and Lupu, 2007). Ainsi, l'augmentation de la capacité de production de lipides *de novo* permet la synthèse des bicouches lipidiques des membranes cellulaires, mais également de modifier la composition de ces membranes en augmentant la proportion d'acides-gras saturés résistants aux dommages oxydatifs (Rysman et al., 2010). La biosynthèse des acides gras débute par la carboxylation de l'acetyl-CoA cytosolique par l'acetyl-CoA carboxylase (ACC) pour produire du malonyl-CoA qui sera ensuite utilisé pour l'assemblage de longues chaînes d'acides gras par la fatty acid synthase (FASN) (**Figure 9**). La majorité de l'acetyl-CoA cytoplasmique

est générée à partir du citrate exporté depuis la mitochondrie, qui est métabolisé en oxalo-acétate et en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACLY). De façon intéressante, les trois enzymes majoritairement impliquées dans la synthèse des acides gras, à savoir ACLY, ACC et FASN, sont fréquemment sur-régulées dans les cellules transformées, et leur inhibition réduit la croissance des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Chajes et al., 2006; Flavin et al., 2010; Migita et al., 2008; Milgraum et al., 1997).

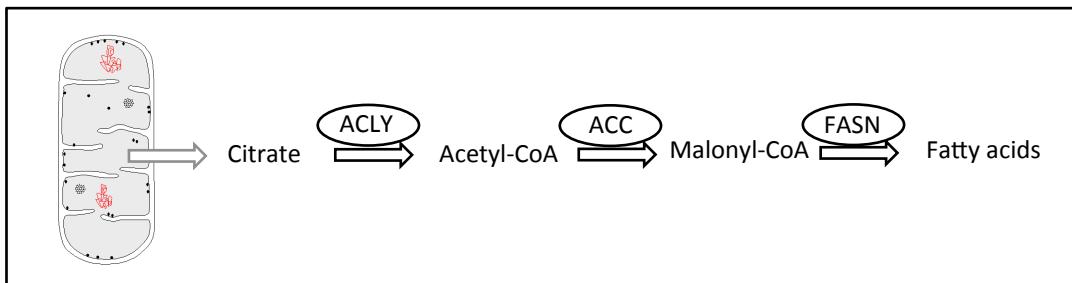


Figure 9: Voies de synthèse des acides gras.

La biosynthèse des acides gras débute par la carboxylation de l'acetyl-CoA cytosolique par l'acetyl-CoA carboxylase (ACC) pour produire du malonyl-CoA qui sera ensuite utilisé pour l'assemblage de longues chaînes d'acides gras par la fatty acid synthase (FASN). La majorité de l'acetyl-CoA cytoplasmique est générée à partir du citrate exporté depuis la mitochondrie, qui est métabolisé en oxalo-acétate et en acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACLY).

Carboxylation réductive et biosynthèse de lipides via la glutamine. Nous avons évoqué précédemment le fait que les cellules cancéreuses consomment une grande quantité de glucose, mais que la plupart de ses carbones sont excrétés sous forme de lactate, plutôt que d'être métabolisés par le cycle du TCA. Cela prive potentiellement les cellules du citrate dérivé du cycle du TCA qui permet la synthèse des acides gras. Dans ce cas, le métabolisme de la glutamine peut être une source de carbone alternative au cycle du TCA pour alimenter la synthèse des acides gras, et ce via la carboxylation réductive, un processus consommateur de NADPH par lequel l' α -cétoglutarate dérivé de la glutamine est réduit en citrate par l'isocitrate déshydrogénase (IDH)(Ward et al., 2010) (**Figure 10**). La carboxylation réductive apparaît comme une source majeure de carbone pour la synthèse de lipides en conditions d'hypoxie, d'expression constitutive du facteur α inducible par l'hypoxie (hypoxia-inducible factor- α , HIF α) ou de défauts mitochondriaux (Gameiro et al., 2013; Metallo et al., 2011; Mullen et al., 2011; Wise et al., 2011). Même si la contribution de la carboxylation réductive à la formation des lipides via la glutamine reste controversée en raison d'un potentiel échange isotopique (Fan et al., 2013b), plusieurs études suggèrent l'existence de la carboxylation réductive *in vivo* et son

rôle important dans la croissance et la progression tumorales (Dasgupta et al., 2015; Gameiro et al., 2013; Sun and Denko, 2014).

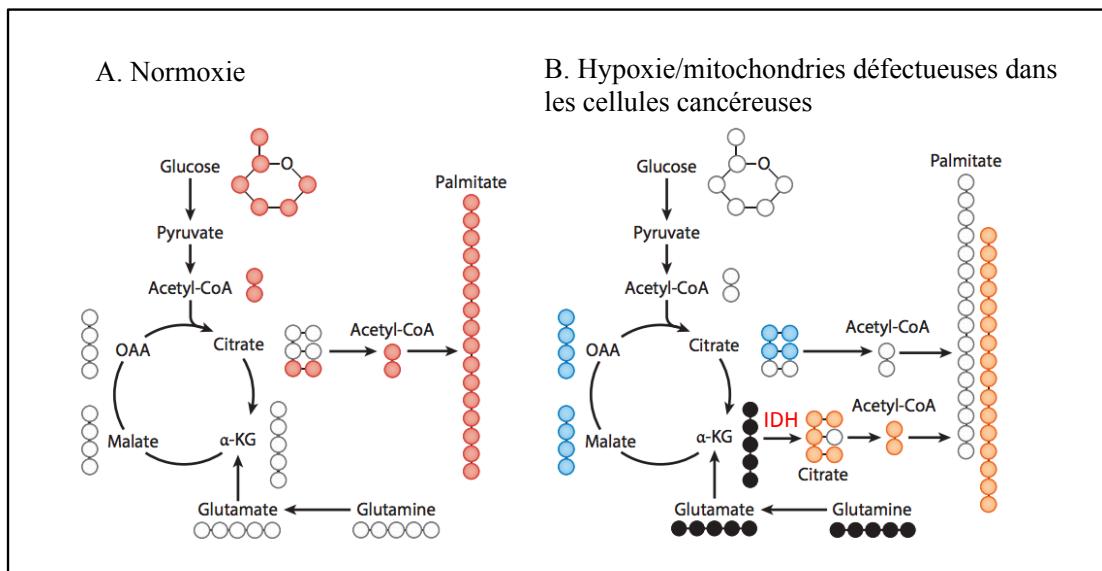


Figure 10: La glutamine peut être une source de carbone alternative au TCA pour alimenter la synthèse des acides gras via la carboxylation réductive (modifié, d'après Yang et al., 2017).

(A) En condition de normoxie, l'acétyl-CoA utilisé pour la synthèse *de novo* des acides gras dérive de l'oxydation du glucose via le cycle du TCA. La contribution du glucose à la lipogénèse peut être quantifiée par des expériences réalisées avec du glucose marqué au carbone 13. Les cercles rouges représentent les ^{13}C , et les cercles blancs les ^{12}C . (B) Les cellules cancéreuses en hypoxie ou ayant des mitochondries défectueuses augmentent la carboxylation réductive de la glutamine pour la génération du citrate permettant la formation des acides gras. Les cercles bleus, noirs et oranges représentent les ^{13}C , et les cercles blancs les ^{12}C . Les ^{13}C bleus dérivent de la glutamine marquée au carbone 13 (cercles noirs) via l'oxydation de la glutamine, alors que les ^{13}C oranges dérivent de la glutamine marquée au carbone 13 (cercles noirs) via la carboxylation réductive de la glutamine. OAA, oxaloacétate; IDH, isocitrate déshydrogénase; α -KG, α -cétoglutarate.

E. Glutamine et synthèse des nucléotides

Parallèlement à la forte consommation de carbone, les signaux de croissance présents dans les cellules cancéreuses induisent également une augmentation de la demande en azote réduit. Or la glutamine, contenant deux atomes d'azote réduit, sert de principale monnaie d'échange pour le transport d'azote réduit entre les cellules chez les métazoaires. Alors que les carbones de la glutamine sont utilisés par la synthèse des acides aminés et des acides gras comme nous l'avons vu, l'azote de la glutamine contribue directement à la biosynthèse *de novo* des purines et des pyrimidines (Lane and Fan, 2015). L'importance de la glutamine en tant que fournisseur d'azote réduit est soulignée par le fait que des cellules cancéreuses présentant un arrêt de cycle cellulaire suite à une privation en glutamine peuvent être sauvées par l'ajout de nucléotides exogènes et

non par l'ajout d'intermédiaires du cycle du TCA tels que l'oxalo-acetate par exemple (Gaglio et al., 2009). La synthèse de nucléotides à partir de glutamine exogène marquée a d'ailleurs été observée dans des cultures *ex vivo* issues d'échantillons de patients atteints de NSCLC (Sellers et al., 2015). La glutamine contribue à la synthèse des nucléotides de deux manières comme nous allons le voir; d'une part, elle fournit directement les atomes d'azote nécessaires aux biosynthèses. Ainsi la synthèse de l'uracile et la thymine ne nécessite qu'une molécule de glutamine, alors que celle de la cytosine et l'adénine en requiert deux, et celle de la guanine en demande trois. D'autre part, la glutamine contribue également indirectement à la biosynthèse des purines et pyrimidines via l'aspartate (**indiqué en vert sur les figures 11 et 12**), qui est dérivé de la transamination de l'oxalo-acétate et du glutamate, eux-mêmes dérivés de la glutamine.

Nous allons voir en détail la synthèse des purines et pyrimidines dans les deux paragraphes suivants, car nous verrons dans la partie « résultats » de cette thèse, que nos recherches nous ont menés à nous intéresser particulièrement au rôle de la glutamine dans la synthèse des nucléotides.

Synthèse des purines. (**Figure 11**) La synthèse des purines débute par la transformation du ribose-5-phosphate (issu du glucose-6-phosphate de la glycolyse) en 5'-phosphoribosyl 1-pyrophosphate (PRPP). A partir du PRPP, l'inosine 5'-monophosphate (IMP), précurseur des purines, est synthétisé au cours d'un processus multi-étapes consommant deux atomes d'azotes de deux molécules de glutamine. Enfin, un troisième atome d'azote provenant de la glutamine est requis pour la synthèse de la guanosine monophosphate (GMP) à partir de l'inosine monophosphate (IMP), alors que la synthèse de l'adénosine monophosphate (AMP) ne nécessite pas de troisième atome d'azote.

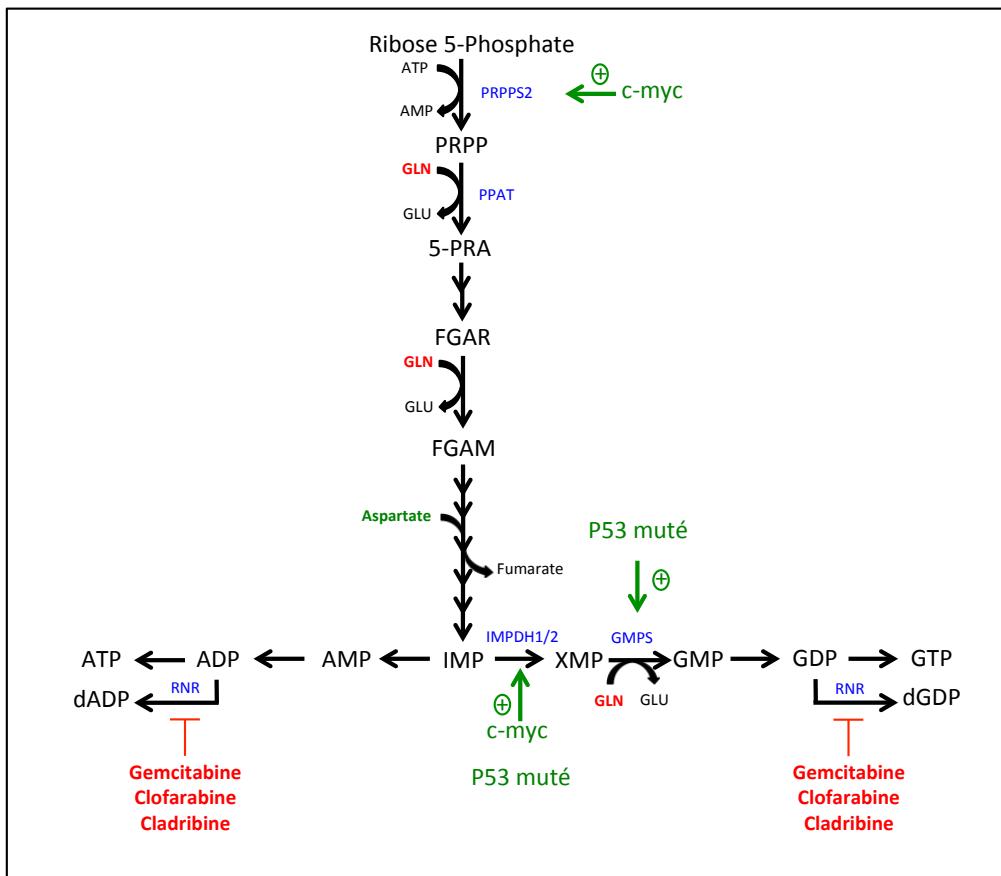


Figure 11: la voie de synthèse (*de novo*) des purines

La synthèse des purines débute par la transformation du ribose-5-phosphate (issu du glucose-6-phosphate de la glycolyse) en 5'-phosphoribosyl 1-pyrophosphate (PRPP), par l'enzyme PRPP-synthétase (PRPPS2). A partir du PRPP, le 5-phospho-β-D-ribosylamine (5-PRA) est généré via l'enzyme phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase (PPAT) induisant la consommation d'une première glutamine. Une deuxième glutamine est consommée lors de la transformation du formylglycine-amide ribonucléotide (FGAR) en formylglycine-amidine ribonucléotide (FGAM). Ensuite, l'inosine 5'-monophosphate (IMP), précurseur des purines, est synthétisé au cours d'un processus multi-étapes consommant un aspartate. Enfin, un troisième atome d'azote provenant de la glutamine est requis pour la synthèse de la guanosine monophosphate (GMP) à partir de l'IMP, alors que la synthèse de l'adénosine monophosphate (AMP) ne nécessite pas de troisième atome d'azote. Dans les cellules cancéreuses, des niveaux élevés de c-Myc induisent une augmentation de l'expression de la phosphoribosyl pyrophosphate synthétase 2 (PRPS2), et de l'inosine monophosphate déshydrogénase 1/2 (IMPDH 1/2). La mutation de p53, très fréquente dans les cancers, induit une dérégulation IMPDH 1/2, et la GMP synthétase (GMPS). Ces dérégulations sont matérialisées par des flèches vertes. La ribonucléotide réductase (RNR) permet la synthèse de déoxyribonucléotides à partir des ribonucléotides. Elle peut être inhibée par des antimétabolites (en rouge).

Synthèse des pyrimidines. (Figure 12) La synthèse des pyrimidines débute par la réaction de la glutamine avec du bicarbonate et deux molécules d'ATP pour donner le carbamoyl-phosphate, réaction catalysée par le complexe enzymatique CAD. Après un processus multi-étape, l'uridine 5'-monophosphate (UMP) est synthétisée, pouvant être transformée en uridine 5'-diphosphate (UDP). L'UDP peut alors être transformée en uridine 5'-triphosphate (UTP) qui sera transformée

en cytosine triphosphate (CTP) grâce à la consommation d'une molécule de glutamine. Cependant, l'UDP peut également être transformée en déoxyuridine 5'-monophosphate (dUMP) afin de synthétiser de la déoxythymidine monophosphate (dTMP).

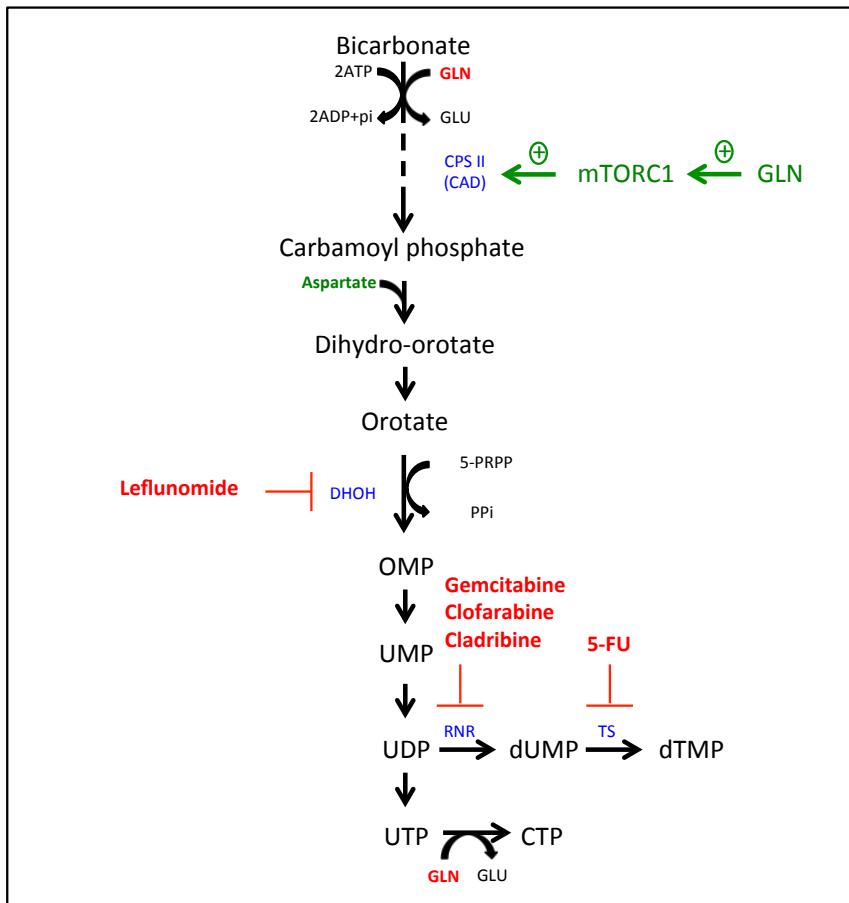


Figure 12: la voie de synthèse (*de novo*) des pyrimidines

La synthèse des pyrimidines débute par la réaction de la glutamine avec du bicarbonate et deux molécules d'ATP pour donner le carbamoyl-phosphate, réaction catalysée par le complexe enzymatique CAD, qui contient notamment l'enzyme carbamoyl-phosphate synthétase II (CPS II). Après un processus multi-étape, l'orotidine 5'-monophosphate (OMP), est transformée en uridine 5'-monophosphate (UMP), pouvant à son tour être transformée en uridine 5'-diphosphate (UDP). L'UDP peut alors être transformée en uridine 5'-triphosphate (UTP) qui sera transformée en cytosine triphosphate (CTP) grâce à la consommation d'une molécule de glutamine. Cependant, l'UDP peut également être transformée en déoxyuridine 5'-monophosphate (dUMP) afin de synthétiser de la déoxythymidine monophosphate (dTMP).

L'activité de l'enzyme CAD, est régulée notamment par la S6 kinase dépendante de mTORC1 (mamalian target of rapamycin 1), elle-même activée par la glutamine.

Les enzymes DHOH (Dihydroorotate déshydrogénase), RNR (Ribonucléotide réductase) et TS (Thymidylate synthase) peuvent être ciblées par des agents utilisés en thérapeutique (en rouge).

Cancer et dérégulation des voies de biosynthèse des nucléotides. De façon intéressante, les altérations présentes dans les cellules cancéreuses induisent une augmentation de l'utilisation de l'azote de la glutamine pour la production des nucléotides. Par exemple, des niveaux élevés de c-

Myc induisent l'expression d'un bon nombre d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des nucléotides, notamment la phosphoribosyl pyrophosphate synthétase 2 (PRPS2) permettant la synthèse du PRPP, l'inosine monophosphate déshydrogénase 1/2 (IMPDH 1/2) (**Figure 11**), la carbamoyl phosphate synthétase II (CPSII, faisant partie du complexe CAD) et la thymidylate synthase (TS) (confère schéma pyrimidines) (Cunningham et al., 2014; Eberhardy and Farnham, 2001; Liu et al., 2008; Mannava et al., 2008). Ainsi c-myc facilite non seulement l'internalisation de glutamine dans les cellules, mais également son utilisation pour la synthèse des purines et des pyrimidines. Les cellules cancéreuses portant une mutation de p53 présentent elles aussi une dérégulation de gènes impliqués dans la biosynthèse des nucléotides, notamment IMPDH 1/2, et la GMP synthétase (GMPS) (Kollareddy et al., 2015). Enfin, l'activité de l'enzyme CAD, impliquée dans la synthèse des pyrimidines, est régulée notamment par la S6 kinase dépendante de mTORC1 (Ben-Sahra et al., 2013; Robitaille et al., 2013). De cette manière, l'activité de CAD, dépendante de mTORC1, permet à la cellule de réguler la biosynthèse des pyrimidines en fonction du niveau intracellulaire de glutamine, étant donné que cette dernière contribue à l'activation de mTORC1 (Duran et al., 2012; Jewell et al., 2015).

F. Rôle de la glutamine dans le contrôle redox

Malgré l'effet Warburg, les cellules cancéreuses génèrent quand même de l'ATP à partir de la chaîne de transport des électrons, tout du moins en certaines proportions. Lorsque le NADH transfère un électron aux complexes de la chaîne de transport, la réduction incomplète de l'oxygène peut générer un anion superoxyde (O_2^-), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un radical hydroxyle (OH°), collectivement nommés les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS). Il est important de savoir qu'une quantité suffisante de ROS est nécessaire pour la tumorigénèse car ces espèces induisent l'instabilité chromosomique et l'aneuploidie (Pfau and Amon, 2012), et notamment pour la prolifération et la tumorigénèse induites par Kras (Weinberg et al., 2010). Cependant, la balance redox au sein des cellules tumorales est primordiale, car un environnement cellulaire très oxydant cause, outre des dommages à l'ADN, la dénaturation de protéines, et la peroxidation de lipides. Les produits du métabolisme de la glutamine jouent un rôle de défense contre le stress oxydatif de trois manières.

Premièrement, le glutamate dérivé de la glutamine peut être utilisé *de novo* pour la synthèse du glutathion. Ce tripeptide est composé de trois acides aminés, le glutamate, la cystéine et la glycine (Lu, 2009) dont la synthèse dérive indirectement, pour tous trois, de la glutamine

(Figure 8). Les leucémies myéloïdes aigues (AML) et les cancers métastatiques du foie sont caractérisés par une augmentation significative des enzymes de synthèse du glutathion (Nguyen et al., 2016; Pei et al., 2013), suggérant que ces tumeurs pourraient être sensibles à des inhibiteurs de la synthèse du glutathion.

Deuxièmement, un second mécanisme par lequel le glutamate dérivé de la glutamine contribue à la synthèse du glutathion est qu'il facilite l'entrée de cystine via le transporteur xCT, qui est couplé à l'efflux de glutamate (Figure 8). Une fois entrée dans la cellule, la cystine est convertie en cystéine, qui peut être incorporée au glutathion.

Enfin, la glutamine peut contribuer à l'équilibrage redox de la cellule via la production de NADPH. En effet, dans une cellule en prolifération, le NADPH est utilisé pour la synthèse des acides gras et du cholestérol, mais également pour la transformation du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH). Son et al. ont d'ailleurs montré que les cellules d'adénome pancréatique étaient dépendantes de la glutamine pour le maintien de leur pool cytosolique de NADPH, et que cette reprogrammation du métabolisme de la glutamine était médiée par l'oncogène Kras (Son et al., 2013).

G. Glutamine et autophagie dans les cellules cancéreuses

Dans les cancers, il est fréquent que les voies de régulation de l'autophagie soient mutées (Laplante and Sabatini, 2012), or le rôle de l'autophagie dans les cancers peut paraître paradoxal. En effet, dans certains contextes, notamment dans des cas d'initiation tumorale, l'autophagie est anti-tumorale, en limitant le stress oxydatif et l'instabilité chromosomique qui pourraient aboutir, à terme, à des mutations oncogéniques (Mathew et al., 2009; Takamura et al., 2011), alors que dans d'autres situations liées à la progression tumorale, l'autophagie permet la survie des cellules cancéreuses en fournissant des nutriments dans des contextes de privation nutritionnelle comme nous l'avons vu précédemment, mais également en supprimant des réponses au stress qui auraient mené à la phosphorylation de p53 (Altman et al., 2011). Le rôle de l'autophagie dans les contextes tumoraux est donc complexe, et diffère selon qu'il s'agisse d'initiation, ou de progression tumorale.

Ainsi, nous avons vu qu'en manque de nutriments, et notamment d'acides aminés, tels que la glutamine par exemple, la cellule peut survivre grâce à l'autophagie. En outre, il est important de savoir qu'il existe une relation complexe entre régulation de l'autophagie et glutamine comme nous allons le voir.

Lorsque les cellules sont en manque d'acides aminés, l'activation spécifique de l'autophagie peut se faire via deux voies de signalisation : la première est la voie mTORC1 (mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1) ; la seconde est la voie GCN2 (general control nonderepressible 2), cette dernière étant une sérine/thréonine kinase qui détecte les déficiences en acides aminés au sein des cellules en se liant aux ARN de transfert (ARNt) non chargés.

Glutamine et mTOR. La voie mTOR est un senseur d'acides aminés, qui favorise les voies de biosynthèses (comme la traduction des protéines et la synthèse des acides gras) et qui inhibe les processus de dégradation tels que l'autophagie. De ce fait, il est primordial que l'activité de mTOR soit hautement régulée. La glutamine, justement, régule son activité via plusieurs mécanismes (**Figure 13**). Premièrement, la glutamine peut contribuer à l'activation de mTORC1 en étant échangée contre la leucine, par l'antiport LAT1. La leucine, ainsi que l'arginine, peuvent alors induire l'activation du complexe RAG (RAS-related GTPase complex, RAG), provoquant alors le recrutement de mTORC1 au niveau du lysosome, et stimulant son activité (Sancak et al., 2008). Il est à noter que la stimulation de mTORC1 via RAG serait probablement dépendante du transporteur lysosomal d'acides aminés SLC38A9 (solute carrier family 38 member 9), qui transporte la glutamine, l'arginine et la leucine (Rebsamen et al., 2015). Deuxièmement, des voies indépendantes de RAG pour la régulation de mTOR par la glutamine ont été identifiées. En effet, la glutamine favoriserait la localisation de mTOR au niveau du lysosome ainsi que son activité via ARF1 (ADP ribosylation factor 1), membre de la famille ras (Jewell et al., 2015) par un mécanisme encore peu connu. Enfin, il semblerait également que l'α-cétoglutarate, pouvant être synthétisé à partir de la glutamine, régule l'activité de mTOR via RAG (Duran et al., 2012).

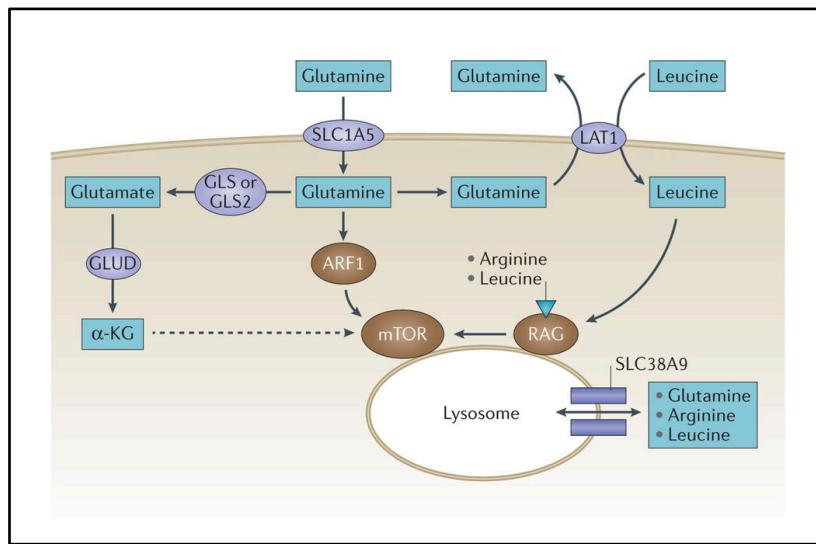


Figure 13: Le contrôle de l'activité de mTOR par la glutamine.

Les acides aminés stimulent la voie mTOR et le maintien du pool d'acides aminés est dépendant de la glutamine. L'arginine et la leucine sont deux acides aminés stimulant le complexe mTOR 1 (mTORC1) via l'activation de RAG (Ras-related GTPase), qui recrute mTORC1 au niveau du lysosome et stimule son activité. La glutamine peut contribuer à l'activité à l'activation de mTOR en étant échangée pour des acides aminés essentiels dont la leucine, via la transporteur LAT1. L' α -cétoglutarate (α -KG) régule également l'activité de mTOR, bien que le mécanisme ne soit pas encore totalement élucidé (Duran et al., Mol. Cell, 2012). mTOR peut également être réulé par la glutamine indépendamment de RAG2: la glutamine favorise la localisation de mTOR au niveau de lysosome via ARF1 (ADP ribosylation factor 1). GLS, glutaminase; GLS2, glutaminase 2; GLUD, glutamate déshydrogénase.

Autres voies de régulation de l'autophagie par la glutamine. Outre mTOR, la glutamine influe de plusieurs autres manières sur l'autophagie. Il a notamment été montré que la glutamine supprime l'activation de GCN2, induisant alors une inhibition de l'autophagie (Ye et al., 2015). Cependant, la glutamine peut également avoir une activité favorisant l'autophagie. En effet, il semblerait que la libération d'ammoniac lors de la glutaminolyse pourrait potentiellement promouvoir l'autophagie via un mode autocrine et paracrine (Cheong et al., 2011). Ceci est intéressant dans le sens où la libération d'ammoniac due au catabolisme de la glutamine peut varier entre les différents types de cancers. En effet, selon que les cellules cancéreuses génèrent de l' α -cétoglutarate plutôt via la GLUD (qui relargue de l'ammoniac) ou via les transaminations (réactions qui ne relarguent pas d'ammoniac), l'effet sur l'autophagie sera donc différent.

Ainsi, dans cette seconde partie, nous avons vu que les cellules cancéreuses présentaient des altérations métaboliques leur permettant de répondre à leurs besoins accrus, afin d'accroître leurs biosynthèses pour permettre des divisions fréquentes et la progression du cancer. Nous allons

voir dans une troisième partie que ces altérations métaboliques peuvent justement être considérées comme des talons d'Achille des cellules cancéreuses, qui peuvent être ciblées par des inhibiteurs pour induire la mort de ces cellules. Pour finir, nous aborderons les altérations métaboliques des cellules cancéreuses résistantes aux chimiothérapies, sujet qui nous intéresse tout particulièrement, puisque nous nous sommes intéressés aux altérations métaboliques présentées par les cancers résistants au cisplatine durant ma thèse.

III. Cibler le métabolisme pour traiter les cancers

1) Ciblage des principales voies métaboliques

Depuis les années 2000, les réarrangements métaboliques caractéristiques des cellules cancéreuses sont considérés comme des cibles thérapeutiques prometteuses. De nombreuses approches différentes ont été explorées en ce sens, menant à l'identification d'agents actuellement testés en études précliniques ou cliniques. Nous allons étudier quelques exemples de ciblage du métabolisme des cellules cancéreuses dans cette partie de l'introduction. Ils sont représentés sur la **Figure 14**.

A. Ciblage de l'import de glucose et de la glycolyse

L'inhibition de l'entrée du glucose dans la cellule par l'inhibiteur WZB117 ciblant GLUT1 induit une diminution de l'ATP intracellulaire dans les cellules cancéreuses traitées, ainsi qu'une diminution des enzymes glycolytiques. Ces changements sont suivis par l'activation des AMP kinases (protéines kinases activées par l'AMP, AMPK) et le déclin des cyclines E2, induisant l'arrêt du cycle cellulaire et la senescence (Liu et al., 2012b). Cet inhibiteur, montrant des effets anticancéreux précliniques *in vitro* et *in vivo* n'a pas encore été testé chez l'humain. Dans des études pré-cliniques, les inhibitions des transporteurs GLUT1 (Gautier et al., 2013) et GLUT4 (Wei et al., 2017), ont montré des résultats anti-cancéreux intéressants, cette dernière isoforme étant surtout exprimée dans les cellules de myélome (Hay, 2016). Malgré la multiplicité des études pré-cliniques, seules de rares études cliniques sont menées afin de confirmer ces résultats. L'utilisation d'inhibiteurs de GLUT1 chez les patients paraît compromise, car son expression est présente dans une multitude de cellules saines chez les mammifères (Hay, 2016).

L'inhibition non sélective de l'hexokinase avec du 2-deoxy-D-glucose (2-DG) a démontré une toxicité acceptable dans le cas de patients atteints de gliome étant traités de façon concomitante à de la radiothérapie (Dwarkanath et al., 2009). L'utilisation du 2-DG en monothérapie a été testée dans des études de phase 1 sur des patients présentant des tumeurs solides (NCT00096707, clinicaltrials.gov) ou atteints de cancer de la prostate (NCT00633087), mais les résultats de ces essais n'ont pas été communiqués. Néanmoins, actuellement les efforts sont davantage tournés vers le ciblage de l'isoforme 2 de l'hexokinase (HK2), qui est le plus souvent exprimée dans les cellules malignes et non exprimée dans la plupart des cellules saines adultes (en opposition à l'isoforme 1, qui est retrouvée dans la plupart des tissus sains) dont le rôle paraît prédominant (Wolf et al., 2011). En ce sens, il a été récemment montré dans des études pré-cliniques réalisées sur des rongeurs, que le 3-bromopyruvate exerçait des effets anti-cancéreux notables, notamment

dans le cas de cancer gastrique (Xian et al., 2016), cancer du sein (Buijs et al., 2013), de l'endomètre (Byrne et al., 2014), du pancréas (Chapiro et al., 2014) mais également dans des cas de lymphome (Schaefer et al., 2012). Ces résultats pré-cliniques très prometteurs devront être confirmés lors d'études cliniques. Il n'en existe aucune à ce jour, utilisant du 3-bromopyruvate pour le traitement des cancers (source: clinicaltrials.gov).

Un large spectre d'études pré-cliniques ciblant d'autres enzymes glycolytiques ou de transporteurs de substrats ou produits de la glycolyse ont également montré des résultats intéressants, notamment pour le ciblage de la PKM2 (Chao et al., 2017; Christofk et al., 2008a; Goldberg and Sharp, 2012), de la lactate deshydrogenase A (LDHA) (Gao et al., 2016; Le et al., 2010). L'inhibition de PKM2 paraît quant à elle plus aisée en clinique, notamment grâce à l'inhibiteur TLN-232, testé en monothérapie chez des patients atteints de carcinome rénal métastatique (NCT00422786) et de mélanome (NCT00735332). Cependant, le fait que certaines tumeurs ne nécessitent pas l'activation de PKM2 (Cortes-Cros et al., 2013) tempère quelque peu l'éthousiasme initial concernant l'utilisation du ciblage de cette enzyme comme stratégie thérapeutique anticancéreuse.

Nous avons vu précédemment que les tumeurs présentent régulièrement un accroissement de la glycolyse anaérobie. En outre, les tumeurs en conditions d'hypoxie sont davantage dépendantes de la glycolyse (Semenza, 2003). De ce fait, les cellules cancéreuses produisent beaucoup de lactate, ce qui peut induire une acidification intracellulaire ou inhibition du métabolisme par rétrocontrôle négatif (Cairns et al., 2011). Le transport de lactate à travers la membrane plasmique est donc indispensable pour prévenir son accumulation au niveau intracellulaire. Celui-ci peut se faire notamment grâce au transporteur de monocarboxylate 1 (MCT1), souvent surexprimé dans les tumeurs en comparaison aux tissus sains (Pinheiro et al., 2010). Il a été montré que le blocage du transport de lactate via le transporteur MCT1 par l'inhibiteur AZD3965 produit un transfert du métabolisme glycolytique anaérobie vers le métabolisme oxydatif (Beloueche-Babari et al., 2017), et induit efficacement la mort des cellules tumorales *in vitro* en conditions d'hypoxie, mais également *in vivo* notamment dans le cancer du poumon non à petites cellules (Polanski et al., 2014). Malgré des études précliniques encourageantes, ces résultats nécessitent d'être confirmés par des études réalisées chez les patients. L'inhibiteur AZD3965 fait l'objet d'une étude clinique de phase I recrutant actuellement des patients atteints de tumeurs solides et lymphomes en stades avancés (NCT01791595).

B. Ciblage du cycle des TCA

L'utilisation de drogues déjà approuvées par les autorités de santé pour des indications différentes de celles du cancer est souvent privilégiée car elle permet la simplification des études cliniques et leur accélération. Le dichloroacétate (DCA), un traitement déjà utilisé en routine pour l'acidose héréditaire, stimule indirectement l'activité de la Pyruvate déshydrogénase en inhibant la Pyruvate Deshydrogénase Kinase 1 (PDK). Cela favorise le catabolisme mitochondrial du pyruvate au détriment de la glycolyse et de la production de lactate, exacerbées dans les cellules cancéreuses (Bonnet et al., 2007). Cependant, cette fonction n'est pas la seule du DCA; en effet, il semblerait également qu'il réactive la transduction de signaux impliqués dans l'apoptose mitochondriale (Bonnet et al., 2007) et qu'il favorise l'augmentation du pH extracellulaire (en conséquence de la diminution de la sécrétion de lactate), limitant ainsi l'invasion locale (Estrella et al., 2013) et l'établissement d'un microenvironnement immunosuppressif (Kumar et al., 2012). L'utilisation du DCA dans de récentes études cliniques a donné des résultats très encourageants; en effet, le cas récemment rapporté d'un patient de 32 ans atteint de mélanome métastatique et traité par le DCA en monothérapie a montré une régression puis une stabilisation de la maladie depuis 4 ans (Khan et al., 2017). Un autre patient, âgé de 57 ans et atteint d'un cancer du colon de stade 4 est stabilisé depuis près de 4 ans grâce à l'ingestion orale de DCA, sans toxicité notable (Khan et al., 2016). Ces résultats sont tout de même à nuancer eu égard à la nature du cancer traité. En effet, une étude (NCT01029925) portant sur des patients atteints de NSCLC a montré que l'utilisation du DCA en monothérapie était déconseillée pour des patients ayant déjà été traités auparavant par d'autres chimiothérapies, en raison d'une progression et/ou de toxicité avérées pour tous les membres participant à l'étude (Garon et al., 2014).

C. Ciblage de la phosphorylation oxydative

La metformine (1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride), dont l'indication principale est le diabète de type 2 est un agent diminuant la production hépatique de glucose en inhibant transitoirement le complexe 1 de la chaîne respiratoire (El-Mir et al., 2000; Viollet et al., 2012). La diminution du statut énergétique hépatique qui en résulte active la protéine kinase activée par l'AMP (AMP-activated protein Kinase, AMPK).

Cette action de la metformine sur le complexe 1 de la respiration joue un rôle dans son effet anti-néoplasique (Wheaton et al., 2014). Son action anti-cancéreuse semblerait également reposer sur d'autres rôles de cette drogue, notamment l'induction de dommages à l'ADN (Kadoda et al.,

2017), l'inhibition de mTOR et l'activation de p53 (Thent et al., 2017). La metformine, ayant démontré son effet anticancéreux dans de multiples études précliniques réalisées chez les rongeurs, et notamment dans les NSCLC (Courtois et al., 2017; Yousef and Tsiani, 2017) fait l'objet de nombreux essais cliniques, dont certains ont été très encourageants, notamment, très récemment, dans le cancer du colon et du poumon (Henderson et al., 2017), et de l'endomètre (Meireles et al., 2017) . En particulier, à ce jour, 15 essais cliniques, enregistrés sur le site <https://www.clinicaltrials.gov> sont axés sur l'étude de l'effet de la metformine dans les cancers des poumons. Trois d'entre eux sont axés sur la metformine en monothérapie dans les cas de NSCLC.

D. Ciblage de la voie de synthèse des lipides

La forte prolifération des cellules cancéreuses nécessitant une synthèse accrue de bicouche lipidique fait de la lipidogénèse une voie intéressante pour le ciblage des cellules cancéreuses. Les statines inhibitrices de l'enzyme HMGCR (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase) impliquée dans une des étapes de la synthèse du cholestérol, par exemple, ont montré une efficacité anticancéreuse notable lors d'études précliniques *in vitro* et *in vivo* (Ghosh-Choudhury et al., 2010; Glynn et al., 2008; Ingersoll et al., 2016; Ma et al., 2012; Wang et al., 2017). De très nombreuses études cliniques rétrospectives ont permis d'établir un lien entre la prise de statines (avant et après la survenue du cancer) et la diminution de la mortalité induite par divers types de cancers (Lee et al., 2016; Nielsen et al., 2012), et notamment les NSCLC (Lin et al., 2016). Ainsi, l'utilisation de statines a un effet préventif sur la mortalité par cancer. Cependant, les études interventionnelles actuellement menées sur la prise de novo de statines après le diagnostique du cancer ne semblent pas mettre en évidence, pour l'instant, un effet anticancéreux de cette drogue chez les patients atteints de cancer du sein (Smith et al., 2016) et du cerveau (El-Hamamsy et al., 2016) par exemple.

Le ciblage de l'enzyme FASN par l'orlistat (Xenical/Alli; Roche/GlaxoSmithKline), déjà approuvé pour le traitement de l'obésité, a montré des effets cytotoxiques et anti-prolifératifs *in vitro* sur des lignées de lymphome (Kant et al., 2014), de myélome (Tirado-Velez et al., 2012) de cancer oral (Agostini et al., 2014; Xiao et al., 2017) et de cancer de l'ovaire (Yang et al., 2015a) et de l'endomètre (Wysham et al., 2016) par exemple. Une autre inhibiteur de FASN, le triclosan, a lui aussi démontré des effets inhibiteurs sur la croissance des cellules cancéreuses, notamment sur des lignées de cancer de la prostate (Sadowski et al., 2014). Pour le moment, ces

inhibiteurs n'ont pas encore été testés lors d'études cliniques portant sur leur efficacité dans le traitement de patients atteints de cancers.

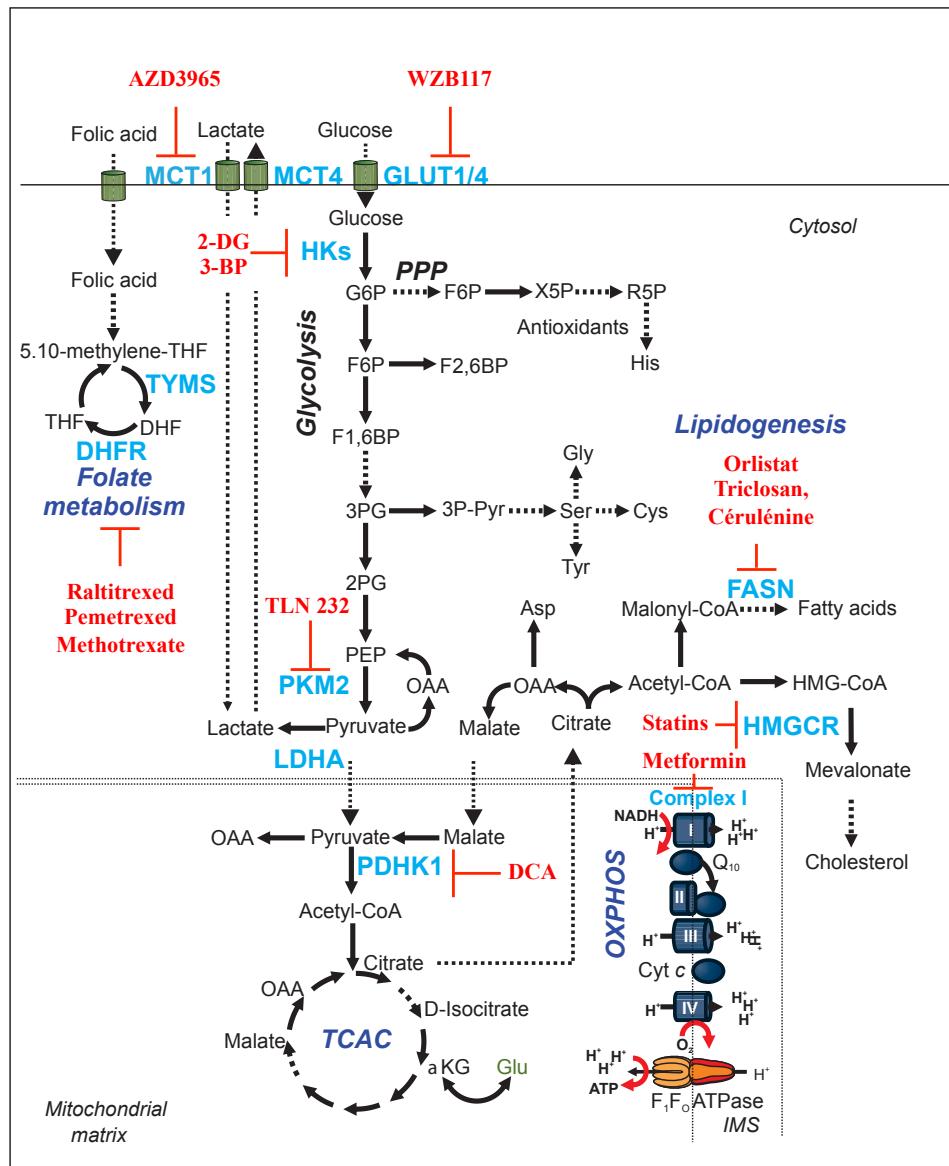


Figure 14: Le ciblage de voies métaboliques pour l'induction de la mort des cellules cancéreuses.

De nombreuses branches des voies métaboliques de bioénergétique et d'anabolisme des cellules cancéreuses peuvent être ciblées pour inhiber l'oncogénèse et la progression tumorale. Les enzymes ciblées sont montrées en bleu, et leurs inhibiteurs, utilisés soit lors d'études pré-cliniques, d'essais cliniques ou de routine sont montrés en rouge. 2-DG, 2-désoxyglucose; 3-BP, 3-bromopyruvate; DCA : dichloroacetate ; DHFR, Dihydrofolate reductase; FASN, fatty acid synthase ; GLUT1/4, Glucose Transporter 1/4; HK, hexokinase; HMGCR, HMG-CoA reductase; LDHA, lactate déshydrogénase A; MCT1, transporteur de monocarboxylate 1; MCT4, transporteur de monocarboxylate 4; PDHK1, pyruvate deshydrogénase kinase; PKM2, pyruvate kinase muscle 2 ; TCAC, tricarboxylic acid cycle; TYMS, thymidylate synthase;

E. Ciblage de la voie de synthèse des nucléotides

Les voies métaboliques menant à la synthèse des nucléotides ont été identifiées depuis longtemps comme des cibles préférentielles pour le développement d'agents anti-cancéreux. Ainsi, des inhibiteurs du métabolisme du folate (par exemple le pemetrexed, raltitrexed et methotrexate), de la synthèse de thymidine (le 5-FU par exemple), de la synthèse de deoxynucléotides via le ciblage de ribonucléotide réductases (gemcitabine, clofarabine, cladribine), qui sont communément catégorisés dans les antimétabolites, représentent les traitements de référence pour de nombreux cancers (Chabner and Roberts, 2005) (**Figures 11 et 12**). Tous ces agents sont associés à des toxicités notables affectant principalement les tissus à croissance rapide tels que la moelle osseuse et l'épithélium intestinal. Cependant, leur haute efficacité, au moins dans certains types de cancers, en fait des exemples d'inhibiteurs métaboliques à haut pouvoir anti-cancéreux.

F. Ciblage de la voie m-TOR

Comme les voies de régulation de l'autophagie peuvent être mutées dans les cancers (Laplante and Sabatini, 2012), l'inhibition pharmacologique de mTOR a été étudiée pour inhiber la prolifération des cellules malignes (Sabatini, 2006). Deux agents inhibiteurs, l'everolimus et le temsirolimus ont été initialement autorisés par la FDA pour la prévention du rejet des allogreffes, mais leur utilisation clinique a ensuite été étendue à de nombreuses indications en oncologie (Benjamin et al., 2011). En parallèle, des essais cliniques testant le potentiel anticancéreux de l'everolimus, le temsirolimus et d'autres rapalogues sont actuellement en cours (source : clinicaltrials.gov) dans de très nombreux types de cancers, incluant notamment les NSCLC.

2) Applications thérapeutiques du catabolisme de la glutamine dans les cancers

Le rôle pléiotrope de la glutamine au sein des cellules et la dépendance exacerbée des cellules cancéreuses envers cet acide aminé en font une cible intéressante pour les traitements anti-cancéreux. Des composés agissant aux diverses étapes d'utilisation de la glutamine ont été développés, allant du blocage de son import dans la cellule jusqu'à sa conversion en α -cétoglutarate. (**Figure 15**)

A. Les analogues structuraux de la glutamine

Trois analogues structuraux de la glutamine, le L-DON (6-diazo-5-oxo-l-norleucine), l’acivicine (α -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid) et l’azaserine isolée d’une espèce de streptomyces ont des effets cytotoxiques significatifs sur certains types tumoraux, à la fois *in vitro* et *in vivo* en raison de leur capacité à entrer en compétition avec la glutamine. L’acivicine est un inhibiteur potentiel des amidotransférases limitantes dépendantes de la glutamine dans la synthèse des purines et des pyrimidines (Poster et al., 1981). Le L-DON ainsi que l’acivicin inhibent la réaction réversible de l’alkylation des résidus de L-cysteinyl. Des études précliniques réalisées avec ces trois analogues ont montré des effets cytotoxiques anticancéreux à la fois *in vitro* et *in vivo* (Chance et al., 1987). Cependant, même si ces trois agents ont pu montrer une efficacité tumorale en clinique, leur toxicité sur le tractus gastrointestinal, les cellules immunitaires, ainsi que le système nerveux central limitent leur potentielle utilisation en clinique (Chance et al., 1987; Earhart et al., 1982; Olver et al., 1998).

B. Les inhibiteurs de glutaminase

Afin d’augmenter la sélectivité des inhibiteurs du métabolisme de la glutamine, les efforts se sont portés sur l’inhibition de la glutaminase (GLS), enzyme dérégulée dans de nombreux types de cancers, notamment via l’ongène c-myc (Miller et al., 2012). En ce sens, plusieurs inhibiteurs allostériques de cette enzyme ont été développés, dont le BPTES (Robinson et al., 2007; Thangavelu et al., 2012), et le CB-839 (Ramachandran et al., 2016). Leur fixation empêche le passage de la GLS de la forme dimère à la configuration tétramère. Le composé 968 réprime l’activité Rho GTPase, inactivant ainsi la GLS (Stalnecker et al., 2015; Wilson et al., 2013) Tous trois ont démontré une efficacité antitumorale lors d’études précliniques *in vitro* ou *in vivo* (Gross et al., 2014) (Emadi et al., 2014; Wang et al., 2010; Xiang et al., 2015). Actuellement, l’efficacité du CB-839 est testée lors d’une étude de phase I sur des patients atteints de tumeurs solides en monothérapie (NCT02071862). Pour ce même inhibiteur, deux autres études cliniques de phase 1 en monothérapie ont été réalisées sur des patients atteints de lymphomes et myélomes (NCT02071888) et leucémies (NCT02071927) dont les résultats ne sont pas encore accessibles pour le moment.

C. Les inhibiteurs de la conversion du glutamate en α -cétoglutarate

Les inhibiteurs de GLUD. La catechine du thé vert (epigallocatechin gallate, EGCG), inhibiteur allostérique de la glutamate deshydrogénase (Li et al., 2011; Li et al., 2007), a démontré des effets anticancéreux notables *in vitro* et *in vivo* sur un modèle préclinique de neuroblastome (Qing et al., 2012).

Les inhibiteurs d'aminotransferase. L'aminoxyacetate (AOA), est un inhibiteur général des enzymes utilisant le pyridoxal phosphate, incluant notamment les aminotransférases. Cet inhibiteur non sélectif a montré des effets cytotoxiques dans des modèles précliniques de cancer du sein (Korangath et al., 2015) et de neuroblastome (Qing et al., 2012). Il a également été testé lors d'études cliniques pour le traitement des acouphènes (Guth et al., 1990) car la drogue semblerait avoir une cible au niveau de la cochlée. L'utilisation de cet inhibiteur a permis la diminution des acouphènes, mais induit des effets indésirables tels que nausées et troubles de l'équilibre.

Il est à noter que l'efficacité antitumorale de ces inhibiteurs dépend du niveau de dépendance des tumeurs considérées à l'activité des aminotransférases et GLUD, ce qui dépend du type tumoral, comme nous l'avons vu précédemment.

D. Les inhibiteurs de l'import de glutamine

Une approche globale pour cibler le métabolisme de la glutamine consiste à bloquer son import dans les cellules. En ce sens, la benzylserine et le L- γ -glutamyl-p-nitroanilide (GPNA) inhibent l'activité du transporteur importateur de glutamine ASCT2 (aussi connu sous le nom de SLC1A5, solute carrier family 1 member 5). L'utilisation de la benzylserine ou du GPNA permet d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro* et/ou *in vivo* dans les carcinomes de l'endomètre (Marshall et al., 2017), les cancers du sein triple-négatifs (van Geldermalsen et al., 2016), de la prostate (Wang et al., 2015a), et les NSCLC (Wang et al., 2015a) pour ne citer qu'eux. Ces résultats encourageants devront être confirmés par des études cliniques, inexistantes pour le moment.

E. Les stratégies de déplétion en glutamine au niveau systémique

Une première approche, testée il y a près de 40 ans, visant à diminuer la teneur en glutamine corporelle a consisté à infuser de la glutaminase (GLS) dans la circulation générale afin de diminuer les taux sanguins de glutamine et ainsi diminuer sa disponibilité pour les cellules

cancéreuses (Baskerville et al., 1980). Cette stratégie, menée sur singes, marmottes, lapins et souris, a mené à la diminution des taux de glutamine proches de l'indétectabilité. Cependant, l'approche a dû être abandonnée en raison d'effets secondaires mortels tels que des diarrhées associées à l'atrophie et la nécrose intestinales.

La glutaminase conjuguée au polyéthylène glycol (PEG-glutaminase) est mieux tolérée par les patients et est actuellement testée en clinique en association avec DON. Le co-traitement induit des effets anti-tumoraux encourageants observés chez des patients atteints de tumeurs solides (essais de phase I et II dont les résultats ont été publiés dans la revue Journal of Clinical oncology, non accessibles sur pubmed: PMID 28022634 et 27947770).

Une autre manière d'induire une dépletion en glutamine est d'utiliser la L-asparaginase, enzyme présentant également une activité glutaminase. Elle est actuellement employée dans le traitement des leucémies aigües lymphoblastiques, et de certains lymphomes non Hodgkiens. La L-asparaginase catalyse l'hydrolyse de la L-asparagine en acide aspartique et ammoniac, résultant en une diminution sanguine de L-asparagine. Certains lymphoblastes leucémiques qui ont un taux de L-asparagine synthétase très bas ne peuvent synthétiser la L-asparagine de novo. L'utilisation de cette enzyme induit donc leur mort. Cependant, il a également été montré que l'efficacité anticancéreuse de la L-asparaginase s'explique aussi par sa capacité à induire une diminution en glutamine dans le sang (Zheng et al., 2017), et s'avère efficace dans le traitement de cellules cancéreuses dépendantes de la glutamine (Sugimoto et al., 2015). L'utilisation d'asparaginase conjuguée au polyéthylène glycol (PEG-asparaginase) est mieux tolérée par les patients, car elle induit moins de réactions d'hypersensibilité en raison de son immunogénicité plus faible (Zheng et al., 2017).

F. Les inhibiteurs d'isocitrate déshydrogénases (IDH)

Nous avons vu que la glutamine pouvait être une source de carbone alternative au cycle du TCA pour alimenter la synthèse des acides gras, via la carboxylation réductive, processus faisant intervenir les isocitrate déshydrogénases 1 et 2 (IDH1/2). Des mutations de gain de fonction des IDH1/2, trouvées dans des tumeurs solides mais également chez 20% des patients atteints de leucémies myéloïdes aiguës (AML) aboutissent à l'accumulation intracellulaire de l'oncométabolite 2-hydroxyglutarate (2HG) qui cause des dérégulations épigénétiques et des blocages dans les processus de différenciation cellulaire menant au cancer. Des études

précliniques récemment menées ont montré que l'inhibiteur AG-221 spécifique de l'IDH2 (Kats et al., 2017) induisait la différenciation de blastes malins d'AML (Yen et al., 2017). Actuellement, une étude de phase 1, deux études de phase 2 et une étude de phase 3 sont menées sur des patients atteints d'AML et présentant des mutations d'IDH2 pour tester la toxicité et l'efficacité de l'inhibiteur AG-221 chez les patients (source : <https://www.clinicaltrials.gov>). L'inhibiteur AG-120 spécifique de l'IDH1 a quant à lui été testé cliniquement (essai de phase 1) sur des patients atteints d'AML mutés pour IDH1. Des résultats très concluants, menant dans certains cas, à des rémissions complètes et rapides, ont déjà été observés lors d'une étude de phase 1/2 (2015; Birendra and DiNardo, 2016). Une étude de phase 3, testant l'AG-120 en association avec l'azacitidine chez des porteurs d'AML mutés pour IDH1, initiée en mai 2017, est actuellement en phase de recrutement de patients (NCT03173248).

Cette thérapie est également testée chez des patients atteints de cholangiocarcinomes portant des mutations d'IDH1 lors d'une étude de phase 3 (NCT02989857).

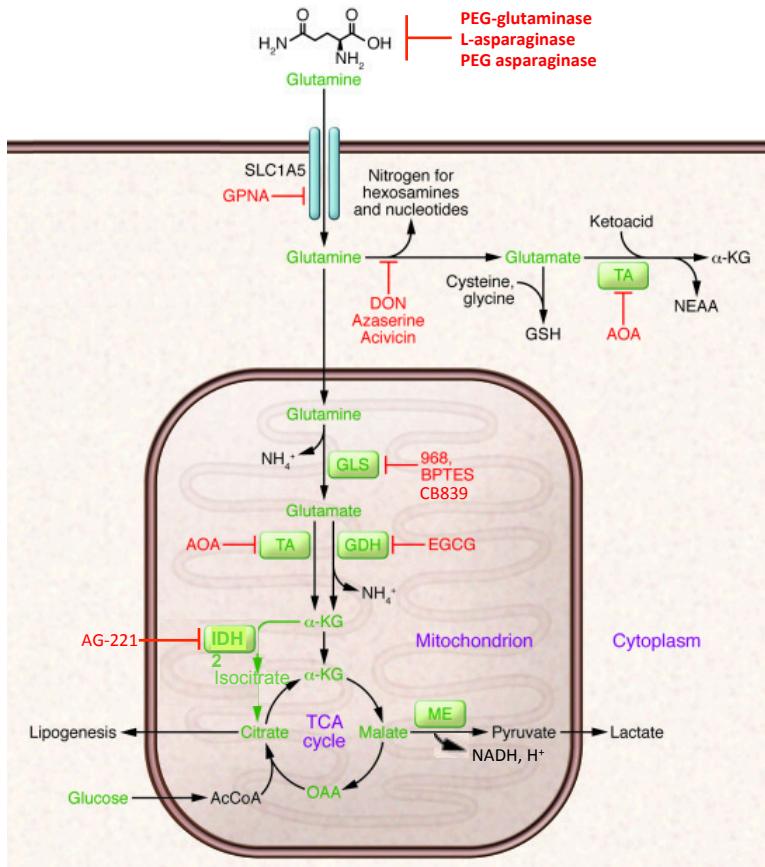


Figure 15: Le métabolisme de la glutamine est une cible pour la thérapeutique des cancers
(Modifié d'après Hensley et al., 2013)

Avant son entrée dans la cellule, des stratégies thérapeutiques utilisant enzymes peuvent diminuer la glutamine systémique (PEG-glutaminase, L-asparaginase, PEG asparaginase). La Glutamine est importée dans la cellule notamment via le transporteur SLC1A5 (SLC1A5 : solute carrier family 1 member 5), cible du GPNA (L-γ-glutamyl-p-nitroanilide). Les enzymes de l'utilisation de glutamine sont indiquées en vert, et les inhibiteurs qui les ciblent sont notés en rouge. Les flèches vertes indiquent la voie de carboxylation réductive. AcCoA, acetyl-CoA; AOA, aminoxyacetate ; BPTES, Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide; DON, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine; EGCg, epigallocatechin gallate ; GDH, Glutamate deshydrogenase; GLS, glutaminase; GSH, glutathione; IDH2, Isocitrate deshydrogenase 2; ME, malic enzyme; OAA, oxaloacetate; TA, transaminase; 968, compound 968; α-KG, α-ketoglutarate.

Ainsi, nous avons vu dans ces deux premières sous-parties, que le ciblage du métabolisme des cellules cancéreuses, et en particulier celui de la glutamine, permettait de tuer les cellules cancéreuses et limiter la croissance tumorale. Nous allons voir dans une dernière sous-partie, que le ciblage du métabolisme peut potentialiser les effets de chimiothérapies utilisées conventionnellement dans le traitement des cancers, et aboutir également à des réversions de chimiorésistances développées par les tumeurs.

3) Cibler le métabolisme pour potentialiser les effets des chimiothérapies

A. Restriction calorique, jeûne et potentialisation des effets chimiothérapeutiques

La restriction calorique (matérialisée par une réduction de l'apport calorique journalier d'environ 20 à 40% typiquement dans les études précliniques, faite sur plusieurs jours voire semaines d'affilée) et le jeûne (suppression momentanée des apports caloriques) présentent deux avantages en oncologie.

Le premier avantage se situe au niveau préventif. En effet, une méta-analyse, réalisée sur des études précliniques ayant pour modèle des rongeurs, a permis d'évaluer l'impact de la restriction calorique sur la survenue de multiples cancers; les résultats obtenus démontrent une diminution de 75,5% de l'incidence de toutes tumeurs confondues dans les modèles murins (Lv et al., 2014). En outre, l'institut national du vieillissement et l'université du Wisconsin ont mis en exergue une réduction significative de l'incidence des cancers sur des singes subissant une restriction calorique par rapport à des singes contrôles (Mattison et al., 2017).

Le deuxième avantage se situe au niveau thérapeutique. En effet, il a été montré que des jeûnes de 24 à 60 heures permettaient d'améliorer l'efficacité anti-tumorale des traitements par différentes chimiothérapies, et en même temps d'en diminuer les effets secondaires. En effet, plusieurs études ont révélé que le jeûne pouvait améliorer l'efficacité des thérapies utilisant l'étoposide (Raffaghello et al., 2008), la mitoxantrone et l'oxaliplatine (Pietrocola et al., 2016), le cisplatine, la doxorubicine et les cyclophosphamides (Lee et al., 2012), ainsi que la gemcitabine (Safdie et al., 2009) dans des modèles de souris développant des neuroblastomes, fibrosarcomes, gliomes, mélanomes, cancers ovariens, pancréatiques et du sein. Ces potentialisations des effets chimiothérapeutiques seraient notamment dues à une augmentation du stress oxydatif et des dommages à l'ADN induits par le jeûne. Il a également été montré que le jeûne régulait l'expression des gènes à expression circadienne, notamment impliqués dans la réponse au stress oxydatif et la réparation des dommages à l'ADN (Longo and Panda, 2016). En outre, des études ont révélé que l'heure d'administration des traitements chimiothérapeutiques influait sur leur efficacité (Sancar et al., 2015). Ainsi, le jeûne pourrait améliorer les effets chimiothérapeutiques, en partie en contrôlant le rythme circadien.

Rafaghello et al. ont montré que le jeûne de court terme induisait des réponses différentes à la chimiothérapie dans les cellules saines par rapport aux cellules cancéreuses (Raffaghello et al.,

2008). En effet, dans les cellules saines, le jeûne induit une diminution des intervenants des voies de signalisation de croissance tels que Ras, Akt et IGF-1 (insulin like growth factor 1), ce qui les protège ainsi de la toxicité induite par les thérapies, qui sont surtout efficaces sur des cellules en divisions et croissance actives. Par contre, comme nous l'avons vu dans la deuxième partie de cette introduction, il est connu que les cellules cancéreuses deviennent indépendantes du milieu extérieur pour leur croissance, en raison de mutations constitutives au niveau de ces voies de signalisation. Ainsi, les cellules cancéreuses ne subissent pas l'inactivation de ces voies dues au jeûne, et restent donc vulnérables aux traitements cytotoxiques par chimio- ou radiothérapie. Rafaghello et al. ont ainsi énoncé le concept de résistance différentielle au stress (differential stress resistance, DSR) pour caractériser ces réponses différentes à la chimiothérapie induites par le jeûne. Alors que les études pré-cliniques tendent à démontrer un réel bénéfice du jeûne sur les effets des chimiothérapies, les études cliniques tardent à se mettre en place, en raison d'effets secondaires délétères (cachexie, sarcopénie) induites par le jeûne ou la restriction calorique, plus difficilement tolérables chez des patients déjà amaigris par les traitements chimiothérapeutiques. Les résultats d'une étude préliminaire réalisée sur dix patients atteints de cancers affectant des organes divers tels que l'oesophage, la prostate, les poumons, et le sein (Safdie et al., 2009) ayant jeûné pendant 48 à 140 heures avant et 5 à 56 heures après l'administration de chimiothérapie ont révélé une amélioration significative des effets secondaires des chimiothérapies, sans en altérer l'efficacité. Enfin, les récents résultats d'un essai clinique associant des jeûnes de 24, 48 ou 72 heures à la prise de cisplatine ont montré que le jeûne était faisable en toute sécurité dans ces conditions (Safdie et al., 2009). Des essais cliniques réalisés sur un plus grand nombre de patients permettront de confirmer ces résultats et de mesurer si les effets chimiothérapeutiques anti-cancéreux peuvent être potentialisés chez l'humain dans ces conditions.

La restriction calorique et le jeûne constituent des approches globales intéressantes, permettant d'agir sur le métabolisme des patients, et de potentialiser les effets chimiothérapeutiques. Parallèlement à ces approches globales, des traitements ciblant une voie métabolique en particulier ont été administrés en association aux chimiothérapies chez des patients, afin de potentialiser les effets des traitements, ou de contrer les résistances développées par les patients consécutivement aux traitements par chimiothérapie conventionnelle. Ceci nous intéresse, notamment dans le cas de patients résistants au cisplatine, étant donné que nos recherches se sont portées sur les altérations métaboliques caractéristiques des cellules résistantes au cisplatine.

B. Cibler le métabolisme pour contourner les résistances chimiothérapeutiques

Les altérations métaboliques décrites dans les cellules cancéreuses participent au processus d'oncogénèse; de récents travaux suggèrent que l'effet Warburg, l'augmentation de synthèse d'acides gras ou encore l'excès de glutaminolyse seraient également liés à des résistances chimiothérapeutiques, menant aux échecs des traitements (Zhao et al., 2011) (Kant et al., 2014). En outre, de récentes études indiquent également que les traitements prolongés à base de chimiothérapies pourraient eux même provoquer des modifications métaboliques dans les cellules cancéreuses, menant à des résistances induites (Sullivan et al., 2014). Ainsi, le ciblage des voies métaboliques permettrait de contourner ces résistances et les co-traitements composés d'inhibiteurs métaboliques associés aux chimiothérapies classiques permettraient de potentialiser les effets de ces dernières. Cette partie n'a pas vocation à spécifier de façon exhaustive tous les traitements métaboliques ayant un impact sur le succès thérapeutique des chimiothérapies, mais à évoquer la multiplicité des mécanismes explicitant les relations entre modulations métaboliques, succès chimiothérapeutique et chimiorésistance.

Le ciblage des enzymes glycolytiques. Les changements métaboliques exhibés par les cellules cancéreuses peuvent provenir d'une part des processus oncogéniques évoqués précédemment (partie II), mais peuvent également résulter, d'autre part, de processus adaptatifs développés par les cellules cancéreuses en réponse à des traitements chimiothérapeutiques. Nous allons voir plusieurs cas d'altérations métaboliques dans la voie de la glycolyse induites par une exposition prolongée à des chimiothérapies. C'est le cas de cellules de glioblastome traitées *in vitro* au long terme par du temozolamide, induisant une résistance *in vivo*, notamment via la sur-régulation de GLUT3 (Glucose Transporter 3). Ceci suggère que l'association d'un inhibiteur sélectif de GLUT3 et du témozolamide pourrait contourner ou retarder le processus d'acquisition de la résistance (Le Calve et al., 2010).

L'inhibition non sélective de l'hexokinase avec du 2-désoxy-D-glucose (2-DG), déjà testée en monothérapie, pourrait être utilisé dans le cadre de tumeurs résistantes au cisplatine. En effet, il semblerait que des cellules exposées au cisplatine longuement, et devenues résistantes, présentent une diminution de l'hexokinase II (Sullivan et al., 2014) en comparaison à leurs analogues sensibles au cisplatine ; Les altérations glycolytiques spécifiques aux cellules résistantes les rendent spécifiquement sensibles au 2-DG

(Sullivan et al., 2014). L'association du cisplatine et du 2-DG n'est pas encore testée en clinique pour le moment.

L'utilisation du trastuzumab, anticorps monoclonal humanisé dirigé contre les récepteurs HER2-Neu surexprimés dans les cellules cancéreuses de 20% des patientes atteintes de cancers du sein, inhibe quant à lui la glycolyse notamment via la diminution de la lactate déshydrogénase A (LDHA) (Zhao et al., 2011). Il a également été montré que les cellules résistantes au trastuzumab (résistance acquise suite à l'exposition prolongée à l'anticorps) présentent une augmentation de la prise de glucose et de la production de lactate. Ainsi, l'association du trastuzumab au 2-DG paraît être une option thérapeutique efficace pour diminuer davantage la glycolyse et cibler au mieux les altérations métaboliques de ces cellules, menant à leur mort (Zhao et al., 2011).

Dans des cellules de leucémies et de myélomes multiples, une augmentation de la glycolyse induit une augmentation de l'ATP, ce qui active les transporteurs ABC. Cela confère à ces cellules une résistance à la doxorubicine et la daunorubicine via l'augmentation de l'efflux des drogues par les ABC. Le co-traitement de ces cellules et tumeurs par le 3-bromopyruvate (3-BP) associé à la chimiothérapie induit une diminution intracellulaire de l'ATP et de l'activation des transporteurs ABC, ce qui augmente la rétention intracellulaire des chimiothérapies et favorise l'apoptose cellulaire et la suppression de la croissance tumorale (Nakano et al., 2011).

Pour le moment, aucune étude clinique n'a démontré le bénéfice de l'association du 2-DG ou du 3-BP à une chimiothérapie conventionnelle, mais des essais de phase 1 ont permis de montrer que l'association du 2-DG au docetaxel était tolérable et n'induisait pas de toxicité majeure chez les patients (NCT00096707). Des études de phase ultérieures seront donc requises pour valider l'utilité de telles associations.

La pyruvate déshydrogénase (PDH), responsable de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA, est la cible de la deshydrogénase kinase (PDK), qui phosphoryle PDH pour l'inhiber. Le dichloroacétate (DCA), qui inactive PDK et réactive PDH, provoque un basculement métabolique au sein des cellules, depuis la glycolyse vers la respiration mitochondriale. Les essais précliniques effectués avec le DCA ont montré son efficacité sur des tumeurs de diverses origines tissulaires en induisant l'apoptose (Michelakis et al., 2008). Les premiers essais cliniques testant la toxicité du DCA chez des patients atteints de gliomes et de NSCLC ont démontré peu d'effets secondaires dans le premier cas (Dunbar et al., 2014), mais peu de probabilités d'efficacité dans le second (Garon et al., 2014) suggérant plutôt l'utilisation du DCA en association avec d'autres chimiothérapies telles que le cisplatine (Dunbar et al., 2014), le 5-fluorouracile (Tong et al., 2011) ainsi que le tamoxifène et l'omeprazole (Ishiguro et al., 2012). Cette dernière association a d'ailleurs été testée sur un patient atteint de cholangiocarcinome et a permis la stabilisation de la maladie pendant trois mois (Ishiguro et al., 2012). Le faible coût, et

la faible toxicité du DCA en font un inhibiteur métabolique de choix pour les futurs essais cliniques.

Le ciblage de la voie de synthèse des acides gras.

Nous avons vu dans la partie II que l'orlistat cible l'enzyme FASN, menant à la synthèse des acides-gras. L'emploi de cet inhibiteur induit une modification du pH environnant en agissant sur des régulateurs du pH situés au niveau membranaire. L'expression des protéines MDR (Multi drug resistance proteins, appartenant à la famille des protéines ABC) étant notamment régulée par le pH, l'augmentation du pH induit par l'orlistat provoque une diminution de l'expression des protéines MDR. La potentialisation des effets du cisplatine en association à l'orlistat pourrait donc être expliquée, entre autre, par ce mécanisme (Kant et al., 2014).

Dans une autre étude, il a été montré que l'inhibition de la FASN par la cerulénine affecte la formation des radeaux lipidiques au sein de la membrane plasmique, or ces radeaux colocalisent avec des clusters des récepteurs HER2-Neu, cibles du Trastuzumab. Le traitement par la cerulénine de cellules résistantes au Trastuzumab induit l'internalisation et la dégradation des récepteurs HER2-Neu, empêchant leur adressage vers la membrane plasmique, ce qui améliore les effets anti-tumoraux du Trastuzumab (Menendez et al., 2005).

Ainsi, l'association d'inhibiteurs de FASN et du trastuzumab paraît être une nouvelle option thérapeutique intéressante. Un nouvel essai clinique de phase 1, mis en place en juin 2017, testera justement cette association sur des patients présentant des cancers du sein HER2-Neu avancés (NCT03179904).

Le ciblage du métabolisme de la glutamine pour contrer la résistance au cisplatine.

Au cours de ma thèse, nos recherches se sont focalisées sur le rôle de la glutamine dans le métabolisme altéré des cellules résistantes au cisplatine. De ce fait, nous nous limiterons, pour cette dernière sous-partie de l'introduction, à mentionner les travaux de ciblage du métabolisme de la glutamine dans les cellules résistantes au cisplatine.

Nous avions vu précédemment que la glutamine était impliquée dans la synthèse du glutathion et du NADPH, ayant tous deux des rôles clés pour diminuer l'oxydation. De façon intéressante, Godwin et al. ont montré que les niveaux de glutathion intracellulaires corrélaient avec la tumorigénèse et avec la résistance aux chimiothérapies, notamment au cisplatine (Godwin et al., 1992). Ces données se sont également confirmées dans un modèle de gliome, dans lequel les cellules Cis-R présentaient des niveaux en glutathion plus élevés par rapport à leurs analogues

Cis-S (Rocha et al., 2014). En outre, les auteurs de cette même étude ont montré que le traitement des cellules Cis-R avec le BSO (buthionine sulfoximine, BSO), un inhibiteur du glutathion, potentialisait fortement la mort des cellules Cis-R en réponse au cisplatine. La teneur en glutathion intracellulaire pourrait donc constituer un bon biomarqueur de la résistance au cisplatine dans les gliomes.

Nous avons également vu dans la partie II de l'introduction que la glutamine était impliquée dans la régulation de l'autophagie via son action sur mTORC1. Kamata et al. ont montré que la rapamycine, inhibiteur de mTORC1, potentialisait les effets antitumoraux du cisplatine à la fois *in vitro* et *in vivo* dans un contexte de carcinome gastrique résistant au cisplatine (Kamata et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré que l'autophagie était un mécanisme protecteur dans des cellules de cancer oesophagien résistantes au cisplatine, et que l'inhibition de l'autophagie dans ces cellules augmenterait l'efficacité du cisplatine dans ce contexte de résistance (Cheng et al., 2017).

Ainsi, au cours de cette introduction générale, nous avons vu qu'il existait de multiples mécanismes de résistance au cisplatine. Pour poursuivre, nous avons vu que les cellules cancéreuses présentaient des altérations très variées au niveau des voies de biosynthèses des macromolécules et de la génèse d'énergie. Enfin, nous avons vu qu'il était possible de cibler ces anomalies métaboliques afin de tuer les cellules cancéreuses et ainsi empêcher la croissance tumorale. Nous avons terminé cette introduction sur le potentiel ciblage des anomalies métaboliques pour tuer les cellules résistantes aux chimiothérapies en particulier. Durant ma thèse, nous nous sommes intéressés aux anomalies métaboliques présentées spécifiquement par les cellules résistantes au cisplatine, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux altérations concernant le métabolisme de la glutamine au sein de ces cellules, et à leurs conséquences sur la synthèse des nucléotides.

OBJECTIFS

Les objectifs de ma thèse étaient d'identifier des altérations métaboliques présentes dans les cellules cancéreuses résistantes au cisplatine (Cis-R) qui les distinguent des cellules parentales sensibles au cisplatine, de mettre en évidence des vulnérabilités liées à ces changements métaboliques, et d'en caractériser les mécanismes impliqués afin de pouvoir cibler spécifiquement les cancers résistant au cisplatine qui constituent un obstacle thérapeutique majeur. Cette étude s'est décomposée en plusieurs étapes:

- 1) Le criblage pharmacologique contenant une vingtaine d'inhibiteurs du métabolisme, permettant de mettre en évidence les agents pharmacologiques induisant d'avantage de mort dans les cellules résistantes au cisplatine en comparaison à leurs analogues sensibles.
- 2) L'étude d'une des voies métaboliques identifiée comme étant altérée dans les cellules résistantes au cisplatine: nous avons choisi d'explorer le métabolisme de la glutamine dans les cellules Cis-R.
- 3) La validation de l'efficacité anticancéreuse d'inhibiteurs métaboliques ciblant cette voie dans plusieurs lignées cellulaires Cis-R.
- 4) La validation de l'efficacité antitumorale de ces inhibiteurs métaboliques *in vivo* sur la croissance de xénogreffes Cis-R.

RESUME

Le cisplatine est l'agent chimiothérapeutique le plus largement utilisé pour le traitement de la majorité des tumeurs solides, et la résistance des cellules néoplasiques à ce composé cytotoxique pose un problème majeur en oncologie clinique. Ici, nous avons exploré les vulnérabilités métaboliques potentielles de lignées cellulaires du cancer du poumon non à petites cellules résistantes au cisplatine. Il s'est avéré que les clones résistants au cisplatine (Cis-R) étaient plus sensibles à la mort induite par la privation nutritionnelle *in vitro* et *in vivo* en comparaison à leurs contrôles parentaux sensibles au cisplatine (Cis-S). La susceptibilité des cellules Cis-R à la privation nutritionnelle pourrait s'expliquer par une dépendance particulièrement forte vis-à-vis de la glutamine. La déplétion en glutamine était suffisante pour restaurer la sensibilité au cisplatine des clones initialement résistants, et la supplémentation en glutamine a permis le sauvetage des clones Cis-R de la mort induite par la privation nutritionnelle. Les analyses du métabolome par spectrométrie de masse et les interventions spécifiques sur le métabolisme de la glutamine ont révélé que, dans les cellules Cis-R, la glutamine est surtout nécessaire pour la biosynthèse des nucléotides plutôt que pour les réactions anaplérotiques, bioénergétiques ou redox. En conséquence, les cancers Cis-R sont devenus extrêmement sensibles au traitement par des antimétabolites ciblant le métabolisme des nucléosides.

ABSTRACT

Cisplatin is the most widely used chemotherapeutic agent, and resistance of neoplastic cells against this cytotoxicant pose a major problem in clinical oncology. Here, we explored potential metabolic vulnerabilities of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer and ovarian cancer cell lines. Cisplatin resistant clones were more sensitive to killing by nutrient deprivation in vitro and in vivo than their parental cisplatin-sensitive controls. The susceptibility of cisplatin-resistant cells to starvation could be explained by a particularly strong dependence on glutamine. Glutamine depletion was sufficient to restore cisplatin responses of initially cisplatin-resistant clones, and glutamine supplementation rescued cisplatin resistant clones from starvation-induced death. Mass spectrometric metabolomics and specific interventions on glutamine metabolism revealed that, in cisplatin-resistant cells, glutamine is mostly required for nucleotide biosynthesis rather than for anaplerotic, bioenergetic or redox reactions. As a result, cisplatin-resistant cancers became exquisitely sensitive to treatment with antimetabolites that target nucleoside metabolism.

RESULTS

Cisplatin-resistant cancer cells are sensitive to starvation.

To identify potential metabolic vulnerabilities linked to cisplatin (CDDP) resistance, we comparatively assessed cell death induction (indicated by a DiOC₆(3)-detectable loss of the mitochondrial transmembrane potential, $\Delta\Psi_m$, alone or accompanied by a propidium iodide [PI]-detectable loss of plasma membrane integrity) in human A549 non-small cell lung cancer (NSCLC) cells that were either wild type (WT) (i.e. parental) or CDDP-resistant (clones R2 and R4). These CDDP-resistant cells had been derived from WT cells by continuous culture in CDDP for several months. WT, R2 and R4 cells were exposed to a variety of microtubule and metabolic inhibitors. The largest differential susceptibility was observed when the cells were cultured in nutrient-free conditions (NF), i.e. Earle's balanced salt solution (EBSS), which contains no nutrients with the exception of a minimal glucose level of 5.6 mM (Fig. 1A). CDDP-resistant cells died in EBSS much more than CDDP-sensitive counterparts did (Fig. 1A and B). Moreover, CDDP-resistant cells were more susceptible to cell death induction by microtubule inhibitors (paclitaxel, nocodazole, rotenone), caloric restriction mimetics (C646, spermidine, salicylate), the absence of glucose (or the inhibition of glucose phosphorylation by 2-deoxyglucose) and lipid-lowering medication (by means of lipid synthesis inhibitor 5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid (TOFA) or the statin simvastatin). No differences were found for inhibitors of oxidative phosphorylation (antimycin A, metformin, oligomycin) suggesting that the selective susceptibility to rotenone was related to its capacity to inhibit microtubule assembly rather than its inhibitory effects on respiratory chain complex 1 (C1) (Meisner and Sorensen, 1966) (Supplementary Fig.S1A). Of note, the selective susceptibility of CDDP-resistant cells to nutrient depletion could be observed in vivo as well. Thus, A549 R4 tumors developing in immunodeficient mice reduced their growth in response to periodic starvation (24 hours of fasting twice per week), while parental A549 tumors were not affected by this regimen (Fig. 1C and D). Accordingly, periodic starvation was able to prolong the survival of mice bearing xenografted CDDP-resistant but not parental NSCLC (Supplementary Fig. S1B and S1C).

The susceptibility of cancer cells to starvation-induced cell death correlated with the accumulation of the PARP product PAR. Thus CDDP-resistant clones with high PAR levels (R2, R3, R4, R5) were particularly sensitive to culture in EBSS, while the clone with low PAR level

(R1) and parental WT cells were relatively resistant (Fig. 2A and B). Inhibition of the enzymatic activity of PARP with three distinct agents (PJ-34, BMN-673, ABT-888), leading to a strong reduction in intracellular PAR levels (Supplementary Fig. S2A), failed to reverse the killing of R2 and R4 cells by culture in EBSS (Supplementary Fig. S2B-D). This excludes the possibility that the hyperactivation of PARP would directly cause the selective vulnerability of such cells to starvation-induced death. Importantly, the selective susceptibility of CDDP resistant cells to EBSS was observed for other pairs of sensitive *versus* resistant human NSCLC lines such as H460, H1650 and mouse lung cancer line TC-1 (Fig. 2C-E). Pharmacological inhibitors of necroptosis (necrostatin 1) and apoptosis (Z-VAD-fmk) variably reduced cell death induction by EBSS, especially if they were combined (Fig. 2F). Knockdown of pro-apoptotic proteins from the BCL2 family (BAK, BAX, PUMA) reduced killing of R2 and R4 cells by EBSS, while knockdown of MCL1, which is anti-apoptotic, accelerated killing by EBSS (Supplementary Fig. S2E and S2F). These results suggest the involvement of the mitochondrial cell death pathway in starvation-induced cell death of CDDP-resistant cancer cells.

Glutamine dependency of cisplatin-resistant cancer cells.

Next, we attempted to determine which specific nutrients might rescue CDDP-resistant cancer cells from death occurring in EBSS. Glutamine (GLN) turned out to be the most effective agent to close-to fully suppress the death of R2 or R4 cells in EBSS (Fig. 3A and B). Glutamate (GLU) had a smaller but still significant effect, while the cell-permeable α -ketoglutarate precursor, dimethyl α -ketoglutarate, exhibited rather partial effects. In contrast, glucose, amino acids, the cell-permeable pyruvate derivative, 3-methyl pyruvate, polyamines, and glutathione-replenishing agents (glutathione ester or N-acetylcysteine) failed to reverse the lethal effects of EBSS (Fig. 3A). The effects of GLN were obtained at relatively low doses (20 μ M) at which GLU had no effects (Fig. 3C). The rescue by GLN was observed in multiple CDDP-resistant human and mouse cancer cell lines (Fig. 3C-F).

In the subsequent step, we determined whether GLN withdrawal from the medium would be sufficient to kill CDDP-resistant cells. While this was not the case, GLN depletion was sufficient to reestablish CDDP-induced killing of a priori CDDP-resistant cells. Thus, A549 R2 and R4 clones, as well as other CDDP resistant cells (such as the NSCLC H460 R cell line and the ovarian carcinoma TOV 112D R line) became susceptible to CDDP-induced cell death when they were cultured in the absence of GLN (Fig. 4A-G, and Supplementary Fig. S3A and S3B).

Of note, fasting of mice for 24h (which reduced the growth of CDDP-resistant tumors, see above, Fig. 1D) led to a reduction of plasma GLN (but not glucose) levels (Supplementary Fig. S3C). In conclusion, it appears that the abundance of GLN has a major impact on the cytotoxicity of CDDP, in particular in cells that have been selected for CDDP resistance.

Glutamine-fueled nucleoside synthesis in cisplatin resistance.

To understand the mechanism through which GLN rescues CDDP-resistant cells from starvation-induced death, we resorted to mass spectrometric metabolomics. We compared the levels of metabolites detectable in EBSS (i.e. in conditions of starvation, also referred as nutrient-free condition, NF) with those found in complete medium (control, CTL) or in EBSS supplemented with 2 mM GLN (NF+GLN). As expected (Zhang et al., 2017), GLN was particularly efficient in replenishing its amino acid derivatives alanine, asparagine and GLU, the GLU metabolite α -ketoglutarate, some intermediates of the Krebs cycle (fumarate, malate) and glutathione (written in red in Fig. 5A). Of note, in normal culture conditions, resistant clones were characterized by a relative depletion of Krebs cycle intermediates (α -ketoglutarate, fumarate, malate, citrate/isocitrate, oxaloacetate/pyruvate) when compared to parental A549 cells (Fig. 5B, and Supplementary Fig. S4A). Driven by these observations, we explored the mechanisms through which GLN rescues CDDP resistant cells. To fuel the Krebs cycle, intracellular GLN must be converted to GLU (which is the precursor of the anaplerotic substrate α -ketoglutarate). This amidohydrolase reaction is catalyzed by glutaminase (GLS) (Fig. 5C). We therefore expected that GLS inhibition by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide 3 (BPTES) would abolish the rescue effect of GLN. In stark contrast, however, BPTES failed to counteract the pro-survival action of GLN on CDDP-resistant cells cultured in EBSS. Rather, BPTES reduced the mortality of R2 and R4 cells in EBSS as it reduced the intracellular GLU concentrations (in WT, R2 and R4 cells) while it tended to augment GLN (in WT cells) (Fig. 5D and E). Similarly, another pharmacological GLS inhibitor, compound 968 (C968) reduced the killing of R2 and R4 cells by starvation (Supplementary Fig. S4B). Finally, knockdown of GLS with two distinct, non-overlapping siRNAs (Supplementary Fig. S4C) partially rescued R2 and R4 cells from the cytotoxic consequences of starvation (Fig. 5F and Supplementary Fig. S4D).

Based on the aforementioned results, we speculated that GLN-fueled nucleoside biosynthesis (which does not require the action of GLS and actually would be favored by GLS inhibition, Fig.

5c) might account for its rescue effect on starved CDDP-resistant cells. Indeed, GLN was able to normalize the intracellular concentration of succinyl adenosine (a precursor of AMP), adenosine monophosphate (AMP), adenosine diphosphate (ADP) and adenosine triphosphate (ATP) in CDDP resistant cells cultured in nutrient-free conditions (Fig. 6A-D). Similarly, GLS inhibition by BPTES resulted in a significant elevation of AMP and uridine monophosphate (UMP) in R2 and R4 cells (Supplementary Fig. S4E). Direct addition of nucleosides (and in particular a mixture of all four ribonucleosides: adenosine, guanosine, uridine and cytidine [AGUC]) rescued all tested CDDP-resistant NSCLC lines from starvation-induced killing. Ribonucleosides were more efficient than their deoxyribonucleoside derivatives (Fig. 6E and F).

Altogether, these results suggest that GLN rescues CDDP-resistant cells from starvation-induced death by elevating the intracellular concentrations of nucleosides rather than by fueling anaplerotic reactions.

Selective susceptibility of cisplatin-resistant cells to antimetabolites targeting nucleotide biosynthesis.

We next explored the possibility that CDDP-resistant cells might be particularly vulnerable to chemotherapeutic agents that target nucleotide-related pathways such as 5-fluorouracil (5-FU, an inhibitor of thymidylate synthase) (Chon et al., 2017), clofarabine (CLO) and gemcitabine (two inhibitors of ribonucleotide reductase) (Aye et al., 2015). Upon short-term exposure (24h) to EBSS, such antimetabolites failed to kill A549 R2 and R4 cells on their own, yet counteracted the rescue effect of GLN (Fig. 7A and B). Upon long-term exposure (48h), 5-FU, CLO, cytarabine (CTB) and cladribine (2CdA), two other antimetabolites antagonizing nucleotide metabolism, killed R2 and R4 cells more efficiently than their parental equivalent (Fig. 7C and D, and Supplementary Fig. S5A and S5B). Similarly, 5-FU killed other CDDP-resistant NSCLC cell lines (H1650, H460) more efficiently than their CDDP-susceptible precursors (Supplementary Fig. S5C and S5D). Moreover, CDDP-resistant A549 tumors significantly reduced their growth upon treatment with 5-FU *in vivo*, in immunodeficient mice, contrasting with wild type tumors that barely responded to this chemotherapeutic regimen (Fig. 7E and F). Accordingly, 5-FU was able to prolong the survival of mice bearing xenografted CDDP-resistant but not parental NSCLC (Supplementary Fig. S5E and S5F). In conclusion, it appears that CDDP-resistant tumors are endowed with an exquisite sensitivity to antimetabolites targeting nucleotide biosynthesis.

FIGURES

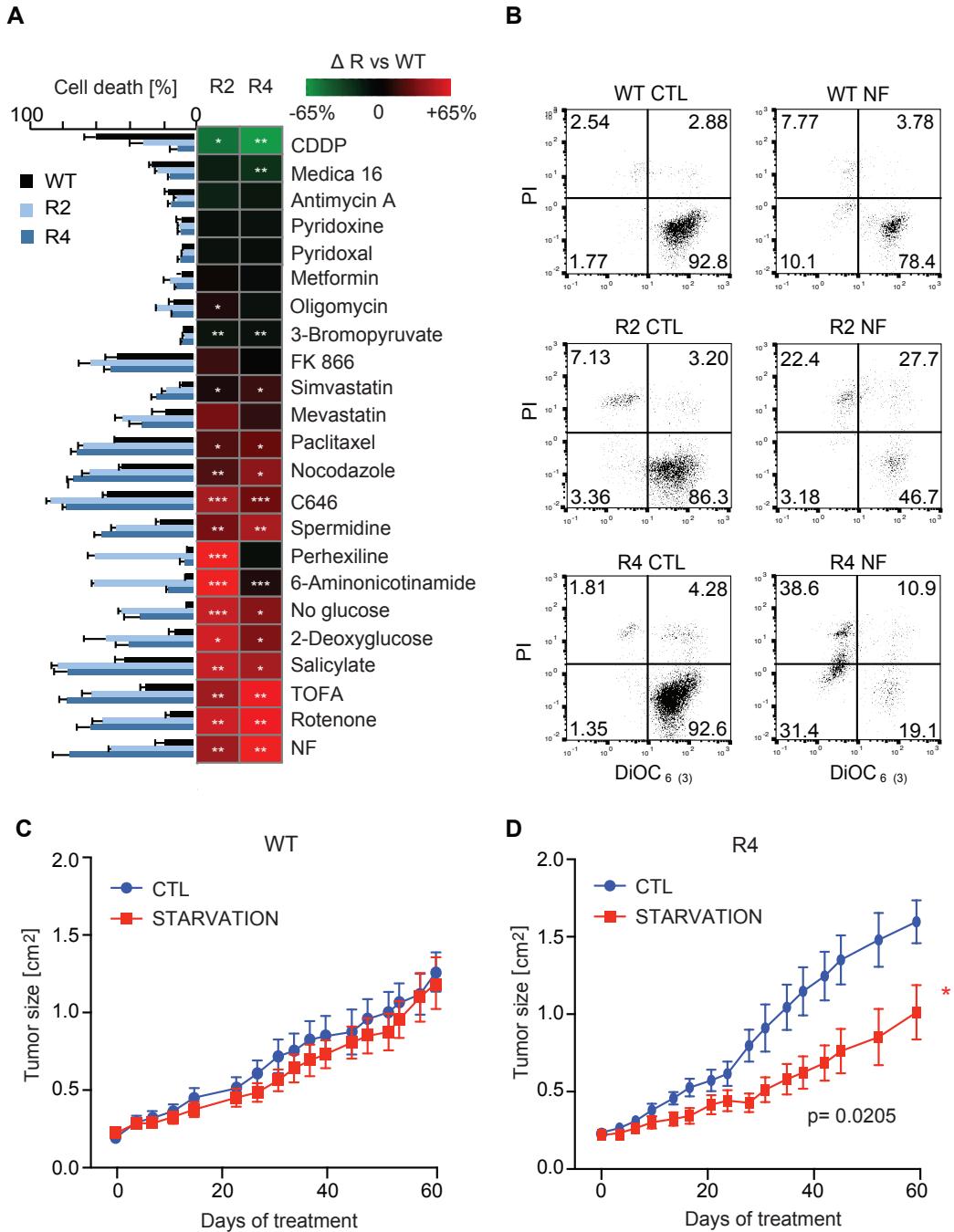


Figure 1

Figure 1. Starvation preferentially kills CDDP-resistant human A549 cells.

(A and B) Parental A549 cells (WT) and two CDDP-resistant derivatives (R2 and R4) were maintained in control condition (CTL) or treated with CDDP (30 μ M), MEDICA 16 (200 μ M), antimycin A (100 μ M), pyridoxine (2 mM), pyridoxal (2 mM), metformin (10 mM), oligomycin (10 μ M), 3-bromopyruvate (200 μ M), FK866 (500 nM), simvastatin (50 μ M), mevastatin (20 μ M), nocodazole (200 nM), paclitaxel (100 nM), C646 (50 μ M), spermidine (1mM), perhexiline (10 μ M), 6-aminonicotinamide (100 μ M), 2-deoxyglucose (80 μ M), salicylate (20 mM), TOFA (80 μ M), rotenone (1 μ M) or cultured in glucose-free or EBSS media (nutrient free, NF) for 24-48 hours. Thereafter, the cells were subjected to the flow cytometry-assisted measurement of cell death parameters upon co-staining with the vital dye propidium iodide (PI) and the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)-sensing dye DiOC₆(3) (mean \pm SEM; three independent experiments). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Student's t test), in comparison with equally treated WT cells. Representative dot plots of cells cultured in nutrient-free (NF) conditions are shown in B (numbers refer to the percentage of cells found in each quadrant).

(C and D) WT A549 cell line (C) and its CDDP-resistant derivative R4 (D) were subcutaneously xenografted into athymic nu/nu mice (12 mice in WT CTL, 11 in WT NF, 8 mice in R4 CTL and R4 NF). When tumors became palpable, mice were fed ad libitum or underwent cycles of starvation (24 hours, two-times a week). Tumor growth was routinely monitored with a standard caliper and is reported as means \pm SEM, (at least eight mice per group). *P < 0.05 (Wald test, type 2 ANOVA), as compared to mice fed ad libitum.

See also Supplementary Fig.S1.

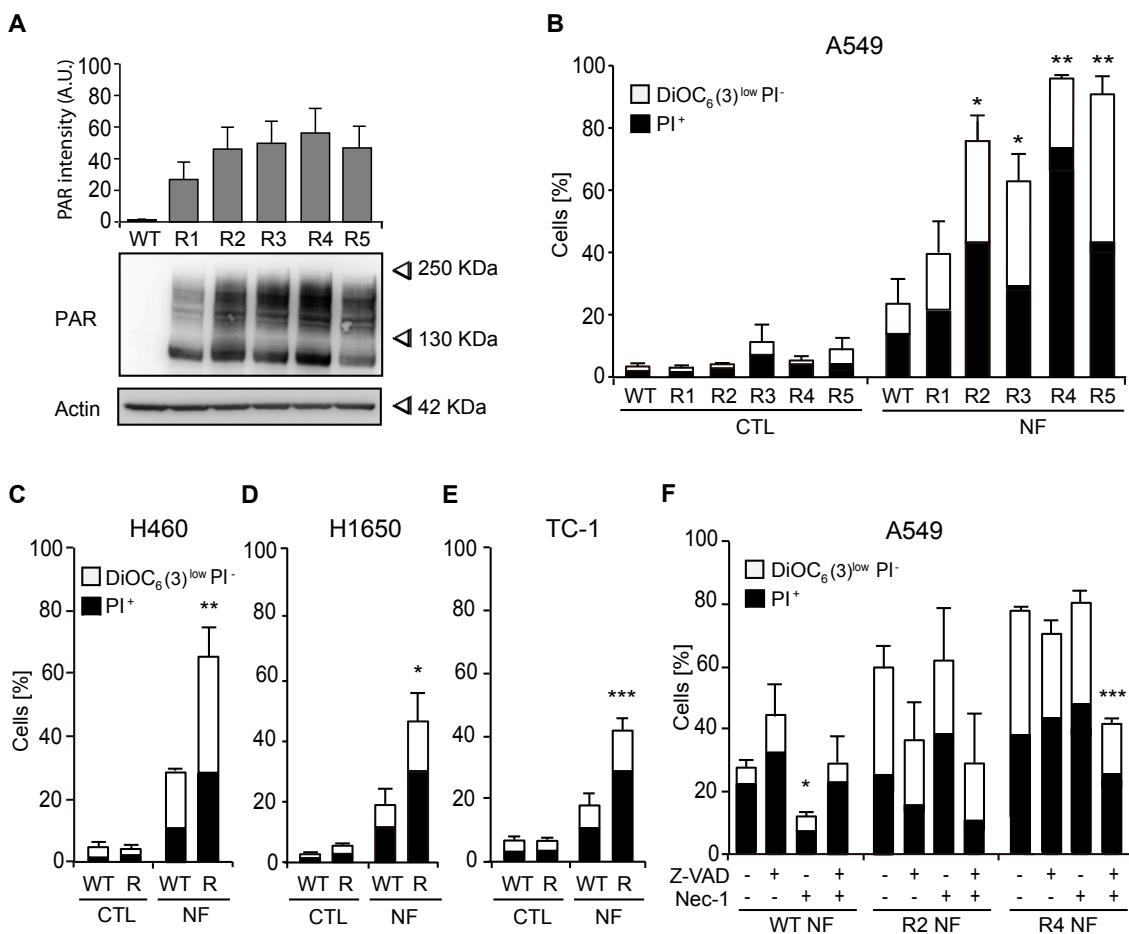


Figure 2

Figure 2. Killing of CDDP-resistant cancer cells by starvation involves the mitochondrial cell death pathway but not PARP hyperactivation.

(A) Parental WT A549 cell line and five CDDP-resistant (R1–R5) derivatives were cultured in normal growth medium and processed for the immunoblotting-based assessment of PAR-containing proteins. Actin levels were monitored to ensure equal loading of lanes. The densitometric analysis of PARylated proteins/actin ratio (upper panel; mean ± SEM, n=3) and a representative immunoblot (lower panel) are shown.

(B-E) A549 (B), H460 (C), H1650 (D) and TC-1 (E) WT and R cells were cultured in normal growth medium (CTL) or nutrient-free medium (NF) for 24 hours (B) or for 36 hours (C and D). Thereafter, the cells were subjected to the flow cytometry-assisted measurement of cell death parameters upon co-staining with the vital dye propidium iodide (PI) and the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)-sensing dye DiOC₆(3). Data represent mean ± SEM of n independent experiments (n= 3 in B, 4 in C, 5 in D, and 3 in E). *P < 0.05, **P<0.01 (Student's t test), as compared to equally treated WT cells.

(F) Cytofluorometric assessment of cell death after exposure to nutrient deprivation alone or in the presence of 30 μ M Z-VAD-fmk and/or 50 μ M Necrostatine-1 (Nec-1). DiOC₆(3)^{low}PI⁻= dying cells; PI⁺= dead cells. Mean ± SEM (n=3). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Student's t test), compared with cells of the same type exposed to nutrient deprivation alone.

See also Supplementary Fig. S2.

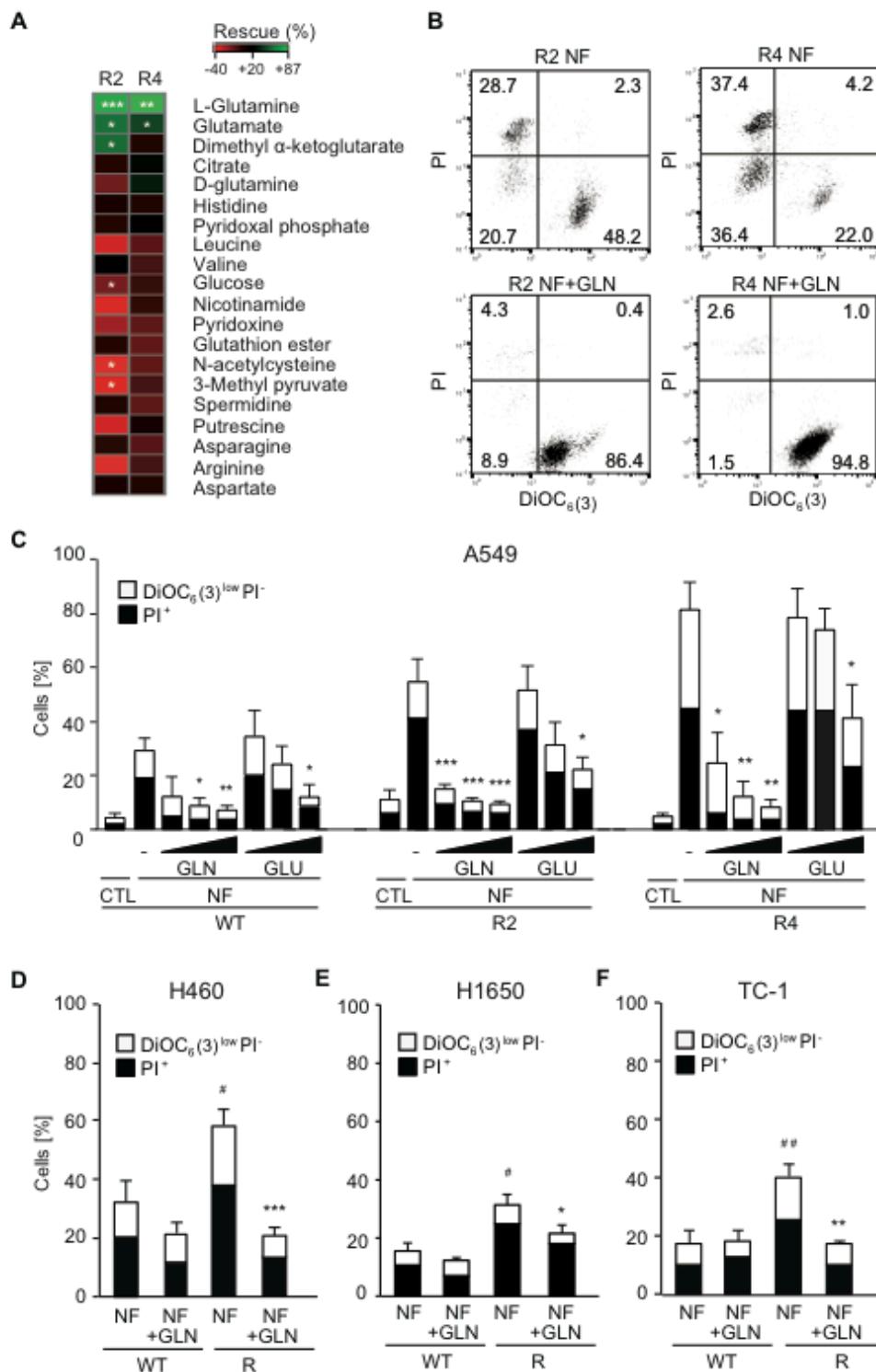


Figure 3

Figure 3. Glutamine and glutamate sustain the survival of CDDP-resistant cells during starvation.

(A and B) CDDP-resistant A549 R2 and R4 cells were cultured for 24 hours in EBSS in the absence or presence of the indicated nutrients (L-glutamine (2 mM), glutamate (2 mM), Dimethyl α ketoglutarate (1mM), citrate (1mM), D-glutamine (2 mM), histidine (0.15 mM), pyridoxal phosphate (2 mM), leucine (0.1 mM), valine (0.45 mM), glucose (5.56 mM), Nicotinamide (100 mM), pyridoxine (2 mm), glutathion ester (5 mM), N-acetylcysteine (10 mM), spermidine (30 uM), putrescine (100 uM), asparagine (0.05 mM), arginine (0.7 mM), aspartate (0.5 mM)), then processed for the cytofluorometric determination of cell death-related parameters. $P^* < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ (Student's t test; n=3), compared with cells of the same type exposed to nutrient deprivation alone. Rescue= (% of cells death in EBSS - % of cell death in EBSS supplemented with nutrient)/(% of cells death in EBSS)x100. Representative dot plots of cells cultured in EBSS medium (nutrient free, NF) in the absence or in the presence of 2 mM glutamine (GLN) are shown in B. Numbers refer to the percentage of cells found in each quadrant.

(C) A549 WT and R cells were cultured in normal growth medium (CTL) or EBSS medium (NF) and exposed to increasing concentrations (0.02, 0.2 and 2 mM) of glutamine (GLN) or glutamate (GLU) before the evaluation of the cell death-associated parameters. White and black columns depict the percentage of dying and dead cells, respectively (mean \pm SEM; n = 3). $^*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ (Student's t test), in comparison with cells of the same type in EBSS alone.

(D-F) H460 (D), H1650 (E) and TC-1 (F) WT and R cells were cultured in EBSS alone or in combination to 2 mM glutamine (GLN) for 36 hours. PI^+ = dead cells; $DiOC_6(3)^{low}$ PI^- = dying cells. Data represent mean \pm SEM of n independent experiments (n= 3 in c and f, 5 in d, and 4 in e). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (Student's t test) as compared to cells of the same type exposed to EBSS alone. $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ (Student's t test), as compared to equally treated WT cells.

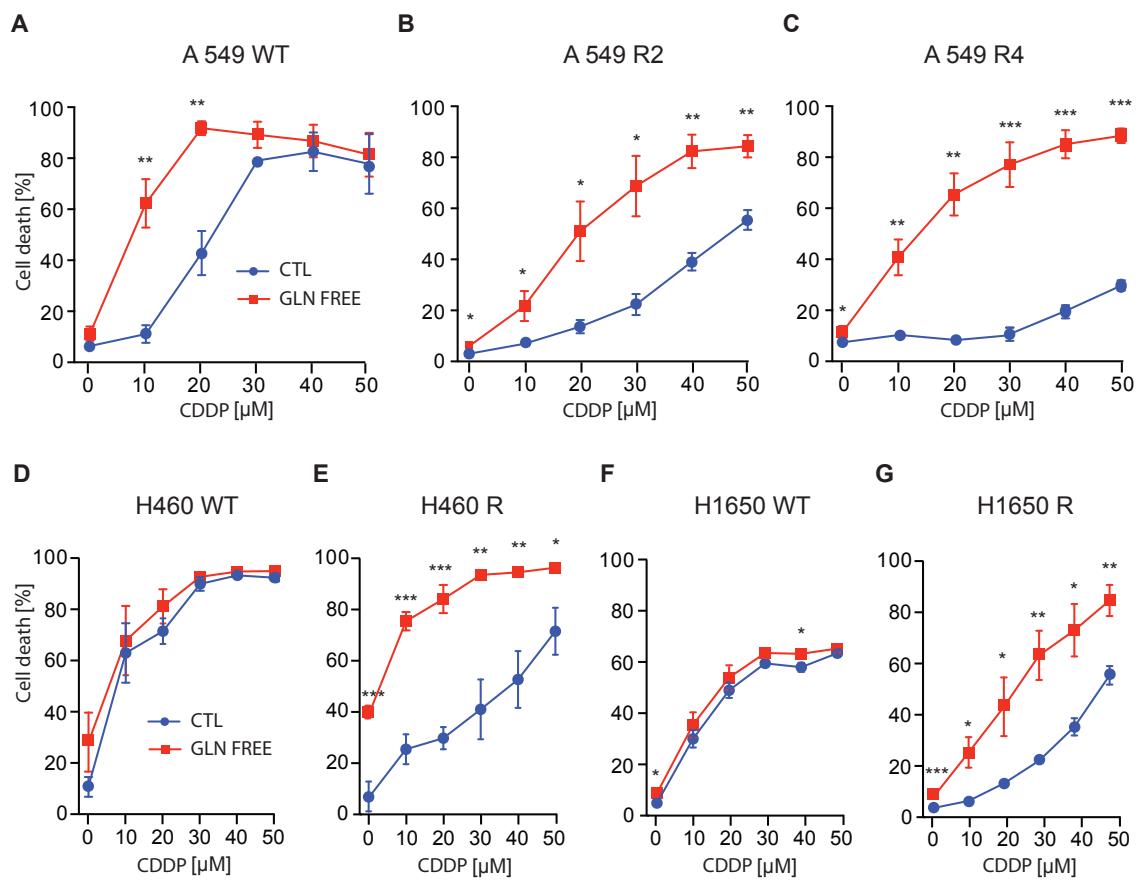


Figure 4

Figure 4. Glutamine starvation sensitizes human cancer cells to CDDP.

(A-G) A549 (A-C), H460 (D-E), and H1650 (F-G) WT and R cells were cultured in complete medium (CTL) or glutamine (GLN)-free medium, and exposed for 48 hours to the indicated concentrations of CDDP. Thereafter, the cells were subjected to flow cytometry-assisted measurement of cell death parameters. Values represent the percentage of dying $\text{DiOC}_6(3)^{\text{low}}\text{PI}^-$ plus dead PI^+ cells. Data represent mean \pm SEM of 3 independent experiments except for E ($n=4$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Student's t test) as compared to cells of the same type in CTL medium.

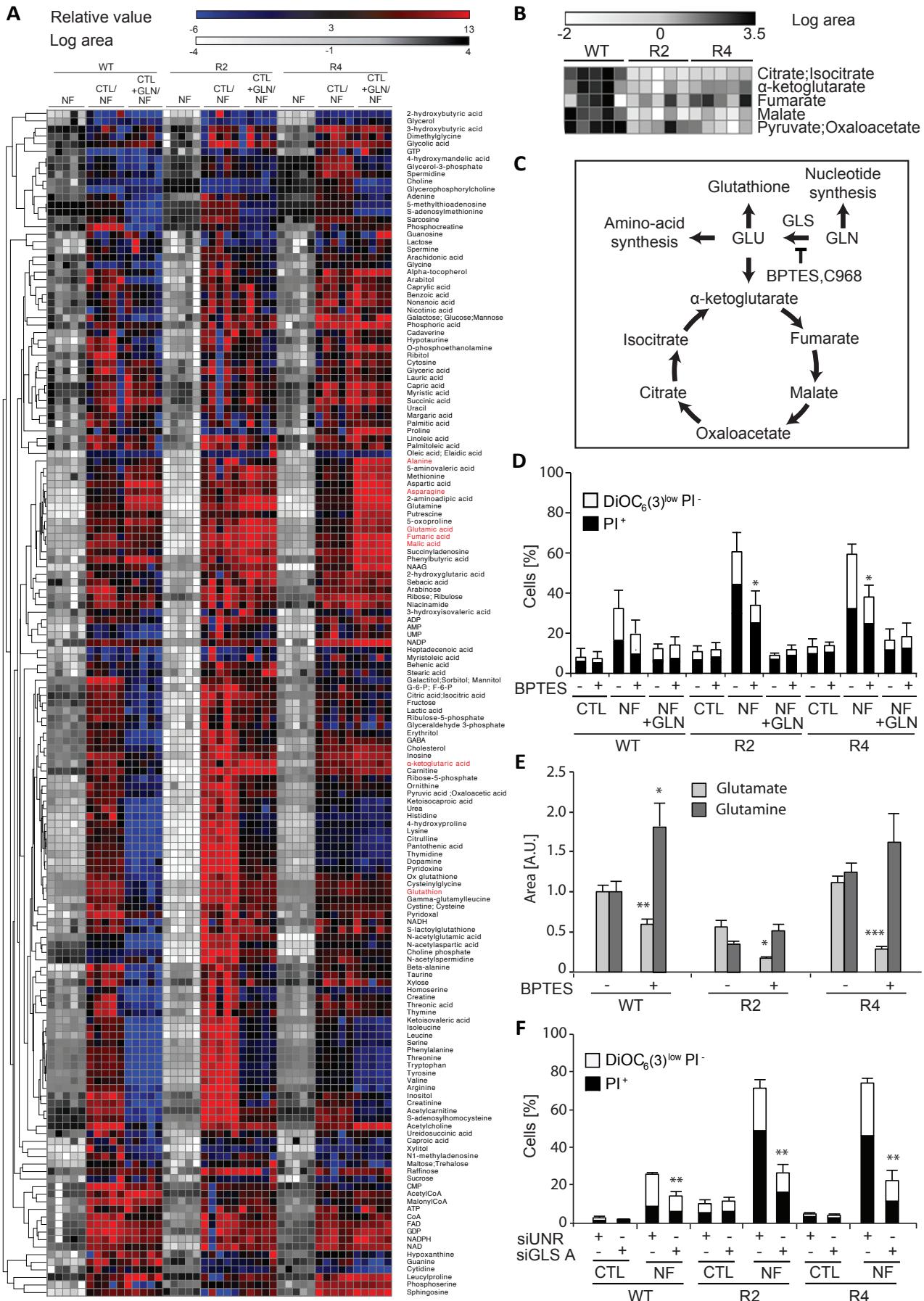


Figure 5

Figure 5. Inhibition of glutaminase (GLS) extends the survival of nutrient-starved CDDP resistant cancer cells.

(A) WT, R2 and R4 A549 cells were cultured for 10 hours in complete medium (CTL) or nutrient-deprived medium (NF), in the absence or presence of 2 mM glutamine (NF +GLN). Heatmap represent the amount of each metabolite (log2 scale) in nutrient-deprived medium (NF), shown as a black (high) and white (low) gradient. Metabolite differences between CTL and NF, or NF+GLN and NF are shown as a color gradient (log2 scale). Five replicates per condition. Both metabolites (rows) and conditions (columns) were clustered by means of the Ward method on the euclidean distance matrix.

(B) Heatmap indicating the level of Krebs cycle-related intermediates in WT, R2 and R4 A549 cells maintained in complete medium. For all metabolites, except for fumarate, differences between parental (WT) and resistant (R2 and R4) cells were significant ($P < 0.001$). These data were extracted from Supplementary Fig. S4A.

(C) Schematic representation of the main pathways of glutamine (GLN) metabolism.

(D) WT and R cells were cultured in complete medium (CTL) or EBSS in the absence or presence of the GLS inhibitor BPTES (5 μ M) for 24 hours and then assayed for cell death parameters. DiOC₆(3)^{low}PI⁻= dying cells, PI⁺= dead cells (mean \pm SEM; n = 3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, (Student's t test) as compared to cells of the same type cultured in the same medium, but in the absence of BPTES.

(E) Levels of GLU and GLN in parental WT and the two CDDP-resistant R2 and R4 cancer cells cultured for 10 hours in EBSS supplemented or not with 5 μ M BPTES. Data are shown as area of the metabolite peak, normalized to the metabolite peak of WT cells cultured without BPTES. Means \pm SEM of 5 replicates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Student's t test), as compared to cells of the same type cultured in the absence of BPTES.

(F) Parental (WT) and CDDP-resistant (R) A549 cells were transfected with control siRNA (siUNR) or with siRNAs specific for glutaminase (siGLSA) for 48 h. Thereafter, cells were cultured for 24 hours either in the complete medium (CTL) or in EBSS prior to the cytofluorometric assessment of apoptosis-related variables. DiOC₆(3)^{low}PI⁻= dying cells, PI⁺= dead cells (mean \pm SEM; n = 3 independent experiments). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student's t test), as compared to cells of the same type transfected with UNR siRNA.

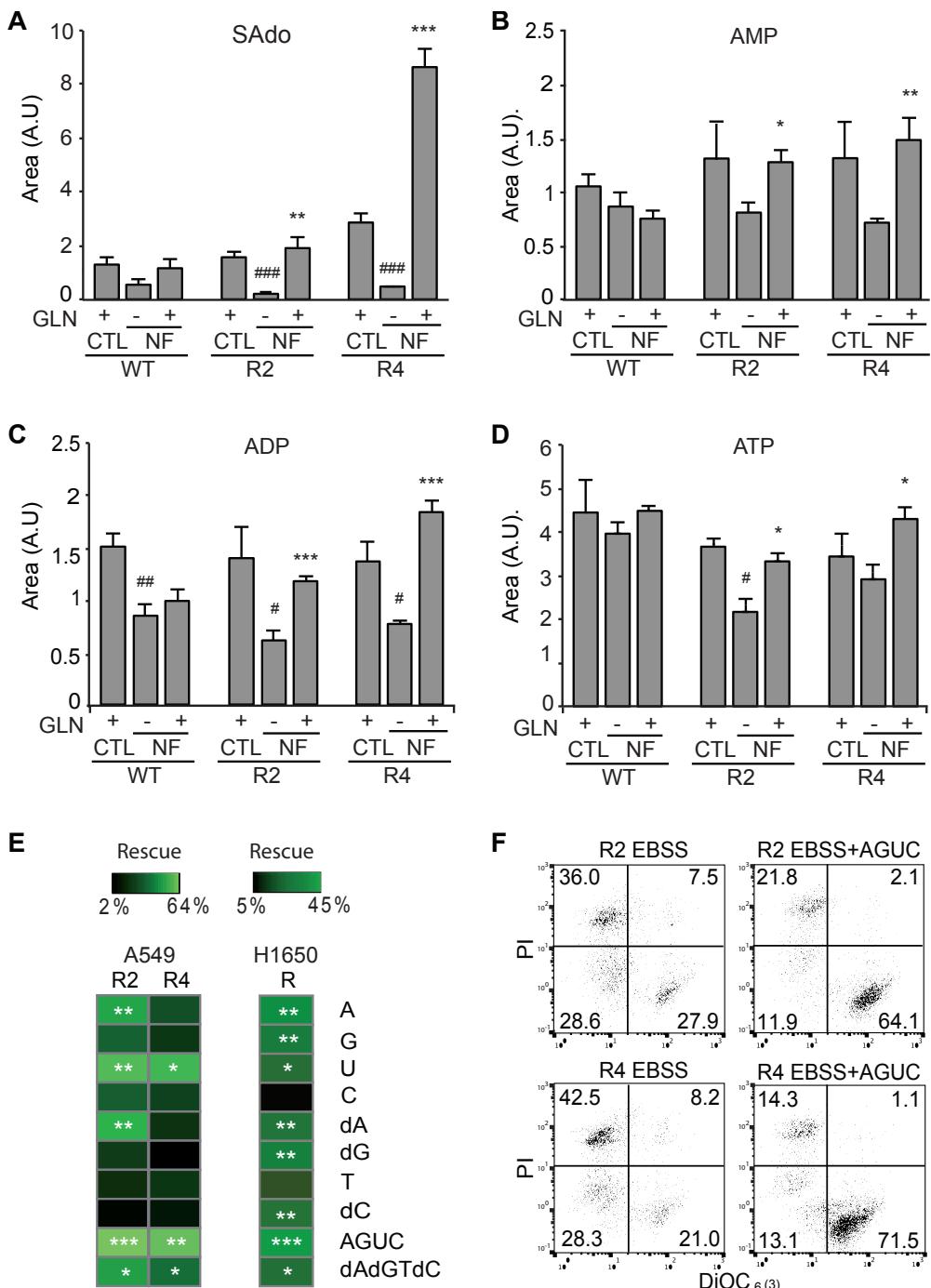


Figure 6

Figure 6. Glutamine promotes nucleotide synthesis in starved CDDP-resistant cells.

(A-D) Levels of succinyl adenosine (A), AMP (B), ADP (C) and ATP (D) in parental WT and CDDP-resistant R2 and R4 cancer cells cultured for 10 hours in complete medium (CTL) or in EBSS supplemented or not with 2 mM GLN (5 replicates per condition). Data are shown as area of the metabolite peak. Means \pm SEM of 5 replicates. *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001 (Student's t test), as compared to cells of the same type cultured in EBSS alone; #P< 0.05, ##P< 0.01, ###P< 0.001 (Student's t test), as cells in EBSS compared to cells of the same type in complete medium.

(E and F) CDDP-resistant cells were incubated in EBSS with or without adenosine (A), guanosine (G), uridine (U), cytidine (C), deoxyadenosine (dA), deoxyguanosine (dG), thymidine (dT), deoxycytidine (dT) each at 0.1 mM or in combination during 24 hours (A549 cells) or 36 hours (H1650 cells), then processed for the cytofluorometric determination of cell death-related parameters upon co-staining with the vital dye propidium iodide (PI) and the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)-sensing dye DiOC₆(3). Heatmaps in E represent the percentage of cell rescue by nucleosides. Rescue= (% of cells death in EBSS - % of cell death in EBSS supplemented with nucleosides)/(% of cells death in EBSS)x100. P*< 0.05, **P < 0.01 (Student's t test; n=3) as compared to cell death in the absence of nucleosides. Representative dot plots of A549 cells are shown in F. Numbers refer to the percentage of cells found in each quadrant.

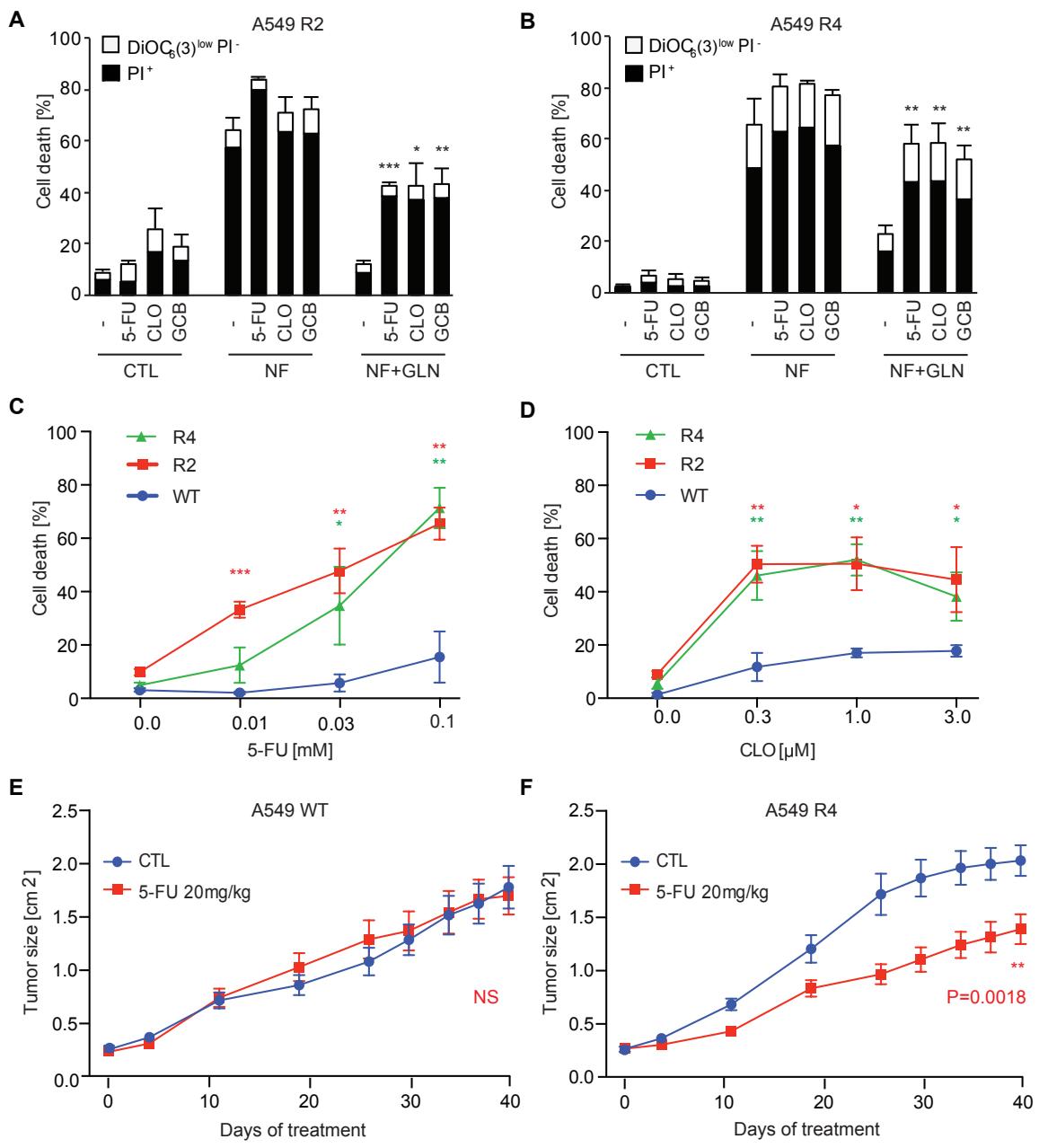


Figure 7

Figure 7. Inhibition of nucleotide biosynthesis preferentially kills CDDP-resistant cancer cells.

(A and B) Cytofluorometric assessment of cell death in A549 CDDP-resistant R2 (A) and R4 (B) cancer cells cultured in complete medium (CTL), EBSS (NF) or EBSS containing 0.02 mM glutamine (NF+GLN), in the absence or in the presence of 5-fluorouracil (5-FU; 60 µM), clofarabine (CLO; 2 µM) or gemcitabine (GCB; 2 µM) for 24 hours. DiOC₆(3)^{low}PI⁻= dying cells, PI⁺= dead cells (mean ± SEM; n=3). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Student's t test) as compared to cells in the same culture medium in the absence of nucleotide antagonists.

(C and D) A549 parental (WT) and CDDP-resistant (R2 and R4) cancer cells were cultured in complete medium, either untreated or exposed to the indicated concentrations of 5-fluorouracil (5-FU; in C) or clofarabine (CLO; in D). After 48 hours of incubation, the cells were subjected to the flow cytometry-assisted measurement of cell death parameters. Values represent the percentage of dying DiOC₆(3)^{low}PI⁻ plus dead PI⁺ cells (mean ± SEM; n = 4 in C and 3 in D). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (Student's t test) as compared to equally treated WT cells.

(E and F) WT cell line (E) and its CDDP-resistant R4 derivative (F) were subcutaneously xenografted into athymic nu/nu mice. When tumors became palpable, animals were randomized and treated with 5-fluorouracil (5-FU) (i.p.) injection or an equivalent volume of vehicle (CTL), 3 times per week for 12 weeks. Tumor growth is reported as means ± SEM (WT CTL and WT 5-FU, 10 mice; R4 CTL, 13 mice; R4 5-FU, 11 mice). *P < 0.05 (Wald test, type 2 ANOVA), as compared to CTL.

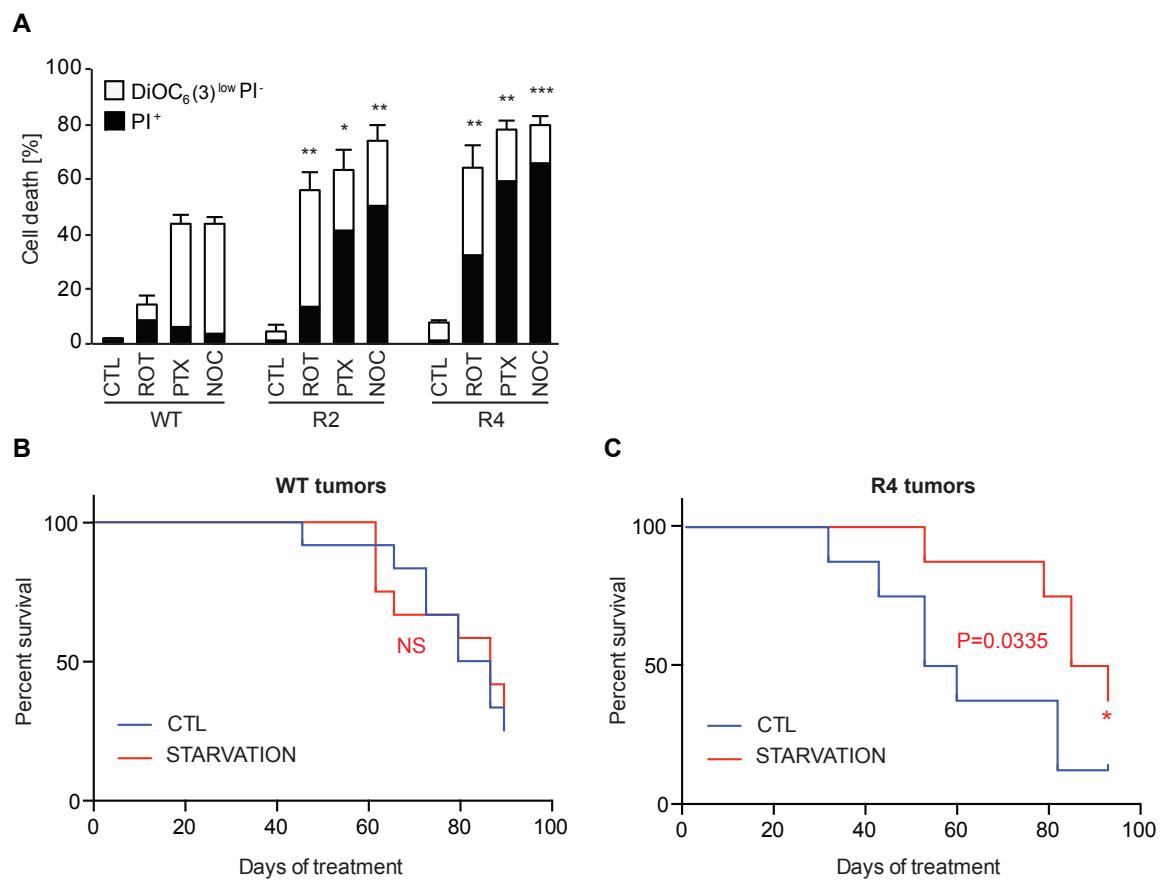


Figure S1

Supplementary Figure 1. Susceptibility of CDDP-resistant cancer cells to microtubule inhibitors and starvation. Related to Figure 1.

(A) Parental A549 cells (WT) and two CDDP-resistant derivatives (R2 and R4) were maintained in control condition (CTL) or treated with rotenone (ROT 1 μ M), paclitaxel (PTX, 100 nM) or nocodazole (NOC, 200 nM), for 24-48 hours. Thereafter, the cells were subjected to the flow cytometry-assisted measurement of cell death parameters upon co-staining with the vital dye propidium iodide (PI) and the mitochondrial membrane potential dye DiOC₆(3) (mean \pm SEM; n = 3). *P < 0.05; **P < 0.01 (Student's t test),, in comparison with equally treated WT cells.

(B and C) Kaplan-Meier survival curves of nude mice xenografted with A549 WT or CDDP-resistant R4 cells, and fed ad libitum or starved 24 hours, two-times a week (12 mice in WT CTL, 11 in WT NF, 8 mice in R4 CTL and R4 NF). Starvation significantly prolongs survival of mice xenografted with CDDP-resistant R4 A549 cancer cells (Log-rank test).

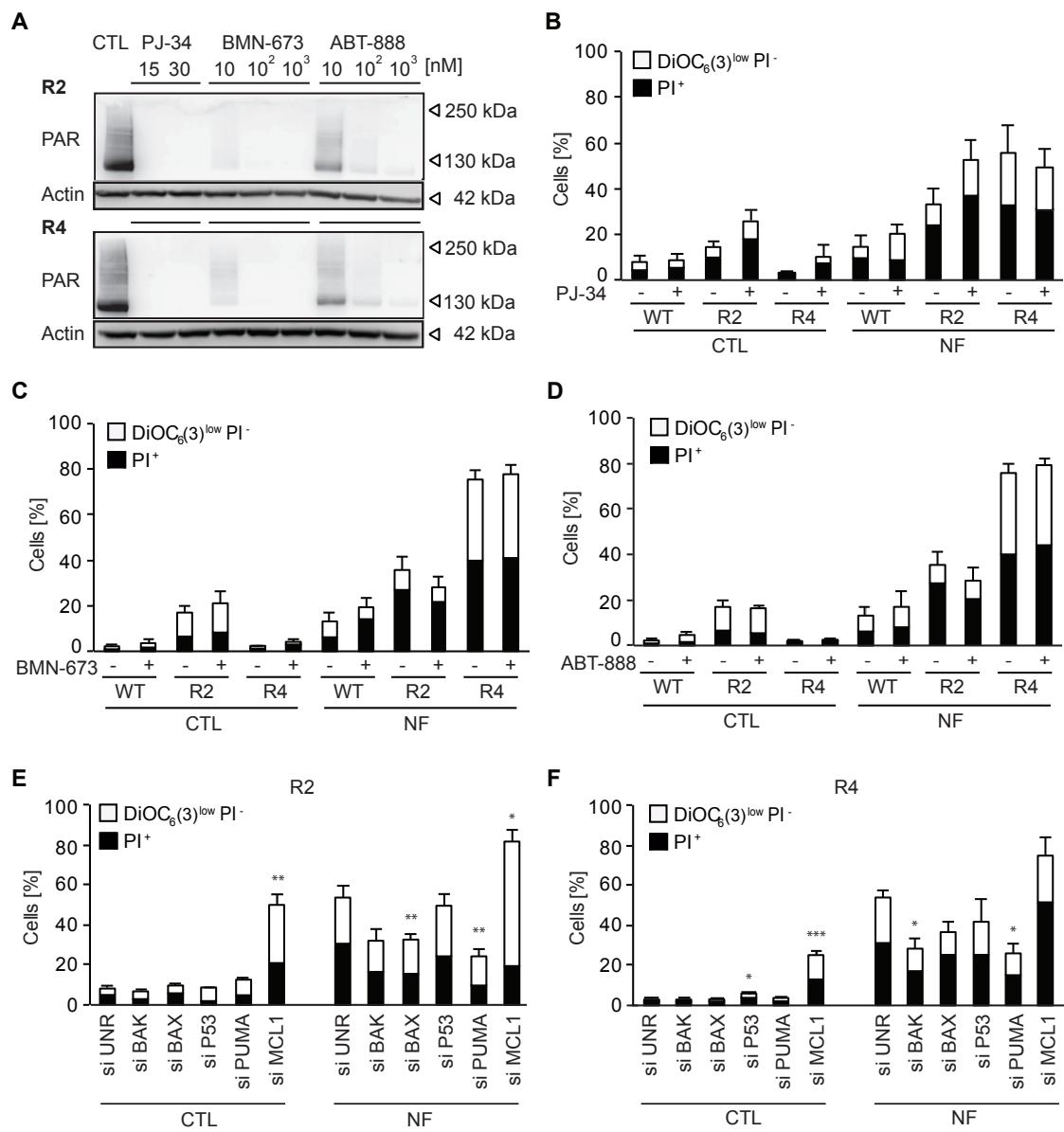


Figure S2

Supplementary Figure 2. Knockdown of pro-apoptotic BCL2 like proteins but not inhibition of the enzymatic activity of PARP reduces starvation-induced cell death. Related to Figure 2.

(A) CDDP-resistant (R2 and R4) A549 cells were cultured in normal growth medium in the absence or in the presence of three PARP inhibitors (PJ-34, BMN-673, ABT-888) at the indicated concentrations for 15 hours and processed for the immunoblotting-based assessment of PAR-containing proteins and actin to control the loading of each line.

(B-D) Treatment of WT, R2 and R4 A549 cells with 15 μ M PJ-34 (B), 30 nM BMN-673 (C), 100 nM ABT-888 (D) for 24 hours failed to significantly reverse cell death parameters induced by culture in EBSS medium (nutrient free, NF). Data are represented either as mean \pm SEM ($n=3$, in b) or mean \pm SD ($n=2$, in c and d). * $P < 0.05$ (Student's t-test), as compared to cells of the same type cultured in the absence of PARP inhibitor.

(E and F) CDDP-resistant R2 and R4 A549 cells were transfected with control unrelated siRNA (UNR) or with siRNAs specific for Bcl-2 family members for 36 hours. Thereafter, cells were cultured for 24 hours either in the complete medium (CTL) or in EBSS (nutrient-free, NF) prior to the cytofluorometric assessment of apoptosis-related variables (mean \pm SEM; $n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student's t-test), as compared to cells of the same type transfected with UNR siRNA.

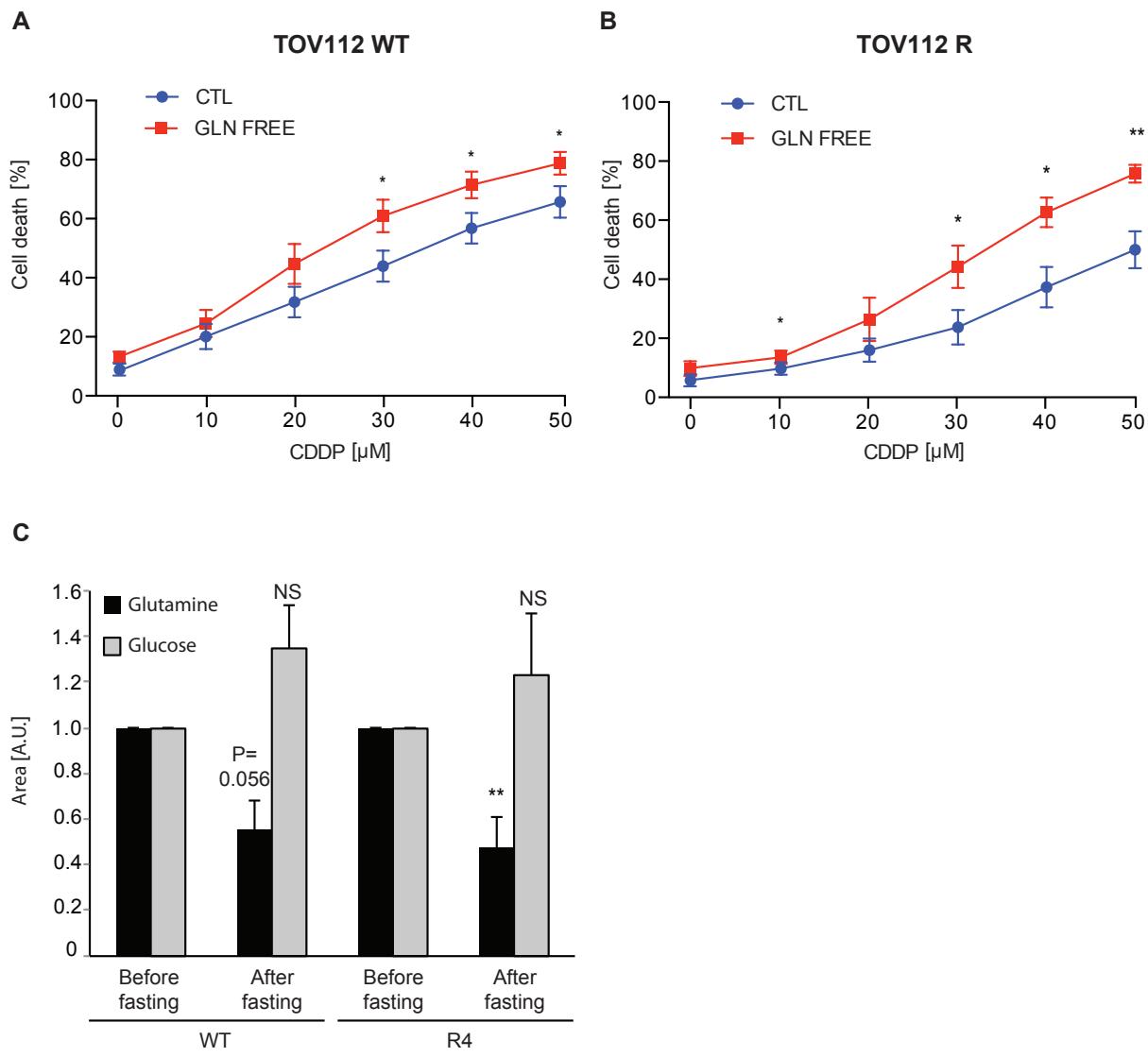


Figure S3

Supplementary Figure 3. Glutamine starvation and CDD resistance. Related to Figure 4.

(A and B) Parental (A) and CDDP-resistant (B) TOV 112D cells were cultured in complete medium (CTL) or glutamine (GLN)-free medium, and exposed for 48 hours to the indicated concentrations of CDDP. Thereafter, the cells were subjected to the flow cytometry-assisted measurement of cell death parameters. Values represent the percentage of dying $\text{DiOC}_6(3)^{\text{low}}\text{PI}^+$ plus dead PI^+ cells (mean \pm SEM; n = 3). *P < 0.05; **P < 0.01 (Student's t-test) as compared to cells of the same type in complete medium.

(C) Mass spectrometric assessment of plasma GLN and glucose levels in mice before and after 24 hours of starvation. Mice bearing parental (WT) A549 or R4 tumors (as in Fig. 1C) were subjected to one cycle of 24-hour fasting (with ad libitum access to water) and blood was drawn before and immediately after the fasting cycle. Values represent means \pm SEM; GLN, n=4 for WT, n=6 for R4; Glucose, n=5 for WT, n=6 for R4). *P < 0.05; **P < 0.01 (paired Student's t test) as compared to the fed state.

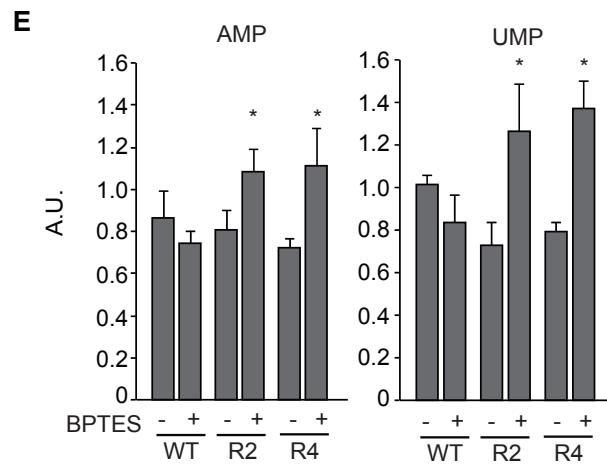
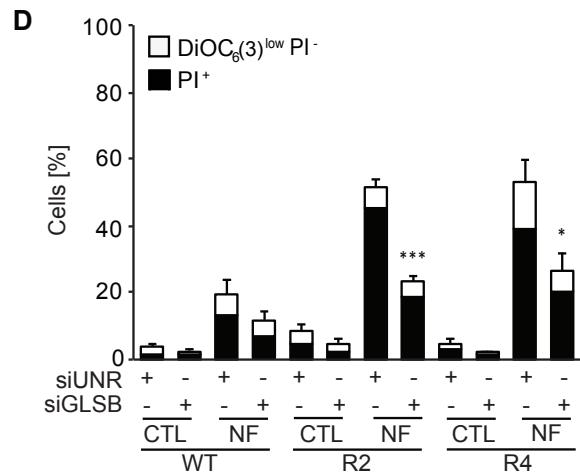
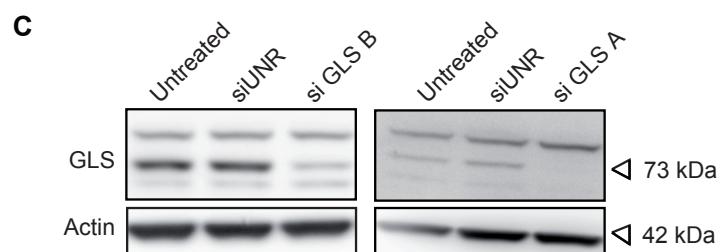
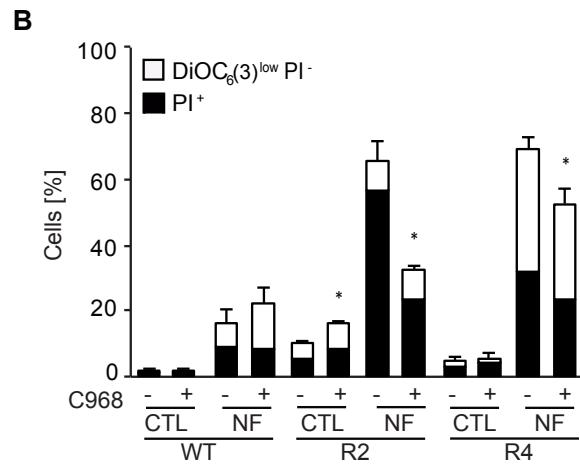
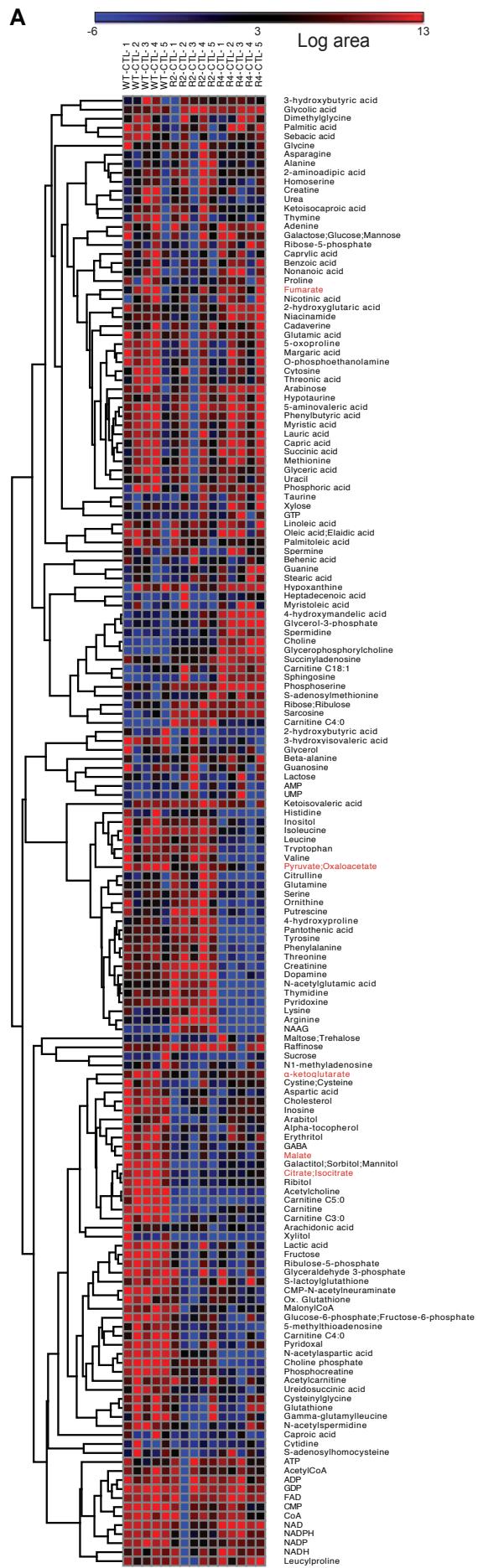


Figure S4

Supplementary Figure 4. Inhibition of glutaminase activity during starvation increases cell survival and UMP biosynthesis. Related to Figure 5.

(A) Heatmap visualization of metabolic profiling in WT, R2 and R4 A549 cells cultured for 10 hours in complete medium (CTL). Both metabolites (rows) and conditions (columns) were clustered by means of the Ward method on the euclidean distance matrix. Expression level of each metabolite in each type of cells maintained in EBSS is represented as a gradient from blue (low) to red (high) in a log2 scale (5 replicates per condition). In red, metabolites represented in Fig. 5B.

(B) WT and R cells were cultured in complete medium (CTL) or EBSS in the absence or in the presence of the GLS inhibitor C968 (1 μ M) for 24 hours and then assayed for cell death parameters (mean \pm SEM; n = 3). *P < 0.05 (Student's t test) as compared to cells of the same type cultured in the absence of C968.

(C and D) Parental A549 cells (WT) and two CDDP-resistant derivatives (R2 and R4) were transfected either with control siRNA (UNR) or with two distinct glutaminase-specific siRNAs (si GLSA or si GLSB). Representative immunoblots confirming downregulation of GLS in CDDP-resistant R2 cells 36 hours after transfection are shown in C. Thirty six hours after transfection with control or GLS specific siRNA, cells were cultured in complete medium (CTL) or in EBSS for additional 24 hours, then subjected to the cytofluorometric assessment of cell death parameters (D). DiOC₆(3)^{low}PI⁻ = dying cells, PI⁺ = dead cells. (mean \pm SEM; n = 3) *P<0.05, ***P < 0.001 (Student's t test), as compared to cells of the same type transfected with UNR siRNA.

(E) Levels of AMP and UMP in parental WT and CDDP-resistant (R2 and R4) cancer cells cultured for 10 hours in EBSS in the absence or in the presence of 5 μ M BPTES. Data are shown as area of the metabolite peak. Means \pm SEM of 5 replicates. *P < 0.05 (Student's t test), as compared to cells of the same type cultured in EBSS alone; [#]P< 0.05; ^{##}P< 0.001 (Student's t test).

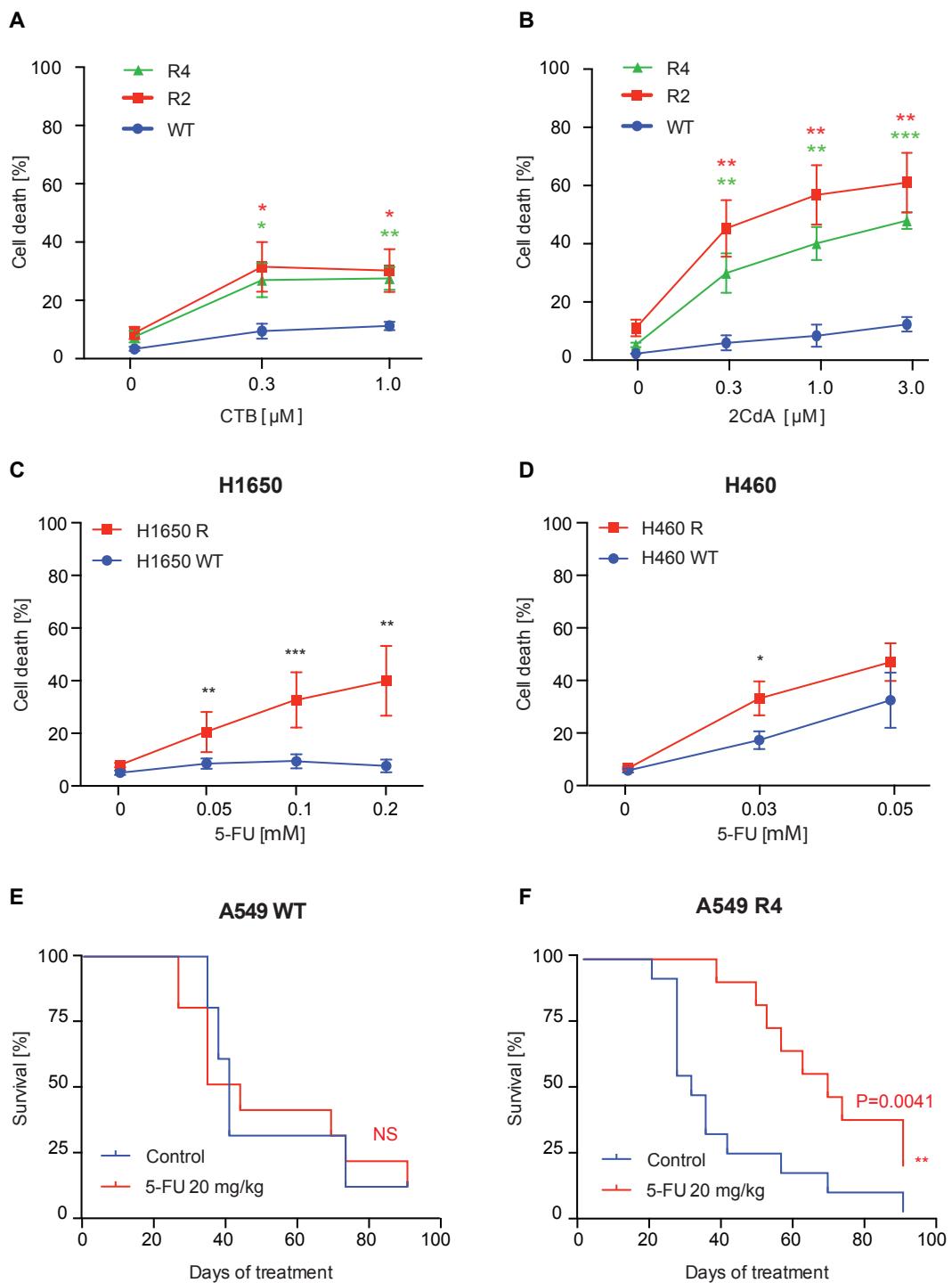


Figure S5

Supplementary Figure 5. Selective susceptibility of cisplatin-resistant cells to antimetabolites. Related to Figure 7.

(A and B) A549 parental (WT) and CDDP-resistant (R2 and R4) cancer cells were cultured in complete medium, either untreated or exposed to the indicated concentrations of cytarabine (CTB; in A) or cladribine (2CdA ; in B). After 48 hours of incubation, the cells were subjected to the flow cytometry-assisted measurement of cell death parameters. Values represent the percentage of dying DiOC₆(3)^{low}PI⁻ plus dead PI⁺ cells (mean ± SEM; n = 3 in a and 4 in b). *P < 0.05; ***P < 0.001 (Student's t test) as compared to equally treated WT cells.

(C and D) WT and CDDP-resistant H1650 (C) or H460 (D) human NSCLC cells cultured in normal growth medium were either untreated or exposed to the indicated concentrations of 5-fluorouracil (5-FU) during 48 hours. Then, the cells were subjected to the flow cytometry-assisted measurement of cell death parameters. Values represent the percentage of dying DiOC₆(3)^{low}PI⁻ plus dead PI⁺ cells (mean ± SEM; n = 3). *P < 0.05; ***P < 0.001 (Student's t test) as compared to equally treated WT cells.

(E and F) Kaplan-Meier survival curves of nude mice xenografted with A549 WT (E) or CDDP-resistant R4 cancer cells (F), and treated with 5-FU or an equivalent volume of vehicle (CTL). Treatment with 5-FU significantly prolongs survival of mice xenografted with CDDP-resistant R4 A549 cancer cells (Log-rank test).

DISCUSSION

Les cellules résistantes au cisplatine sont sensibles à la privation nutritionnelle.

La réalisation d'un screening pharmacologique a permis de mettre en évidence plusieurs vulnérabilités métaboliques caractéristiques des cellules résistantes au cisplatine. Ces résultats font suite à plusieurs travaux antérieurs réalisés par d'autres équipes, ayant mis en exergue des divergences métaboliques caractéristiques de la résistance au cisplatine, à savoir une augmentation de la glycolyse (Menendez et al., 2005) dans certaines lignées, un basculement vers la phosphorylation oxydative dans d'autres (Galluzzi et al., 2014; Matassa et al., 2016; Wangpaichitr et al., 2017).

En outre, nos résultats mettant en évidence une sensibilité particulière des cellules Cis-R aux agents diminuant le contenu lipidique des cellules (TOFA, simvastatine) font écho à l'article de Todor et al. ayant montré que les cellules Cis-R présentent un contenu lipidique différent des cellules Cis-S (Todor et al., 2012). Ces données suggèrent que le ciblage de la lipidogénèse pourrait être une bonne stratégie d'éradication des cellules Cis-R. Nous réalisons actuellement des expériences afin de confirmer cette hypothèse et de mieux comprendre les mécanismes impliqués.

De façon intéressante, nos recherches ont permis de mettre en évidence la susceptibilité de cellules et tumeurs résistantes au cisplatine à la privation nutritionnelle *in vitro* et *in vivo*, ce qui n'a jamais été mis en évidence jusqu'à présent. Depuis la dernière décennie, plusieurs équipes se focalisant sur les effets du jeûne dans l'efficacité de la chimiothérapie ont montré que le jeune permettait la potentialisation des effets chimiothérapeutiques et la diminution des effets secondaires induits, et ce, en raison d'une résistance au stress différentielle entre cellules saines et cellules cancéreuses (Differential Stress Resistance, DSR), explicitée dans la dernière partie de mon introduction.

Comme l'a montré notre screening des inhibiteurs métaboliques, le traitement prolongé au cisplatine induisant une résistance stable malgré l'arrêt du traitement, peut engendrer des modifications du métabolisme. Nous pouvons imaginer que le traitement au cisplatine subi initiallement par ces cellules devenues résistantes a induit des mécanismes adaptatifs qui ne

peuvent pas être maintenus en condition de privation nutritionnelle, ce qui induit la mort des cellules Cis-R.

Il existe actuellement des essais cliniques imposant aux patients des privations nutritionnelles (jeûnes) avant l'administration des chimiothérapies (NCT02607826). Il n'existe cependant aucune étude clinique proposant la privation nutritionnelle seule sans chimiothérapie, ce que nous pouvons aisément comprendre car cela serait vécu par les patients comme un abandon thérapeutique. Cependant, il pourrait être intéressant d'envisager une étude clinique proposant des sessions de jeûnes après les traitements chimiothérapeutiques. Au vu de nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle des périodes de jeûne effectuées après la chimiothérapie à base de cisplatine pourraient permettre de tuer sélectivement les cellules chimio-résistantes résiduelles, ce qui apporterait une amélioration substantielle dans le traitement des patients en limitant la survenue de la chimiorésistance.

Les cellules résistantes au cisplatine présentent une dépendance à la glutamine.

La poursuite de nos travaux nous a permis de mettre en évidence le rôle protecteur prépondérant de la glutamine sur les cellules Cis-R exposées à la privation nutritionnelle, ce qui évoque une certaine dépendance à la glutamine de ces cellules, retrouvée dans les 4 lignées résistantes au cisplatine testées (A549, H460, H1650 et TC-1). Comme nous l'avions mentionné dans l'introduction, l'activation du facteur de transcription oncogène c-myc, amplifié dans de nombreux cancers, est connu pour induire une addiction à la glutamine (Yuneva et al., 2007). En ce sens, il est important de noter que c-myc est surexprimé dans nos cellules, mais nous n'avons pas observé de différences significatives dans son expression entre les cellules Cis-S et Cis-R. Par ailleurs, nous avons observé que l'absence de glutamine dans le milieu de culture des cellules permettait de rendre les cellules Cis-R à nouveau sensibles au cisplatine. D'autres équipes ont également pu démontrer l'importance du métabolisme de la glutamine dans les processus de résistance au cisplatine. En effet, Hudson et al. ont associé la résistance au cisplatine à une augmentation de l'import de la glutamine, en mettant en exergue une augmentation des transporteurs de glutamine ASCT2, aussi dénommés SLC1A5 (Hudson et al., 2016). Il est intéressant de noter que des résultats en clinique vont à l'encontre de cette observation, étant donné qu'un haut niveau du transporteur exportateur de glutamine LAT1 est associé à une moins bonne réponse à la chimiothérapie à base de cisplatine, et un taux de survie global diminué chez des patients atteints de NSCLC (Imai et al., 2010; Kaira et al., 2011). Nous pouvons cependant noter que la moitié des patients de cette étude était traitée au carboplatine, et

l'autre moitié au cisplatine, ces différentes drogues induisant probablement des altérations métaboliques différentes au sein des tumeurs traitées. En outre, l'étude porte sur l'échangeur LAT1, qui couple l'export de glutamine à l'import de leucine. De plus, LAT1 peut également transporter l'isoleucine, la valine, la méthionine, la tyrosine, le tryptophane, et la phénylalanine (Nicklin et al., 2009; Yanagida et al., 2001; Zhao et al., 2015). Ainsi, l'efficacité atténuée de la chimiothérapie chez des patients présentant un haut niveau de LAT1 pourrait également être expliquée par les modulations induites par cette augmentation de LAT1 sur les teneurs des autres acides aminés pris en charge par ce transporteur.

La synthèse des nucléotides est activée par la glutamine dans les cellules résistantes au cisplatine.

La glutamine ayant un rôle pléiotrope au sein des cellules, nous avons voulu savoir par quel(s) mécanisme(s) cet acidé aminé était en mesure d'exercer son activité de sauvetage de la mort induite par la privation nutritionnelle.

Premièrement, la glutamine pouvant alimenter le cycle de Krebs via sa transformation en glutamate par le glutaminase (GLS), nous avons voulu savoir si le sauvetage par la glutamine pouvait être aboli par l'inhibition de cette enzyme. A notre grande surprise, l'inhibition génétique ou pharmacologique de la GLS n'a pas empêché la survie des cellules Cis-R cultivées en milieu EBSS additionné de glutamine. En accord avec cette idée, l'adjonction de DMKG, précurseur de l' α -cétoglutarate, n'a pas permis le sauvetage des cellules Cis-R de la mort induite par la privation nutritionnelle. Ainsi, la GLS n'est pas l'enzyme clé dans le processus de sauvetage par la glutamine.

En revanche, concernant le rôle de la glutamine dans la réponse au cisplatine, Hudson et collègues ont montré en 2016 dans leur modèle de cancer ovarien que la résistance au cisplatine était associée à une augmentation de l'expression de la glutaminase, et que l'inhibition de l'enzyme induisait une re-sensibilisation des cellules Cis-R au cisplatine (Hudson et al., 2016).

Deuxièmement, sachant que la glutamine est impliquée dans la synthèse de l'anti-oxydant glutathion, nous avons voulu savoir si les cellules pouvaient être sauvées de la mort induite par la privation nutritionnelle par l'ajout de glutathion ethyl ester, précurseur du glutathion, or il n'en était rien.

Troisièmement, la glutamine ayant un rôle dans l'inhibition de l'autophagie via l'activation de mTORC1, nous avons voulu savoir si un excès d'autophagie induit par la privation nutritionnelle entraînait la mort des cellules Cis-R. L'inhibition de l'autophagie dans les cellules Cis-R n'a pas permis de les sauver de façon significative. Ainsi, nous en avons conclu que la faculté de la glutamine à inhiber l'autophagie ne pouvait pas expliquer sa capacité de sauvetage.

Quatrièmement, il est bien documenté que la glutamine participe à la synthèse de N-acetylglucosamine (GlcNac), qui sera utilisée pour les modifications post-traductionnelles des protéines telles que les N- et O-glycosylations, et les O-GlcNAcylations. Nous n'avons pas exploré cette voie, mais il aurait été intéressant de voir si l'ajout de GlcNac au milieu de privation nutritionnelle permettait de sauver les celulles. De façon intéressante, il a d'ailleurs été montré que les hyper-O-GlcNAcylations des protéines p53 et c-myc pouvaient être à l'origine de la résistance au cisplatine dans des cellules de NSCLC (Luanpitpong et al., 2017).

La dernière hypothèse testée était celle selon laquelle le sauvetage par la glutamine des cellules Cis-R de la mort induite par la privation nutritionnelle résidait dans la capacité de la glutamine à participer aux biosynthèses des nucléotides. Le fait que le sauvetage par la glutamine puisse être mimé par l'adjonction de ribonucléosides a permis la validation de notre hypothèse. De plus, les études de métabolomique nous ont permis de voir que l'adjonction de glutamine au milieu EBSS permettait l'augmentation de succinyl adénosine (un précurseur de l'AMP), de l'adénosine monophosphate (AMP), de l'adénosine diphosphate (ADP) et de l'adénosine triphosphate (ATP) dans les cellules Cis-R et non dans les Cis-S. La glutamine joue donc un rôle clé dans la synthèse des nucléotides au sein des cellules Cis-R.

Nous pouvons alors nous poser la question du rôle du cisplatine dans ces changements métaboliques induits. Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle des traitements répétés au cisplatine (ayant conféré la résistance aquise aux cellules) ont entraîné des dommages à l'ADN nécessitant l'augmentation des processus de réparation au sein des cellules Cis-R. Ce faisant, il est possible que l'exacerbation des mécanismes de réparation ait entraîné une augmentation de la synthèse des nucléotides, indispensable à la survie de ces cellules. Ceci est d'ailleurs en accord avec des résultats récemment publiés par Brown et collègues explicitant que l'exposition de cellules à des traitements chimiothérapeutiques génotoxiques, notamment au cisplatine, entraînait une élévation de la synthèse *de novo* de pyrimidines (Brown et al., 2017).

Mises en situation de stress lors de la privation nutritionnelle, et ayant développé une dépendance accrue à la glutamine pour la production de nucléotides comparativement à leurs analogues Cis-S, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les cellules Cis-R meurent car elles ne peuvent plus produire suffisamment de nucléotides. En ce sens, Brown et al. ont d'ailleurs montré que l'élévation de la synthèse *de novo* de pyrimidines faisant suite à l'exposition à une chimiothérapie génératrice de toxicité (doxorubicine) ne pouvait plus être effective en cas de déplétion en glutamine (Brown et al., 2017).

Les cellules résistantes au cisplatine sont spécifiquement sensibles aux antimétabolites ciblant la biosynthèse des nucléotides.

D'un point de vue plus thérapeutique, nous avons observé que les cellules Cis-R présentaient une sensibilité supérieure à celle de leurs analogues Cis-S à de nombreux agents chimiothérapeutiques interférant avec le métabolisme des nucléotides, notamment le 5-fluorouracile (5-FU, un inhibiteur de la thymidylate synthase (Chon et al., 2017)), la clofarabine et la gemcitabine (deux inhibiteurs de la ribonucléotide réductase (Aye et al., 2015)). De façon intéressante, un récent screening basé sur l'utilisation de siRNAs a révélé que l'inhibition de la sous-unité M2 B de la ribonucléoside réductase pouvait induire la sensibilisation de cellules cancéreuses au cisplatine, plaident ainsi pour la spécificité des effets que nous observions (Leung et al., 2016). En outre, d'un point de vue plus clinique, plusieurs essais de combinaisons de chimiothérapies réalisés chez les patients ont établi la supériorité d'associations d'agents chimiothérapeutiques interférant avec le métabolisme des nucléotides avec le cisplatine, en opposition aux agents en monothérapie (Comella et al., 2007; Decker et al., 1983; Heinemann et al., 2006).

Dans le même ordre d'idée, il est intéressant de s'intéresser aux combinaisons entre le cisplatine et le raltitrexed, un antagoniste de l'acide folique inhibant également la synthèse de précurseurs nucléotidiques. Ainsi, cette combinaison améliore la survie des patients atteints de mésothéliome pleural, en comparaison avec le cisplatine seul (van Meerbeeck et al., 2005). Par ailleurs, le pré-traitement au pemetrexed (Alimata[®]), un autre antimétabolite du folate, a permis de rétablir *in vitro* la sensibilité au cisplatine de cellules de NSCLC Cis-R (Tieche et al., 2016).

En synthèse, la résistance au cisplatine est couplée à des changements majeurs dans le métabolisme cellulaire qui, dans plusieurs modèles de cancer du NSCLC et de l'ovaire, provoquent une dépendance à la glutamine. Des études métabolomiques, génétiques et

pharmacologiques indiquent que la glutamine doit alimenter une voie de biosynthèse des nucléotides dans le contexte de la résistance au cisplatine. Par conséquent, les cellules résistantes au cisplatine deviennent sensibles au jeûne ainsi qu'aux antimétabolites qui ciblent la synthèse des nucléotides. Ces résultats permettent d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre les cancers résistants au cisplatine.

Les résultats obtenus durant cette thèse ont été résumés dans le schéma ci-dessous.

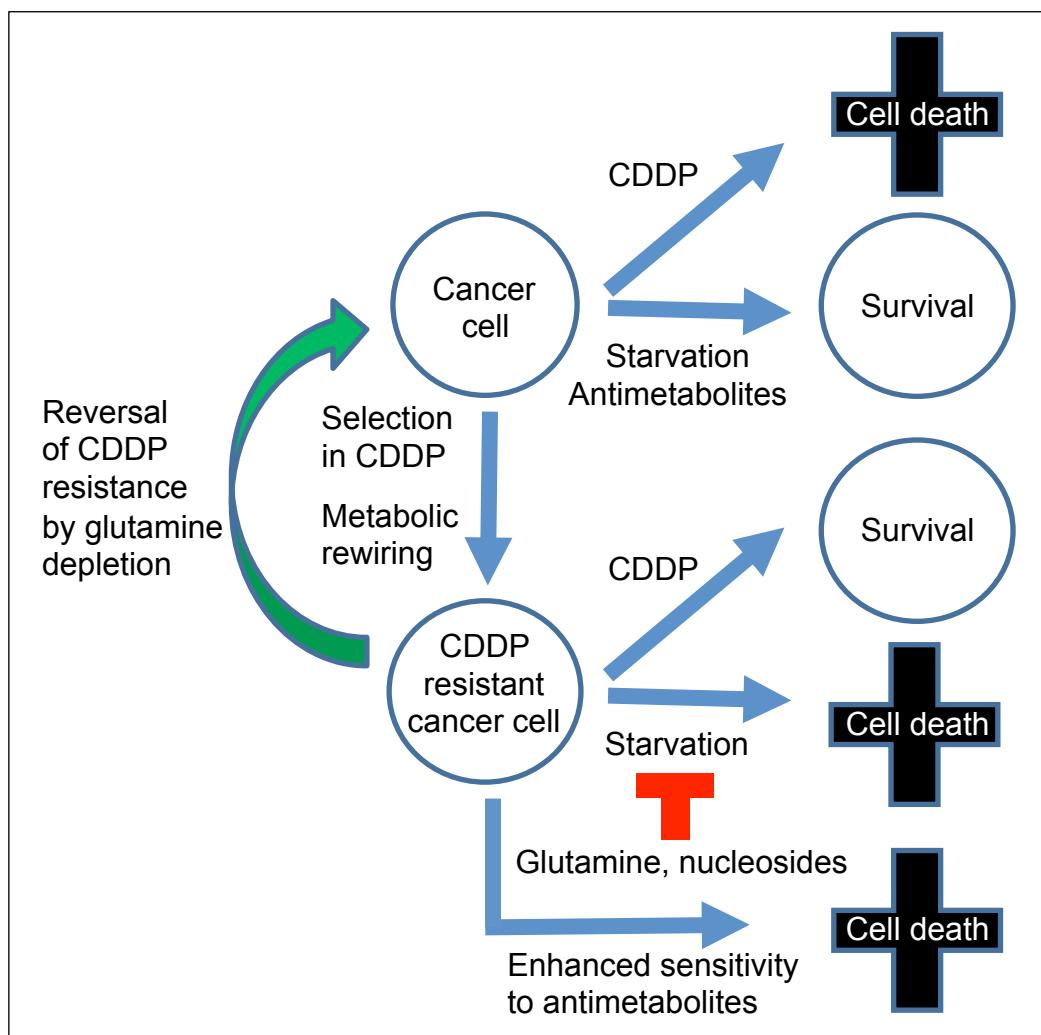


Figure 16: Schéma synthétisant l'ensemble des résultats obtenus.

PERSPECTIVES

Des résultats précliniques aux applications cliniques potentielles.

Les résultats que nous avons obtenus lors de ces études ont permis de mettre en exergue les altérations des voies de biosynthèse des nucléotides, persistantes dans les cellules Cis-R après le retrait du cisplatine. Il serait intéressant de poursuivre les investigations afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la synthèse des nucléotides des cellules Cis-R, et notamment de regarder si les enzymes CAD et PPAT, impliquées dans l'étape limitante de la synthèse des pyrimidines et purines respectivement sont surexprimées dans les cellules Cis-R. Si tel est le cas, ces surexpressions pourraient constituer des marqueurs prédictifs de la réponse au cisplatine.

En outre, compte tenu du fait que nous avons montré que l'absence de glutamine permettait de rendre des cellules Cis-R à nouveau sensibles au cisplatine, il pourrait être envisagé de tester au niveau pré-clinique l'association de cisplatine avec des agents diminuant la teneur en glutamine au sein des cellules, notamment le GPNA (inhibiteur du transporteur importateur de glutamine ASCT2), l'asparaginase, ou la PEG-glutaminase. Le traitement de patients résistants au cisplatine avec l'asparaginase pourrait être envisagé sachant que l'AMM est déjà obtenue pour le traitement de leucémies aigues lymphoblastiques.

Enfin, il serait intéressant de réitérer nos expériences *in vivo* avec des animaux immunocompétents afin de tester l'influence du système immunitaire sur l'efficacité de la privation nutritionnelle et des antimétabolites à ralentir la croissance des tumeurs Cis-R. Pour ce faire, nous disposons à présent de lignées murines stables de cancer pulmonaire résistantes au cisplatine.

Le rôle de la carboxylation réductive de la glutamine dans le phénotype des cellules résistantes au cisplatine.

Lors de notre screening pharmacologique, nous avons pu mettre en évidence des vulnérabilités métaboliques caractéristiques des cellules résistantes au cisplatine, notamment une sensibilité particulière des cellules Cis-R aux agents diminuant le contenu lipidique des cellules (TOFA, simvastatine). Nous tenterons de valider les résultats préliminaires obtenus lors de ce screening pharmacologique sur d'autres lignées, et testerons ainsi la sensibilité différentielle entre les cellules Cis-R et Cis-S de trois autres couples de lignées de NSCLC aux inhibiteurs ciblant 4 enzymes clés dans les voies de biosynthèse des lipides (**Figure 17**). L'avantage de ce type de traitements, et notamment des statines, est qu'ils ont déjà l'AMM pour d'autres indications.

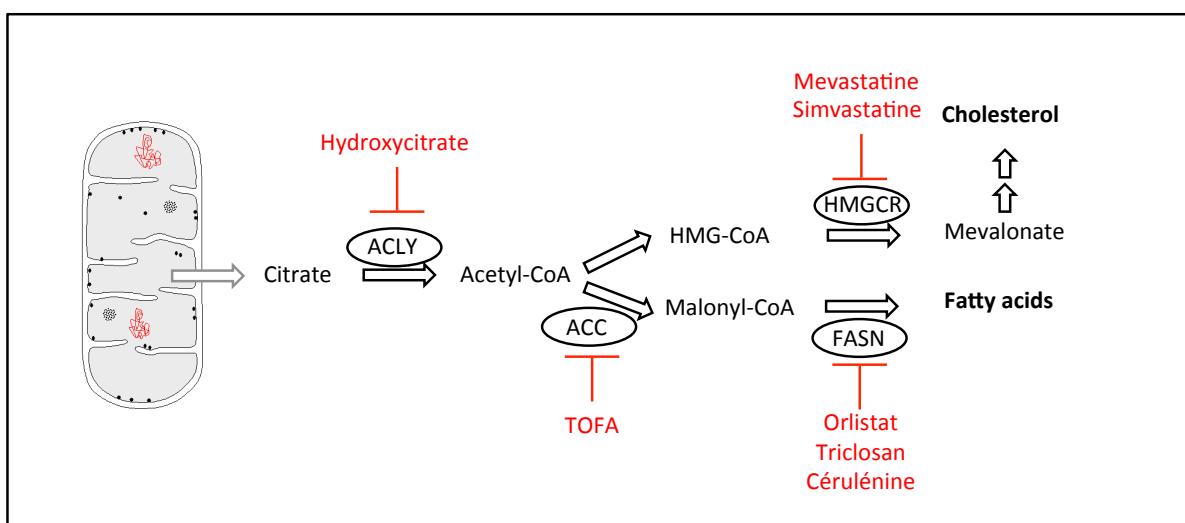


Figure 17: Inhibitions des voies de synthèse des lipides

La voie de synthèse des lipides peut être inhibée par l'hydroxycitrate ciblant l'ATP citrate lyase (ACLY), par le TOFA en ciblant l'acetyl-CoA carboxylase (ACC), par la mevastatine et la simvastatine ciblant la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (HMGCR), et par l'orlistat, le triclosan et la cérolénine ciblant l'enzyme fatty acid synthase (FASN).

En outre, nous avons remarqué que la carboxylation réductive de la glutamine (processus menant à la synthèse de citrate pour la biosynthèse des acides gras et du cholestérol) était exacerbée dans les deux clones de cellules A549 Cis-R testés, en comparaison à leurs analogues Cis-S (résultats non présentés). Ces résultats ont été obtenus grâce à l'étude du métabolome réalisée après adjonction de glutamine marquée au carbone 13. Nous souhaitons poursuivre ces investigations en réitérant ces manipulations utilisant la glutamine marquée sur d'autres couples Cis-S/Cis-R.

Nous évaluerons ainsi les contributions respectives du glucose d'une part, et de la glutamine, d'autre part dans la formation de l'acétyl-CoA lipogène (Metallo et al., 2011).

Des manipulations d'inhibition des isocitrates déshydrogénases cytosoliques (IDH), enzymes clés de la carboxylation réductive de la glutamine, par l'utilisation de siRNAs et d'inhibiteurs pharmacologiques nous permettront de tester l'importance de la voie de la carboxylation réductive de la glutamine dans la croissance, et dans la survie, des cellules cis-R, en comparaison aux cellules Cis-S.

Pour finir, les cellules Cis-R paraissant plus sensibles aux inhibiteurs de la synthèse du cholestérol notamment, et les cellules Cis-R de carcinome de Guérin présentant plus de cholestérol dans leurs membranes que leurs analogues Cis-S (Naleskina et al., 2013), nous projetons d'extraire le cholestérol des membranes des cellules Cis-R, grâce à la cyclodextrine, afin de tester la modulation leur résistance au cisplatine en fonction du contenu des membranes cytoplasmiques en cholestérol (Zidovetzki and Levitan, 2007).

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, culture conditions and chemicals. Culture media and cell culture supplements were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) unless otherwise specifically mentioned. Non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, both parental (also known as wild type (WT) and their CDDP-resistant counterparts were maintained at 37°C under 5% CO₂, in the following culture media: Glutamax-containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES buffer, 100 units/mL penicillin G sodium, and 100 mg/mL streptomycin sulfate for human NSCLC A549 cells; RPMI-1640 medium supplemented as above for human NSCLC H460 and H1650 cells; A 1:1 mixture of MCDB 105/M199 medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented as above and with 0.75 g/L sodium bicarbonate in addition, for TOV-112D cells; RPMI-1640 medium supplemented as above, and with non-essential amino acids in addition, for murine TC1 cells. WT cells were purchased from American Type Culture Collection and their CDDP-resistant counterparts were obtained in vitro by prolonged culture of parental WT cells with sublethal CDDP concentrations as previously described (18). The following chemicals were purchased from Sigma-Aldrich: acetic acid, acetonitrile, adenosine, 6-aminonicotinamide, antimycin A, arginine, asparagine, aspartate, BPTES, 3-bromopyruvate, C646, CDDP, chloroform, citrate, cladribine, cytidine, 2-deoxyglucose, deoxyadenosine, deoxycytidine deoxyguanosine, dibutyrylamine acetate concentrate (DBAA), dimethyl α-ketoglutarate, EBSS, FK866, 5-fluorouracil, gemcitabine, glucose, glutamate, D-glutamine, L-glutamine, glutathione reduced ethyl ester, guanosine, histidine, leucine, MEDICA 16, methanol, methoxyamine, mevastatin, N-acetyl-L-cysteine, necrostatin-1, nicotinamide, N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA), nocodazole, N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamid (MSTBFA), O-ethylhydroxylamine hydrochloride, oligomycin, paclitaxel, perhexiline, putrescine, pydoxine, pyridoxal-5-phosphate, rotenone, salicylate, simvastatin, spermidine, thymidine, TOFA, uridine, and valine. 3-methylpyruvate was purchased from FLUKA. Veliparib (ABT-888), BMN 673 and clofarabine were purchased from Selleckchem. Compound 968 (C968) was purchased from Calbiochem-Merck. Z-val-ala-asp(Ome)-fluoromethylketone (Z-VAD-fmk) was purchased from BACHEM.

RNA interference. The siRNA heteroduplexes specific for Bak (sense 5'-CCGACGCUAUGACUCAGAGdTdT), Bax (sense 5'- GGUGCCGGAACUGAUCAGAdTdT), Mcl-1 (sense 5'- GUGCCUUUGUGGCUAAACAdTdT), p53 (sense 5'- GCAUGAACCGGAGGCCAU dTdT-3') (Gu et al., 2004), PUMA (sense 5'- GGAUGGGCGGACGACCUAAdTdT), Glutaminase (siGLS; sense 5'- CUGAAUAUGUGCAUCGAUAdTdT) as well as one nontargeting siRNA (UNR, sense 5'- GCCGGUAUGCCGUUAAGUdTdT-3') were purchased from Sigma-Proligo. A second siRNA specific for GLS (GLSB) was purchased from Qiagen (SI04243148 FlexiTubeGen solution, Qiagen). A549 cells pre-seeded in 12-well plates at 20000 cells per well were transfected with siRNAs after 30 hours by using Hiperfect transfecting agent (Qiagen). Cells were treated with EBSS 36 hours after transfection, during 24 hours.

Cytofluorometry. To measure apoptotic features, adherent and non-adherent cells were collected and co-stained for 30 minutes at 37°C with 40 nM 3,3' dihexiloxalocarbocyanine iodide (DiOC₆(3)), Molecular Probes-Invitrogen), a mitochondrial transmembrane potential-sensitive dye, and 1 µg/ml propidium iodide (PI), which only accumulates in dead cells exhibiting plasma membrane rupture. Cytofluorometric acquisitions were carried out on a Milteny cytofluorometer (MACSQuant® Analyzer 10), and statistical analyses were performed by using the FlowJo software (LLC, Oregon, USA) upon gating on events exhibiting normal forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) parameters.

Immunoblotting. Cells were trypsinized, collected, washed twice with cold PBS, and lysed in a buffer containing 50 mM Tris HCl pH 6.8, glycerol 10%, 2% SDS, 10 mM DTT and 0.005% bromophenol blue. Subsequently, protein extracts (30 µg/lane) were separated on precast 4 to 12% SDS-PAGE gels (Invitrogen) followed by electrotransfer to nitrocellulose membranes (Biorad) and immunoblotting with primary antibodies targeting PAR (Clone 10H, mAb to Poly(ADP-ribose) Abcam, 1:1000) or glutaminase (GLS) (SAB2105954, Sigma-Aldrich, 1:1000). An antibody, which recognizes actin (mAb to beta actin, ab 49900, Abcam, 1:5000) was used to monitor equal lane loading. Thereafter, membranes were incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Southern Biotech), followed by chemiluminescence detection with the ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare), before being revealed by the ImageQuant™ LAS 4000 Biomolecular Imager (GE Healthcare Life Sciences). Finally, protein expression was quantified by ImageJ software (NIH, USA).

Mouse housing and experiments. Mice were maintained in specific pathogen-free conditions, at 25°C, with 12-hrs light/ 12-hrs dark cycles. All animals were used under an approved protocol by the local Ethics Committee (C2EA 26 n° E-94-076-11, protocol n°1113 and C2EA 05 n° B-75-06-12, protocol n°7810) under conditions in accordance with the EU Directive 63/2010. Eight-weeks-old female nude athymic (nu/nu) mice were purchased from Envigo France. Sample sizes were calculated to detect a statistically significant effect. For tumor growth experiments, 5×10^6 WT and CDDP-resistant R4 A549 cells were injected subcutaneously. The estimation of the tumor surface (longest dimension x perpendicular dimension) was measured using a common caliper. When the tumor surface reached 30-40 mm², mice were randomized into the different groups to be treated (by starvation or drugs). The investigator was blinded during the tumor size measurement.

Starvation regimen in vivo. After randomization, eight-weeks-old female nude athymic (nu/nu) mice were either kept in standard conditions (food and water ad libitum), or left for 24 hours in the absence of nutrients (though with ad libitum access to drinking water) two times a week. Mice weight was routinely monitored and nutrients absence was stopped if weight loss was superior to 20%.

Drug treatment in vivo. After randomization, mice were treated intraperitoneally either with 20 or 30 mg/kg 5-fluorouracil (5-FU) in a mix of 200 µL PBS containing 3% DMSO, or with 200 µL PBS containing 3% DMSO alone. Mice were sacrificed when tumor reached 2 cm².

Sample preparation for metabolome analysis. WT, R2 and R4 A549 cells were seeded in 6-well plates and cultured for 48 hours in complete medium. Ten hours before extraction, medium was changed and cells were cultured either in complete medium (CTL) or nutrient-deprived medium (NF), in the absence or presence of 2 mM glutamine (NF+GLN). Five replicates per condition. Subsequently, cells were washed 6 times with cold PBS, and then scraped in 500 µl of methanol (90%)-water (10%). After a centrifugation (10 000 g, 10 min, 4°C), 100 µl chloroform were added, and a second centrifugation was performed (10 000 g, 10 min, 4°C). The whole supernatant was evaporated at 40°C to obtain dried extracts. 300 µl of methanol were added on dried extract and split in two 150 µl fractions for GC-MS and LC-MS analyses respectively. For GC-MS assay, methanol solubilized aliquots were transferred to glass tubes and solvent was evaporated. 50 µl of methoxyamine (20 mg/ml in pyridine) were added on dried extracts, then

stored at room temperature in dark, during 16 hours. The day after, 80 µl of MSTFA was added and final derivatization occurred during 30 minutes at 40°C. Samples were then transferred to vials and directly injected into GC-MS. After a second evaporation round, LC-MS dried extracts were solubilized with 300µl of MilliQ water, centrifuged (10 min at 15000g 4°C) and aliquoted in 3 microcentrifuge tubes (100µl). Aliquots were transferred in UHPLC vials and injected into the UHPLC/MS or kept at -80 °C until injection.

Plasma preparation for metabolome analysis A volume of 50 µL of plasma was mixed with 500 µL of a cold solvent mixture (MeOH/Water/Chloroform, 9/1/1, -20°C), then vortexed and centrifuged (10 min at 15000 g, 4°C). Then upper phase of the supernatant was split in two parts: 220 µL for the GC/MS experiment, and 200 µL for the UHPLC/MS experimentations. Concerning the GC-MS aliquots, 30 µl from each sample were pooled in a QC vial, then 150 µl of samples were transferred in vial injection and evaporated. 50 µL of methoxyamine (20 mg/mL in pyridine) were added on dried extracts, then stored at room temperature in dark, during 16 hours. The day after, 80 µL of MSTFA were added and final derivatization occurred at 40°C during 30 minutes. Samples were then directly injected into GC-MS. Concerning the LC-MS aliquots, the collected supernatant was evaporated at 40°C in a pneumatically-assisted concentrator (Techne DB3, *Staffordshire, UK*). The LC-MS dried extracts were solubilized with 450 µL of MilliQ water. After picked up 60 µl from each microtubes to create pool of QC, samples were aliquoted (100 µL) for LC methods and backup. Biological samples and QC aliquots were kept at -80°C until injection or transferred in vials for direct analysis by UHPLC/MS.

Untargeted analysis of intracellular metabolites by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to a quadrupole-time of flight (QTOF) mass spectrometer. Profiling of intracellular metabolites was performed on a Liquid Chromatography (LC) 1260 system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a QTOF 6520 (Agilent Technologies) equipped with an electrospray source operating in both positive and negative mode and full scan mode from 50 to 1000 Da. The gas temperature was set to 350°C with a gas flow of 12 l/min. The capillary voltage was set to 3.5 kV, and the fragmentor at 120 V. Two reference masses were used to maintain the mass accuracy during analysis: m/z 121.050873 and m/z 922.009798 in positive mode and m/z 112.985587 and m/z 980.016375 in negative mode. 10 µL of sample were injected on a SB-Aq column (100 mm × 2.1 mm particle

size 1.8 µm) from Agilent Technologies, protected by a guard column XDB-C18 (5 mm × 2.1 mm particle size 1.8µm) and heated at 40°C. The gradient mobile phase consisted of water with 0.2% of acetic acid (A) and acetonitrile (B). The flow rate was set to 0.3mL/min. Initial condition is 98% phase A and 2% phase B. Molecules were then eluted using a gradient from 2% to 95% phase B in 7min. The column was washed using 95% mobile phase B for 3 minutes and equilibrated using 2% mobile phase B for 3min. The autosampler was kept at 4°C. Data processing was performed using in-house script to align molecular features found by the Agilent MassHunter qualitative software (B.07.00).

Targeted analysis of intracellular metabolites by ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to a Triple Quadrupole (QQQ) mass spectrometer. Targeted analysis was performed on a LC 1260 system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a Triple Quadrupole 6410 (Agilent Technologies) equipped with an electrospray source operating in positive mode. The gas temperature was set to 350°C with a gas flow of 12 l/min. The capillary voltage was set to 3.5 kV. 10 µL of sample were injected on a Zorbax Eclipse Plus C18 column (100 mm x 2.1 mm particle size 1.8 µm) from Agilent technologies, protected by a guard column XDB-C18 (5 mm × 2.1 mm particle size 1.8 µm) and heated at 40°C. The gradient mobile phase consisted of 2 mM of Dibutylamine ammonium acetate (DBAA) in water (A) and acetonitrile (B). The flow rate was set to 0.2mL/min, with the gradient as follows: initial condition was 90% phase A and 10% phase B, maintained during 4 min, from 10% to 95% phase B over 3 min, 95% mobile phase B for 3 min and finally 10% mobile phase B for 3 min. The autosampler was kept at 4°C. Peak detection and integration were performed using the Agilent MassHunter quantitative software (B.07.01).

Targeted analysis of intracellular metabolites gas chromatography (GC) coupled to a triple quadrupole (QQQ) mass spectrometer. The GC-MS/MS method was performed on a 7890A gas chromatography (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a triple quadrupole 7000C (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an electronic impact source (EI) operating in positive mode. The injection was performed in splitless mode with a front inlet temperature set to 250°C. The transfer line and the ion-source temperature were respectively at 250°C and 230°C. The septum purge flow was fixed at 3mL/min. The purge flow set to split vent and operated at 80mL/min during 1min. Gas saver mode was set to 15 mL/min after 5 min. The helium gas flowed at 1mL/min through the column (J&W ScientificHP-5MS, 30mx0.25 mm,i.d. 0.25 mm, d.f., Agilent Technologies Inc.). Column temperature was held at

60°C for 1min, then raised to 210°C (10°C/min), followed by a step to 230°C (5°C/min) and reached 325°C (15°C/min), and be held at this temperature for 5 min. The collision gas was nitrogen. Peak detection and integration were performed using the Agilent MassHunter software (B.07.01). Data were presented in heatmaps generated with Gene E software, Broad Institute, Cambridge, USA.

Statistical procedures of in vitro experiments

Unless otherwise specified, all experiments were conducted in duplicates and independently repeated at least three times, yielding comparable results. No statistical methods were used to predetermine sample size. For in vitro studies, data were analysed with Microsoft excel (Microsoft Co.) and statistical significance was assessed by means of unpaired Student's t-test except for Supplementary Fig. S3 (paired). P-values were considered significant when lower than 0.05. In the experiments in which the effect meets the criterion for significance in either direction, a two-sided t-test was used (Fig. 1A; 3A; 5B and E; 6A-D; Supplementary Fig. S3C). In all other experiments, as we expected the effect to be in a given direction, one-sided t-tests were applied.

Statistical procedures of in vivo experiments

Longitudinal analyses of tumor growth data were carried out by linear mixed-effect modeling on tumor sizes. Wald tests were used to compute p-values by testing jointly that both tumor growth slopes and intercepts were the same between treatment groups of interest. For graphing, tumor growth data are represented in group-averaged tumor size alongside its SEM at each time point. Survival data are represented in Kaplan-Meier survival curves. Log-rank test was used to compute p-values.

BIBLIOGRAPHIE

Aebi, S., Asereto, R., and Lauterburg, B.H. (1991). High-dose intravenous glutathione in man. Pharmacokinetics and effects on cyst(e)ine in plasma and urine. European journal of clinical investigation *21*, 103-110.

Agostini, M., Almeida, L.Y., Bastos, D.C., Ortega, R.M., Moreira, F.S., Seguin, F., Zecchin, K.G., Raposo, H.F., Oliveira, H.C., Amoedo, N.D., et al. (2014). The fatty acid synthase inhibitor orlistat reduces the growth and metastasis of orthotopic tongue oral squamous cell carcinomas. Molecular cancer therapeutics *13*, 585-595.

Agudo, A., Bonet, C., Travier, N., Gonzalez, C.A., Vineis, P., Bueno-de-Mesquita, H.B., Trichopoulos, D., Boffetta, P., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.C., et al. (2012). Impact of cigarette smoking on cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *30*, 4550-4557.

Aida, T., Takebayashi, Y., Shimizu, T., Okamura, C., Higashimoto, M., Kanzaki, A., Nakayama, K., Terada, K., Sugiyama, T., Miyazaki, K., et al. (2005). Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a prognostic factor in human endometrial carcinoma. Gynecologic oncology *97*, 41-45.

Albertella, M.R., Green, C.M., Lehmann, A.R., and O'Connor, M.J. (2005). A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. Cancer research *65*, 9799-9806.

Almuhaideb, A., Papathanasiou, N., and Bomanji, J. (2011). 18F-FDG PET/CT imaging in oncology. Annals of Saudi medicine *31*, 3-13.

Altman, B.J., Jacobs, S.R., Mason, E.F., Michalek, R.D., MacIntyre, A.N., Coloff, J.L., Ilkayeva, O., Jia, W., He, Y.W., and Rathmell, J.C. (2011). Autophagy is essential to suppress cell stress and to allow BCR-Abl-mediated leukemogenesis. Oncogene *30*, 1855-1867.

Ardizzoni, A., Boni, L., Tiseo, M., Fossella, F.V., Schiller, J.H., Paesmans, M., Radosavljevic, D., Paccagnella, A., Zatloukal, P., Mazzanti, P., et al. (2007). Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. Journal of the National Cancer Institute *99*, 847-857.

Aye, Y., Li, M., Long, M.J., and Weiss, R.S. (2015). Ribonucleotide reductase and cancer: biological mechanisms and targeted therapies. Oncogene *34*, 2011-2021.

Bai, Z.L., Wang, Y.Y., Zhe, H., He, J.L., and Hai, P. (2012). ERCC1 mRNA levels can predict the response to cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy of locally advanced cervical squamous cell carcinoma. Radiation oncology *7*, 221.

Bar-Sagi, D., and Feramisco, J.R. (1986). Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. Science *233*, 1061-1068.

Barthel, A., Okino, S.T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J.P., Jr., and Roth, R.A. (1999). Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *The Journal of biological chemistry* *274*, 20281-20286.

Baskerville, A., Hambleton, P., and Benbough, J.E. (1980). Pathological features of glutaminase toxicity. *British journal of experimental pathology* *61*, 132-138.

Bassett, E., Vaisman, A., Tropea, K.A., McCall, C.M., Masutani, C., Hanaoka, F., and Chaney, S.G. (2002). Frameshifts and deletions during in vitro translesion synthesis past Pt-DNA adducts by DNA polymerases beta and eta. *DNA repair* *1*, 1003-1016.

Bellon, S.F., Coleman, J.H., and Lippard, S.J. (1991). DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* *30*, 8026-8035.

Beloueche-Babari, M., Wantuch, S., Casals Galobart, T., Koniordou, M., Parkes, H.G., Arunan, V., Chung, Y.L., Ekykyn, T.R., Smith, P.D., and Leach, M.O. (2017). MCT1 inhibitor AZD3965 increases mitochondrial metabolism, facilitating combination therapy and non-invasive magnetic resonance spectroscopy. *Cancer research*.

Ben-Sahra, I., Howell, J.J., Asara, J.M., and Manning, B.D. (2013). Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science* *339*, 1323-1328.

Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., and Hall, M.N. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery* *10*, 868-880.

Beretta, G.L., Benedetti, V., Cossa, G., Assaraf, Y.G., Bram, E., Gatti, L., Corna, E., Carenini, N., Colangelo, D., Howell, S.B., et al. (2010). Increased levels and defective glycosylation of MRPs in ovarian carcinoma cells resistant to oxaliplatin. *Biochemical pharmacology* *79*, 1108-1117.

Bergstrom, J., Furst, P., Noree, L.O., and Vinnars, E. (1974). Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *Journal of applied physiology* *36*, 693-697.

Berndtsson, M., Hagg, M., Panaretakis, T., Havelka, A.M., Shoshan, M.C., and Linder, S. (2007). Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *International journal of cancer* *120*, 175-180.

Birendra, K.C., and DiNardo, C.D. (2016). Evidence for Clinical Differentiation and Differentiation Syndrome in Patients With Acute Myeloid Leukemia and IDH1 Mutations Treated With the Targeted Mutant IDH1 Inhibitor, AG-120. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* *16*, 460-465.

Black, D. (1994). Familial breast cancer. BRCA1 down, BRCA2 to go. *Current biology : CB* *4*, 1023-1024.

Blair, B.G., Larson, C.A., Safaei, R., and Howell, S.B. (2009). Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *15*, 4312-4321.

Bolzoni, M., Chiu, M., Accardi, F., Vescovini, R., Airolidi, I., Storti, P., Todoerti, K., Agnelli, L., Missale, G., Andreoli, R., et al. (2016). Dependence on glutamine uptake and glutamine addiction characterize myeloma cells: a new attractive target. *Blood* *128*, 667-679.

Bonnet, S., Archer, S.L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C.T., Lopaschuk, G.D., Puttagunta, L., Bonnet, S., et al. (2007). A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer cell* 11, 37-51.

Borst, P., Evers, R., Kool, M., and Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1295-1302.

Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology* 15, 713-720.

Branch, P., Masson, M., Aquilina, G., Bignami, M., and Karran, P. (2000). Spontaneous development of drug resistance: mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells. *Oncogene* 19, 3138-3145.

Brand, K., Leibold, W., Luppa, P., Schoerner, C., and Schulz, A. (1986). Metabolic alterations associated with proliferation of mitogen-activated lymphocytes and of lymphoblastoid cell lines: evaluation of glucose and glutamine metabolism. *Immunobiology* 173, 23-34.

Brenner, C., and Grimm, S. (2006). The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* 25, 4744-4756.

Brosnan, J.T. (2003). Interorgan amino acid transport and its regulation. *The Journal of nutrition* 133, 2068S-2072S.

Brown, K.K., Spinelli, J.B., Asara, J.M., and Toker, A. (2017). Adaptive Reprogramming of De Novo Pyrimidine Synthesis Is a Metabolic Vulnerability in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer discovery* 7, 391-399.

Brown, R., Hirst, G.L., Gallagher, W.M., McIlwrath, A.J., Margison, G.P., van der Zee, A.G., and Anthoney, D.A. (1997). hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene* 15, 45-52.

Buijs, M., Wijlemans, J.W., Kwak, B.K., Ota, S., and Geschwind, J.F. (2013). Antiglycolytic therapy combined with an image-guided minimally invasive delivery strategy for the treatment of breast cancer. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR* 24, 737-743.

Byrne, F.L., Poon, I.K., Modesitt, S.C., Tomsig, J.L., Chow, J.D., Healy, M.E., Baker, W.D., Atkins, K.A., Lancaster, J.M., Marchion, D.C., et al. (2014). Metabolic vulnerabilities in endometrial cancer. *Cancer research* 74, 5832-5845.

Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews. Cancer* 11, 85-95.

Chabner, B.A., and Roberts, T.G., Jr. (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature reviews. Cancer* 5, 65-72.

Chajes, V., Cambot, M., Moreau, K., Lenoir, G.M., and Joulin, V. (2006). Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer research* 66, 5287-5294.

Chambers, J.W., Maguire, T.G., and Alwine, J.C. (2010). Glutamine metabolism is essential for human cytomegalovirus infection. *Journal of virology* *84*, 1867-1873.

Chance, W.T., Cao, L., Nelson, J.L., Foley-Nelson, T., and Fischer, J.E. (1987). Acivicin reduces tumor growth during total parenteral nutrition (TPN). *Surgery* *102*, 386-394.

Chaneton, B., Hillmann, P., Zheng, L., Martin, A.C.L., Maddocks, O.D.K., Chokkathukalam, A., Coyle, J.E., Jankevics, A., Holding, F.P., Vousden, K.H., et al. (2012). Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature* *491*, 458-462.

Chaney, S.G., and Sancar, A. (1996). DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *Journal of the National Cancer Institute* *88*, 1346-1360.

Chao, T.K., Huang, T.S., Liao, Y.P., Huang, R.L., Su, P.H., Shen, H.Y., Lai, H.C., and Wang, Y.C. (2017). Pyruvate kinase M2 is a poor prognostic marker of and a therapeutic target in ovarian cancer. *PloS one* *12*, e0182166.

Chapiro, J., Sur, S., Savic, L.J., Ganapathy-Kanniappan, S., Reyes, J., Duran, R., Thiruganasambandam, S.C., Moats, C.R., Lin, M., Luo, W., et al. (2014). Systemic delivery of microencapsulated 3-bromopyruvate for the therapy of pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *20*, 6406-6417.

Chen, H.H., Yan, J.J., Chen, W.C., Kuo, M.T., Lai, Y.H., Lai, W.W., Liu, H.S., and Su, W.C. (2012). Predictive and prognostic value of human copper transporter 1 (hCtr1) in patients with stage III non-small-cell lung cancer receiving first-line platinum-based doublet chemotherapy. *Lung cancer* *75*, 228-234.

Chen, P., Li, J., Chen, Y.C., Qian, H., Chen, Y.J., Su, J.Y., Wu, M., and Lan, T. (2016). The functional status of DNA repair pathways determines the sensitization effect to cisplatin in non-small cell lung cancer cells. *Cellular oncology* *39*, 511-522.

Cheng, C.Y., Liu, J.C., Wang, J.J., Li, Y.H., Pan, J., and Zhang, Y.R. (2017). Autophagy inhibition increased the anti-tumor effect of cisplatin on drug-resistant esophageal cancer cells. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* *31*, 645-652.

Cheong, H., Lindsten, T., Wu, J., Lu, C., and Thompson, C.B. (2011). Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 11121-11126.

Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* *303*, 1010-1014.

Chon, J., Stover, P.J., and Field, M.S. (2017). Targeting nuclear thymidylate biosynthesis. *Molecular aspects of medicine* *53*, 48-56.

Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L., and Cantley, L.C. (2008a). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* *452*, 230-233.

Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Wu, N., Asara, J.M., and Cantley, L.C. (2008b). Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* *452*, 181-186.

Ciaparrone, M., Caspiani, O., Bicciolo, G., Signorelli, D., Simonelli, I., de Campora, L., Mazzarella, G., Mecozzi, A., Pianelli, C., Camaioni, A., et al. (2015). Predictive Role of ERCC1 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients Treated with Surgery and Adjuvant Cisplatin-Based Chemoradiation. *Oncology* *89*, 227-234.

Circu, M., Cardelli, J., Barr, M., O'Byrne, K., Mills, G., and El-Osta, H. (2017). Modulating lysosomal function through lysosome membrane permeabilization or autophagy suppression restores sensitivity to cisplatin in refractory non-small-cell lung cancer cells. *PloS one* *12*, e0184922.

Comella, P., Filippelli, G., De Cataldis, G., Massidda, B., Frasci, G., Maiorino, L., Putzu, C., Mancarella, S., Palmeri, S., Cioffi, R., et al. (2007). Efficacy of the combination of cisplatin with either gemcitabine and vinorelbine or gemcitabine and paclitaxel in the treatment of locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: a phase III randomised trial of the Southern Italy Cooperative Oncology Group (SICO 0101). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* *18*, 324-330.

Commissio, C., Davidson, S.M., Soydaner-Azeloglu, R.G., Parker, S.J., Kamphorst, J.J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J.A., Thompson, C.B., et al. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* *497*, 633-637.

Conrad, M., and Sato, H. (2012). The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond. *Amino acids* *42*, 231-246.

Cortes-Cros, M., Hemmerlin, C., Ferretti, S., Zhang, J., Gounarides, J.S., Yin, H., Muller, A., Haberkorn, A., Chene, P., Sellers, W.R., et al. (2013). M2 isoform of pyruvate kinase is dispensable for tumor maintenance and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 489-494.

Courtois, S., Duran, R.V., Giraud, J., Sifre, E., Izotte, J., Megraud, F., Lehours, P., Varon, C., and Bessede, E. (2017). Metformin targets gastric cancer stem cells. *European journal of cancer* *84*, 193-201.

Cui, Y., Konig, J., Buchholz, J.K., Spring, H., Leier, I., and Keppler, D. (1999). Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Molecular pharmacology* *55*, 929-937.

Cunningham, J.T., Moreno, M.V., Lodi, A., Ronen, S.M., and Ruggero, D. (2014). Protein and nucleotide biosynthesis are coupled by a single rate-limiting enzyme, PRPS2, to drive cancer. *Cell* *157*, 1088-1103.

Dabholkar, M., Thornton, K., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J.J., and Reed, E. (2000). Increased mRNA levels of xeroderma pigmentosum complementation group B (XPB) and Cockayne's syndrome complementation group B (CSB) without increased mRNA levels of multidrug-resistance gene (MDR1) or metallothionein-II (MT-II) in platinum-resistant human ovarian cancer tissues. *Biochemical pharmacology* *60*, 1611-1619.

Dasgupta, S., Putluri, N., Long, W., Zhang, B., Wang, J., Kaushik, A.K., Arnold, J.M., Bhowmik, S.K., Stashi, E., Brennan, C.A., et al. (2015). Coactivator SRC-2-dependent metabolic

reprogramming mediates prostate cancer survival and metastasis. *The Journal of clinical investigation* 125, 1174-1188.

Decker, D.A., Drelichman, A., Jacobs, J., Hoschner, J., Kinzie, J., Loh, J.J., Weaver, A., and Al-Sarraf, M. (1983). Adjuvant chemotherapy with cis-diamminodichloroplatinum II and 120-hour infusion 5-fluorouracil in Stage III and IV squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 51, 1353-1355.

Deloia, J.A., Bhagwat, N.R., Darcy, K.M., Strange, M., Tian, C., Nuttall, K., Krivak, T.C., and Niedernhofer, L.J. (2012). Comparison of ERCC1/XPF genetic variation, mRNA and protein levels in women with advanced stage ovarian cancer treated with intraperitoneal platinum. *Gynecologic oncology* 126, 448-454.

Depierre, A., Westeel, V., and Jacoulet, P. (2002). [New neoadjuvant approaches using gemcitabine in non-small-cell lung cancer]. *Bulletin du cancer* 89 Spec No, S76-79.

Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D.R., Hue, L., and Rider, M.H. (1997). Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *The Journal of biological chemistry* 272, 17269-17275.

Drummond, J.T., Anthoney, A., Brown, R., and Modrich, P. (1996). Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutL α and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *The Journal of biological chemistry* 271, 19645-19648.

Dunbar, E.M., Coats, B.S., Shroads, A.L., Langae, T., Lew, A., Forder, J.R., Shuster, J.J., Wagner, D.A., and Stacpoole, P.W. (2014). Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors. *Investigational new drugs* 32, 452-464.

Duran, R.V., Oppliger, W., Robitaille, A.M., Heiserich, L., Skendaj, R., Gottlieb, E., and Hall, M.N. (2012). Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Molecular cell* 47, 349-358.

Dwarakanath, B.S., Singh, D., Banerji, A.K., Sarin, R., Venkataramana, N.K., Jalali, R., Vishwanath, P.N., Mohanti, B.K., Tripathi, R.P., Kalia, V.K., et al. (2009). Clinical studies for improving radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: present status and future prospects. *Journal of cancer research and therapeutics* 5 Suppl 1, S21-26.

Eagle, H. (1955). The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure. *The Journal of experimental medicine* 102, 595-600.

Earhart, R.H., Koeller, J.M., and Davis, H.L. (1982). Phase I trial of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) administered by 5-day courses. *Cancer treatment reports* 66, 1215-1217.

Eberhardy, S.R., and Farnham, P.J. (2001). c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *The Journal of biological chemistry* 276, 48562-48571.

Edson, N.L., and Krebs, H.A. (1936). Micro-determination of uric acid. *The Biochemical journal* 30, 732-735.

Einhorn, L.H. (1990). Treatment of testicular cancer: a new and improved model. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 8, 1777-1781.

El-Hamamsy, M., Elwakil, H., Saad, A.S., and Shawki, M.A. (2016). A Randomized Controlled Open-Label Pilot Study of Simvastatin Addition to Whole-Brain Radiation Therapy in Patients With Brain Metastases. *Oncology research* 24, 521-528.

El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Averet, N., Rigoulet, M., and Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *The Journal of biological chemistry* 275, 223-228.

Emadi, A., Jun, S.A., Tsukamoto, T., Fathi, A.T., Minden, M.D., and Dang, C.V. (2014). Inhibition of glutaminase selectively suppresses the growth of primary acute myeloid leukemia cells with IDH mutations. *Experimental hematology* 42, 247-251.

Estrella, V., Chen, T., Lloyd, M., Wojtkowiak, J., Cornell, H.H., Ibrahim-Hashim, A., Bailey, K., Balagurunathan, Y., Rothberg, J.M., Sloane, B.F., et al. (2013). Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer research* 73, 1524-1535.

Fan, J., Kamphorst, J.J., Mathew, R., Chung, M.K., White, E., Shlomi, T., and Rabinowitz, J.D. (2013a). Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Molecular systems biology* 9, 712.

Fan, J., Kamphorst, J.J., Rabinowitz, J.D., and Shlomi, T. (2013b). Fatty acid labeling from glutamine in hypoxia can be explained by isotope exchange without net reductive isocitrate dehydrogenase (IDH) flux. *The Journal of biological chemistry* 288, 31363-31369.

Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., et al. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917-921.

Feldman, D.R., Bosl, G.J., Sheinfeld, J., and Motzer, R.J. (2008). Medical treatment of advanced testicular cancer. *Jama* 299, 672-684.

Felig, P., Wahren, J., and Raf, L. (1973). Evidence of inter-organ amino-acid transport by blood cells in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 1775-1779.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* 136, E359-386.

Fernandez, F.G., and Battafarano, R.J. (2006). Large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 13, 270-275.

Fink, D., Aebi, S., and Howell, S.B. (1998). The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 4, 1-6.

Flavin, R., Peluso, S., Nguyen, P.L., and Loda, M. (2010). Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future oncology* 6, 551-562.

Frankenberg-Schwager, M., Kirchermeier, D., Greif, G., Baer, K., Becker, M., and Frankenberg, D. (2005). Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in replicating but not in quiescent cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology* *212*, 175-184.

Furuta, T., Ueda, T., Aune, G., Sarasin, A., Kraemer, K.H., and Pommier, Y. (2002). Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer research* *62*, 4899-4902.

Gadducci, A., Cosio, S., Muraca, S., and Genazzani, A.R. (2002). Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. *European journal of gynaecological oncology* *23*, 390-396.

Gaglio, D., Soldati, C., Vanoni, M., Alberghina, L., and Chiaradonna, F. (2009). Glutamine deprivation induces abortive S-phase rescued by deoxyribonucleotides in k-ras transformed fibroblasts. *PloS one* *4*, e4715.

Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G., Harel-Bellan, A., Castedo, M., and Kroemer, G. (2014). Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell death & disease* *5*, e1257.

Gameiro, P.A., Yang, J., Metelo, A.M., Perez-Carro, R., Baker, R., Wang, Z., Arreola, A., Rathmell, W.K., Olumi, A., Lopez-Larrubia, P., et al. (2013). In vivo HIF-mediated reductive carboxylation is regulated by citrate levels and sensitizes VHL-deficient cells to glutamine deprivation. *Cell metabolism* *17*, 372-385.

Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.C., Lee, Y.S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., et al. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* *458*, 762-765.

Gao, S., Tu, D.N., Li, H., Jiang, J.X., Cao, X., You, J.B., and Zhou, X.Q. (2016). Pharmacological or genetic inhibition of LDHA reverses tumor progression of pediatric osteosarcoma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* *81*, 388-393.

Garon, E.B., Christofk, H.R., Hosmer, W., Britten, C.D., Bahng, A., Crabtree, M.J., Hong, C.S., Kamranpour, N., Pitts, S., Kabbinavar, F., et al. (2014). Dichloroacetate should be considered with platinum-based chemotherapy in hypoxic tumors rather than as a single agent in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* *140*, 443-452.

Gaur, S., Chen, L., Yang, L., Wu, X., Un, F., and Yen, Y. (2011). Inhibitors of mTOR overcome drug resistance from topoisomerase II inhibitors in solid tumors. *Cancer letters* *311*, 20-28.

Gautier, E.L., Westerterp, M., Bhagwat, N., Cremers, S., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Lutjohann, D., Randolph, G.J., Levine, R.L., Tall, A.R., et al. (2013). HDL and Glut1 inhibition reverse a hypermetabolic state in mouse models of myeloproliferative disorders. *The Journal of experimental medicine* *210*, 339-353.

Ghosh-Choudhury, N., Mandal, C.C., Ghosh-Choudhury, N., and Ghosh Choudhury, G. (2010). Simvastatin induces derepression of PTEN expression via NFκB to inhibit breast cancer cell growth. *Cellular signalling* *22*, 749-758.

Glynn, S.A., O'Sullivan, D., Eustace, A.J., Clynes, M., and O'Donovan, N. (2008). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. *BMC cancer* 8, 9.

Godoy, L.C., Anderson, C.T., Chowdhury, R., Trudel, L.J., and Wogan, G.N. (2012). Endogenously produced nitric oxide mitigates sensitivity of melanoma cells to cisplatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 20373-20378.

Godwin, A.K., Meister, A., O'Dwyer, P.J., Huang, C.S., Hamilton, T.C., and Anderson, M.E. (1992). High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 3070-3074.

Goldberg, M.S., and Sharp, P.A. (2012). Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression. *The Journal of experimental medicine* 209, 217-224.

Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C., and Perez, J.M. (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular pharmacology* 59, 657-663.

Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, R.B., and Hay, N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes & development* 15, 1406-1418.

Gralla, R.J., Casper, E.S., Kelsen, D.P., Braun, D.W., Jr., Dukeman, M.E., Martini, N., Young, C.W., and Golbey, R.B. (1981). Cisplatin and vindesine combination chemotherapy for advanced carcinoma of the lung: A randomized trial investigating two dosage schedules. *Annals of internal medicine* 95, 414-420.

Grassian, A.R., Coloff, J.L., and Brugge, J.S. (2011). Extracellular matrix regulation of metabolism and implications for tumorigenesis. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 76, 313-324.

Grompe, M., and D'Andrea, A. (2001). Fanconi anemia and DNA repair. *Human molecular genetics* 10, 2253-2259.

Gross, M.I., Demo, S.D., Dennison, J.B., Chen, L., Chernov-Rogan, T., Goyal, B., Janes, J.R., Laidig, G.J., Lewis, E.R., Li, J., et al. (2014). Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer. *Molecular cancer therapeutics* 13, 890-901.

Guth, P.S., Risey, J., Briner, W., Blair, P., Reed, H.T., Bryant, G., Norris, C., Housley, G., and Miller, R. (1990). Evaluation of amino-oxyacetic acid as a palliative in tinnitus. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 99, 74-79.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hao, Y., Samuels, Y., Li, Q., Krokowski, D., Guan, B.J., Wang, C., Jin, Z., Dong, B., Cao, B., Feng, X., et al. (2016). Oncogenic PIK3CA mutations reprogram glutamine metabolism in colorectal cancer. *Nature communications* 7, 11971.

Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature reviews. Cancer* *16*, 635-649.

Heinemann, V., Quietzsch, D., Gieseler, F., Gonnermann, M., Schonekas, H., Rost, A., Neuhaus, H., Haag, C., Clemens, M., Heinrich, B., et al. (2006). Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *24*, 3946-3952.

Henderson, D., Frieson, D., Zuber, J., and Solomon, S.S. (2017). Metformin Has Positive Therapeutic Effects in Colon Cancer and Lung Cancer. *The American journal of the medical sciences* *354*, 246-251.

Hensley, C.T., Wasti, A.T., and DeBerardinis, R.J. (2013). Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of clinical investigation* *123*, 3678-3684.

Holzer, A.K., and Howell, S.B. (2006). The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer research* *66*, 10944-10952.

Holzer, A.K., Manorek, G.H., and Howell, S.B. (2006). Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Molecular pharmacology* *70*, 1390-1394.

Huang, J., Zhou, Y., Zhang, H., Qu, T., Mao, Y., Zhu, H., Quan, L., Xing, P., Wang, J., He, J., et al. (2013). A phase II study of biweekly paclitaxel and cisplatin chemotherapy for recurrent or metastatic esophageal squamous cell carcinoma: ERCC1 expression predicts response to chemotherapy. *Medical oncology* *30*, 343.

Huang, K.K., Jang, K.W., Kim, S., Kim, H.S., Kim, S.M., Kwon, H.J., Kim, H.R., Yun, H.J., Ahn, M.J., Park, K.U., et al. (2016). Exome sequencing reveals recurrent REV3L mutations in cisplatin-resistant squamous cell carcinoma of head and neck. *Scientific reports* *6*, 19552.

Hudson, C.D., Savadelis, A., Nagaraj, A.B., Joseph, P., Avril, S., DiFeo, A., and Avril, N. (2016). Altered glutamine metabolism in platinum resistant ovarian cancer. *Oncotarget* *7*, 41637-41649.

Imai, H., Kaira, K., Oriuchi, N., Shimizu, K., Tominaga, H., Yanagitani, N., Sunaga, N., Ishizuka, T., Nagamori, S., Promchan, K., et al. (2010). Inhibition of L-type amino acid transporter 1 has antitumor activity in non-small cell lung cancer. *Anticancer research* *30*, 4819-4828.

Ingersoll, M.A., Miller, D.R., Martinez, O., Wakefield, C.B., Hsieh, K.C., Simha, M.V., Kao, C.L., Chen, H.T., Batra, S.K., and Lin, M.F. (2016). Statin derivatives as therapeutic agents for castration-resistant prostate cancer. *Cancer letters* *383*, 94-105.

Ishida, S., Lee, J., Thiele, D.J., and Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctrl1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 14298-14302.

Ishida, S., McCormick, F., Smith-McCune, K., and Hanahan, D. (2010). Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. *Cancer Cell* *17*, 574-583.

Ishiguro, T., Ishiguro, R., Ishiguro, M., and Iwai, S. (2012). Co-treatment of dichloroacetate, omeprazole and tamoxifen exhibited synergistically antiproliferative effect on malignant tumors: in vivo experiments and a case report. *Hepato-gastroenterology* 59, 994-996.

Ishikawa, T. (1992). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends in biochemical sciences* 17, 463-468.

Itkonen, H.M., Gorad, S.S., Duveau, D.Y., Martin, S.E., Barkovskaya, A., Bathen, T.F., Moestue, S.A., and Mills, I.G. (2016). Inhibition of O-GlcNAc transferase activity reprograms prostate cancer cell metabolism. *Oncotarget* 7, 12464-12476.

Itkonen, H.M., Minner, S., Gulsvik, I.J., Sandmann, M.J., Tsourlakis, M.C., Berge, V., Svindland, A., Schlomm, T., and Mills, I.G. (2013). O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer research* 73, 5277-5287.

Javeshghani, S., Zakikhani, M., Austin, S., Bazile, M., Blouin, M.J., Topisirovic, I., St-Pierre, J., and Pollak, M.N. (2012). Carbon source and myc expression influence the antiproliferative actions of metformin. *Cancer research* 72, 6257-6267.

Jewell, J.L., Kim, Y.C., Russell, R.C., Yu, F.X., Park, H.W., Plouffe, S.W., Tagliabrace, V.S., and Guan, K.L. (2015). Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science* 347, 194-198.

Jiang, P., Du, W., Wang, X., Mancuso, A., Gao, X., Wu, M., and Yang, X. (2011). p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nature cell biology* 13, 310-316.

Jordan, P., and Carmo-Fonseca, M. (2000). Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 57, 1229-1235.

Kadoda, K., Moriwaki, T., Tsuda, M., Sasanuma, H., Ishiai, M., Takata, M., Ide, H., Masunaga, S.I., Takeda, S., and Tano, K. (2017). Selective cytotoxicity of the anti-diabetic drug, metformin, in glucose-deprived chicken DT40 cells. *PloS one* 12, e0185141.

Kaira, K., Takahashi, T., Murakami, H., Shukuya, T., Kenmotsu, H., Naito, T., Oriuchi, N., Kanai, Y., Endo, M., Kondo, H., et al. (2011). Relationship between LAT1 expression and response to platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer patients with postoperative recurrence. *Anticancer research* 31, 3775-3782.

Kamata, S., Kishimoto, T., Kobayashi, S., Miyazaki, M., and Ishikura, H. (2007). Possible involvement of persistent activity of the mammalian target of rapamycin pathway in the cisplatin resistance of AFP-producing gastric cancer cells. *Cancer biology & therapy* 6, 1036-1043.

Kant, S., Kumar, A., and Singh, S.M. (2014). Tumor growth retardation and chemosensitizing action of fatty acid synthase inhibitor orlistat on T cell lymphoma: implication of reconstituted tumor microenvironment and multidrug resistance phenotype. *Biochimica et biophysica acta* 1840, 294-302.

Karageorgopoulou, S., Kostakis, I.D., Gazouli, M., Markaki, S., Papadimitriou, M., Bournakis, E., Dimopoulos, M.A., and Papadimitriou, C.A. (2017). Prognostic and predictive factors in

patients with metastatic or recurrent cervical cancer treated with platinum-based chemotherapy. *BMC cancer* 17, 451.

Kasahara, K., Fujiwara, Y., Nishio, K., Ohmori, T., Sugimoto, Y., Komiya, K., Matsuda, T., and Saijo, N. (1991). Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer research* 51, 3237-3242.

Katano, K., Kondo, A., Safaei, R., Holzer, A., Samimi, G., Mishima, M., Kuo, Y.M., Rochdi, M., and Howell, S.B. (2002). Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer research* 62, 6559-6565.

Kats, L.M., Vervoort, S.J., Cole, R., Rogers, A.J., Gregory, G.P., Vidacs, E., Li, J., Nagaraja, R., Yen, K.E., and Johnstone, R.W. (2017). A pharmacogenomic approach validates AG-221 as an effective and on-target therapy in IDH2 mutant AML. *Leukemia* 31, 1466-1470.

Ke, S.Z., Ni, X.Y., Zhang, Y.H., Wang, Y.N., Wu, B., and Gao, F.G. (2013). Camptothecin and cisplatin upregulate ABCG2 and MRP2 expression by activating the ATM/NF-kappaB pathway in lung cancer cells. *International journal of oncology* 42, 1289-1296.

Kelley, S.L., Basu, A., Teicher, B.A., Hacker, M.P., Hamer, D.H., and Lazo, J.S. (1988). Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* 241, 1813-1815.

Kerr, M.C., and Teasdale, R.D. (2009). Defining macropinocytosis. *Traffic* 10, 364-371.

Khan, A., Andrews, D., and Blackburn, A.C. (2016). Long-term stabilization of stage 4 colon cancer using sodium dichloroacetate therapy. *World journal of clinical cases* 4, 336-343.

Khan, A., Andrews, D., Shainhouse, J., and Blackburn, A.C. (2017). Long-term stabilization of metastatic melanoma with sodium dichloroacetate. *World journal of clinical oncology* 8, 371-377.

Kim, E.S., Tang, X., Peterson, D.R., Kilari, D., Chow, C.W., Fujimoto, J., Kalhor, N., Swisher, S.G., Stewart, D.J., Wistuba, II, et al. (2014). Copper transporter CTR1 expression and tissue platinum concentration in non-small cell lung cancer. *Lung cancer* 85, 88-93.

Kirsch, D.G., and Kastan, M.B. (1998). Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16, 3158-3168.

Koberle, B., Ditz, C., Kausch, I., Wollenberg, B., Ferris, R.L., and Albers, A.E. (2010). Metastases of squamous cell carcinoma of the head and neck show increased levels of nucleotide excision repair protein XPF in vivo that correlate with increased chemoresistance ex vivo. *International journal of oncology* 36, 1277-1284.

Koike, K., Kawabe, T., Tanaka, T., Toh, S., Uchiumi, T., Wada, M., Akiyama, S., Ono, M., and Kuwano, M. (1997). A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer research* 57, 5475-5479.

Kollareddy, M., Dimitrova, E., Vallabhaneni, K.C., Chan, A., Le, T., Chauhan, K.M., Carrero, Z.I., Ramakrishnan, G., Watabe, K., Haupt, Y., et al. (2015). Regulation of nucleotide

metabolism by mutant p53 contributes to its gain-of-function activities. *Nature communications* 6, 7389.

Korangath, P., Teo, W.W., Sadik, H., Han, L., Mori, N., Huijts, C.M., Wildes, F., Bharti, S., Zhang, Z., Santa-Maria, C.A., et al. (2015). Targeting Glutamine Metabolism in Breast Cancer with Aminooxyacetate. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 3263-3273.

Korita, P.V., Wakai, T., Shirai, Y., Matsuda, Y., Sakata, J., Takamura, M., Yano, M., Sanpei, A., Aoyagi, Y., Hatakeyama, K., et al. (2010). Multidrug resistance-associated protein 2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology reports* 23, 965-972.

Krajcovic, M., Krishna, S., Akkari, L., Joyce, J.A., and Overholtzer, M. (2013). mTOR regulates phagosome and entotic vacuole fission. *Molecular biology of the cell* 24, 3736-3745.

Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* 87, 99-163.

Kroemer, G., Marino, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell* 40, 280-293.

Kumar, A., Kant, S., and Singh, S.M. (2012). Novel molecular mechanisms of antitumor action of dichloroacetate against T cell lymphoma: Implication of altered glucose metabolism, pH homeostasis and cell survival regulation. *Chemico-biological interactions* 199, 29-37.

Kunkel, T.A., and Erie, D.A. (2005). DNA mismatch repair. *Annual review of biochemistry* 74, 681-710.

Lane, A.N., and Fan, T.W. (2015). Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic acids research* 43, 2466-2485.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.

Le, A., Cooper, C.R., Gouw, A.M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L.M., Royer, R.E., Vander Jagt, D.L., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2037-2042.

Le Calve, B., Rynkowska, M., Le Mercier, M., Bruyere, C., Lonez, C., Gras, T., Haibe-Kains, B., Bontempi, G., Decaestecker, C., Ruysschaert, J.M., et al. (2010). Long-term in vitro treatment of human glioblastoma cells with temozolomide increases resistance in vivo through up-regulation of GLUT transporter and aldo-keto reductase enzyme AKR1C expression. *Neoplasia* 12, 727-739.

Lee, C., Raffaghelli, L., Brandhorst, S., Safdie, F.M., Bianchi, G., Martin-Montalvo, A., Pistoia, V., Wei, M., Hwang, S., Merlino, A., et al. (2012). Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Science translational medicine* 4, 124ra127.

Lee, H.S., Lee, S.H., Lee, H.J., Chung, M.J., Park, J.Y., Park, S.W., Song, S.Y., and Bang, S. (2016). Statin Use and Its Impact on Survival in Pancreatic Cancer Patients. *Medicine* 95, e3607.

Lee, J.H., Chae, J.W., Kim, J.K., Kim, H.J., Chung, J.Y., and Kim, Y.H. (2015). Inhibition of cisplatin-resistance by RNA interference targeting metallothionein using reducible oligopeptoplex. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 215, 82-90.

Lee, Y.Y., Choi, C.H., Do, I.G., Song, S.Y., Lee, W., Park, H.S., Song, T.J., Kim, M.K., Kim, T.J., Lee, J.W., et al. (2011). Prognostic value of the copper transporters, CTR1 and CTR2, in patients with ovarian carcinoma receiving platinum-based chemotherapy. *Gynecologic oncology* 122, 361-365.

Leung, A.W., Hung, S.S., Backstrom, I., Ricaurte, D., Kwok, B., Poon, S., McKinney, S., Segovia, R., Rawji, J., Qadir, M.A., et al. (2016). Combined Use of Gene Expression Modeling and siRNA Screening Identifies Genes and Pathways Which Enhance the Activity of Cisplatin When Added at No Effect Levels to Non-Small Cell Lung Cancer Cells In Vitro. *PloS one* 11, e0150675.

Lewis, A.D., Hayes, J.D., and Wolf, C.R. (1988). Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis* 9, 1283-1287.

Li, C., Li, M., Chen, P., Narayan, S., Matschinsky, F.M., Bennett, M.J., Stanley, C.A., and Smith, T.J. (2011). Green tea polyphenols control dysregulated glutamate dehydrogenase in transgenic mice by hijacking the ADP activation site. *The Journal of biological chemistry* 286, 34164-34174.

Li, C., Liu, M., Yan, A., Liu, W., Hou, J., Cai, L., and Dong, X. (2014). ERCC1 and the efficacy of cisplatin in patients with resected non-small cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35, 12707-12712.

Li, J., and Cheng, J.X. (2014). Direct visualization of de novo lipogenesis in single living cells. *Scientific reports* 4, 6807.

Li, M., Allen, A., and Smith, T.J. (2007). High throughput screening reveals several new classes of glutamate dehydrogenase inhibitors. *Biochemistry* 46, 15089-15102.

Li, Q., Gardner, K., Zhang, L., Tsang, B., Bostick-Bruton, F., and Reed, E. (1998). Cisplatin induction of ERCC-1 mRNA expression in A2780/CP70 human ovarian cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 273, 23419-23425.

Li, Q., Yu, J.J., Mu, C., Yunmbam, M.K., Slavsky, D., Cross, C.L., Bostick-Bruton, F., and Reed, E. (2000). Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer research* 20, 645-652.

Lieberman, B.P., Ploessl, K., Wang, L., Qu, W., Zha, Z., Wise, D.R., Chodosh, L.A., Belka, G., Thompson, C.B., and Kung, H.F. (2011). PET imaging of glutaminolysis in tumors by 18F-(2S,4R)4-fluoroglutamine. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 52, 1947-1955.

Liedert, B., Materna, V., Schadendorf, D., Thomale, J., and Lage, H. (2003). Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. *The Journal of investigative dermatology* 121, 172-176.

Lin, J.J., Ezer, N., Sigel, K., Mhango, G., and Wisnivesky, J.P. (2016). The effect of statins on survival in patients with stage IV lung cancer. *Lung cancer* 99, 137-142.

Lindsten, T., Golden, J.A., Zong, W.X., Minarcik, J., Harris, M.H., and Thompson, C.B. (2003). The proapoptotic activities of Bax and Bak limit the size of the neural stem cell pool. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 11112-11119.

Liu, B., Jia, Y., Cao, Y., Wu, S., Jiang, H., Sun, X., Ma, J., Yin, X., Mao, A., and Shang, M. (2016). Overexpression of Phosphoserine Aminotransferase 1 (PSAT1) Predicts Poor Prognosis and Associates with Tumor Progression in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 39, 395-406.

Liu, W., Le, A., Hancock, C., Lane, A.N., Dang, C.V., Fan, T.W., and Phang, J.M. (2012a). Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 8983-8988.

Liu, Y., Cao, Y., Zhang, W., Bergmeier, S., Qian, Y., Akbar, H., Colvin, R., Ding, J., Tong, L., Wu, S., et al. (2012b). A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 11, 1672-1682.

Liu, Y.C., Li, F., Handler, J., Huang, C.R., Xiang, Y., Neretti, N., Sedivy, J.M., Zeller, K.I., and Dang, C.V. (2008). Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc. *PloS one* 3, e2722.

Locasale, J.W., Grassian, A.R., Melman, T., Lyssiotis, C.A., Mattaini, K.R., Bass, A.J., Heffron, G., Metallo, C.M., Muranen, T., Sharfi, H., et al. (2011). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nature genetics* 43, 869-874.

Loh, S.Y., Mistry, P., Kelland, L.R., Abel, G., and Harrap, K.R. (1992). Reduced drug accumulation as a major mechanism of acquired resistance to cisplatin in a human ovarian carcinoma cell line: circumvention studies using novel platinum (II) and (IV) ammine/amine complexes. *British journal of cancer* 66, 1109-1115.

Longo, V.D., and Panda, S. (2016). Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell metabolism* 23, 1048-1059.

Lu, S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine* 30, 42-59.

Luanpitpong, S., Angsutararux, P., Samart, P., Chanthra, N., Chanvorachote, P., and Issaragrisil, S. (2017). Hyper-O-GlcNAcylation induces cisplatin resistance via regulation of p53 and c-Myc in human lung carcinoma. *Scientific reports* 7, 10607.

Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120, 237-248.

Lv, M., Zhu, X., Wang, H., Wang, F., and Guan, W. (2014). Roles of caloric restriction, ketogenic diet and intermittent fasting during initiation, progression and metastasis of cancer in animal models: a systematic review and meta-analysis. *PloS one* 9, e115147.

MA, E.L.B., and El Kashef, W.F. (2017). ERCC1 Expression in Metastatic Triple Negative Breast Cancer Patients Treated with Platinum-Based Chemotherapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 18, 507-513.

Ma, L., Niknejad, N., Gorn-Hondermann, I., Dayekh, K., and Dimitroulakos, J. (2012). Lovastatin induces multiple stress pathways including LKB1/AMPK activation that regulate its cytotoxic effects in squamous cell carcinoma cells. *PloS one* 7, e46055.

Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., Gemma, A., Harada, M., Yoshizawa, H., Kinoshita, I., et al. (2010). Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *The New England journal of medicine* 362, 2380-2388.

Mandic, A., Hansson, J., Linder, S., and Shoshan, M.C. (2003). Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *The Journal of biological chemistry* 278, 9100-9106.

Mannava, S., Grachtchouk, V., Wheeler, L.J., Im, M., Zhuang, D., Slavina, E.G., Mathews, C.K., Shewach, D.S., and Nikiforov, M.A. (2008). Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. *Cell cycle* 7, 2392-2400.

Marquez, J., Sanchez-Jimenez, F., Medina, M.A., Quesada, A.R., and Nunez de Castro, I. (1989). Nitrogen metabolism in tumor bearing mice. *Archives of biochemistry and biophysics* 268, 667-675.

Marshall, A.D., van Geldermalsen, M., Otte, N.J., Lum, T., Vellozzi, M., Thoeng, A., Pang, A., Nagarajah, R., Zhang, B., Wang, Q., et al. (2017). ASCT2 regulates glutamine uptake and cell growth in endometrial carcinoma. *Oncogenesis* 6, e367.

Mashimo, T., Pichumani, K., Vemireddy, V., Hatanpaa, K.J., Singh, D.K., Sirasanagandla, S., Nanneppaga, S., Piccirillo, S.G., Kovacs, Z., Foong, C., et al. (2014). Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases. *Cell* 159, 1603-1614.

Matassa, D.S., Amoroso, M.R., Lu, H., Avolio, R., Arzeni, D., Procaccini, C., Faicchia, D., Maddalena, F., Simeon, V., Agliarulo, I., et al. (2016). Oxidative metabolism drives inflammation-induced platinum resistance in human ovarian cancer. *Cell death and differentiation* 23, 1542-1554.

Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., et al. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137, 1062-1075.

Mattison, J.A., Colman, R.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Kemnitz, J.W., Roth, G.S., Ingram, D.K., Weindruch, R., de Cabo, R., and Anderson, R.M. (2017). Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nature communications* 8, 14063.

Medina, M.A., Sanchez-Jimenez, F., Marquez, J., Rodriguez Quesada, A., and Nunez de Castro, I. (1992). Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Molecular and cellular biochemistry* 113, 1-15.

Meireles, C.G., Pereira, S.A., Valadares, L.P., Rego, D.F., Simeoni, L.A., Guerra, E.N.S., and Lofrano-Porto, A. (2017). Effects of metformin on endometrial cancer: Systematic review and meta-analysis. *Gynecologic oncology* 147, 167-180.

Meisner, H.M., and Sorensen, L. (1966). Metaphase arrest of Chinese hamster cells with rotenone. *Exp Cell Res* 42, 291-295.

Mellish, K.J., Kelland, L.R., and Harrap, K.R. (1993). In vitro platinum drug chemosensitivity of human cervical squamous cell carcinoma cell lines with intrinsic and acquired resistance to cisplatin. *British journal of cancer* 68, 240-250.

Mello, J.A., Acharya, S., Fishel, R., and Essigmann, J.M. (1996). The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chemistry & biology* 3, 579-589.

Menendez, J.A., and Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature reviews. Cancer* 7, 763-777.

Menendez, J.A., Vellon, L., and Lupu, R. (2005). Targeting fatty acid synthase-driven lipid rafts: a novel strategy to overcome trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Medical hypotheses* 64, 997-1001.

Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C.M., Johnson, Z.R., Irvine, D.J., Guarente, L., et al. (2011). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481, 380-384.

Metzger, R., Leichman, C.G., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V., Lenz, H.J., Hayashi, K., Groschen, S., Salonga, D., Cohen, H., Laine, L., et al. (1998). ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 16, 309-316.

Michelakis, E.D., Webster, L., and Mackey, J.R. (2008). Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *British journal of cancer* 99, 989-994.

Michels, J., Vitale, I., Galluzzi, L., Adam, J., Olaussen, K.A., Kepp, O., Senovilla, L., Talhaoui, I., Guegan, J., Enot, D.P., et al. (2013). Cisplatin resistance associated with PARP hyperactivation. *Cancer research* 73, 2271-2280.

Migita, T., Narita, T., Nomura, K., Miyagi, E., Inazuka, F., Matsuura, M., Ushijima, M., Mashima, T., Seimiya, H., Satoh, Y., et al. (2008). ATP citrate lyase: activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *Cancer research* 68, 8547-8554.

Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular cell* 11, 577-590.

Milgraum, L.Z., Witters, L.A., Pasternack, G.R., and Kuhajda, F.P. (1997). Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 3, 2115-2120.

Miller, D.M., Thomas, S.D., Islam, A., Muench, D., and Sedoris, K. (2012). c-Myc and cancer metabolism. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 5546-5553.

More, S.S., Akil, O., Ianculescu, A.G., Geier, E.G., Lustig, L.R., and Giacomini, K.M. (2010). Role of the copper transporter, CTR1, in platinum-induced ototoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 9500-9509.

Moreadith, R.W., and Lehninger, A.L. (1984). The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. Role of mitochondrial NAD(P)+-dependent malic enzyme. *The Journal of biological chemistry* 259, 6215-6221.

Moreno-Smith, M., Halder, J.B., Meltzer, P.S., Gonda, T.A., Mangala, L.S., Rupaimoole, R., Lu, C., Nagaraja, A.S., Gharpure, K.M., Kang, Y., et al. (2013). ATP11B mediates platinum resistance in ovarian cancer. *The Journal of clinical investigation* 123, 2119-2130.

Mullen, A.R., Wheaton, W.W., Jin, E.S., Chen, P.H., Sullivan, L.B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W.M., Chandel, N.S., and DeBerardinis, R.J. (2011). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 481, 385-388.

Murakami, T., Nishiyama, T., Shirotani, T., Shinohara, Y., Kan, M., Ishii, K., Kanai, F., Nakazuru, S., and Ebina, Y. (1992). Identification of two enhancer elements in the gene encoding the type 1 glucose transporter from the mouse which are responsive to serum, growth factor, and oncogenes. *The Journal of biological chemistry* 267, 9300-9306.

Nakanishi, T., Sugawara, M., Huang, W., Martindale, R.G., Leibach, F.H., Ganapathy, M.E., Prasad, P.D., and Ganapathy, V. (2001). Structure, function, and tissue expression pattern of human SN2, a subtype of the amino acid transport system N. *Biochemical and biophysical research communications* 281, 1343-1348.

Nakano, A., Tsuji, D., Miki, H., Cui, Q., El Sayed, S.M., Ikegami, A., Oda, A., Amou, H., Nakamura, S., Harada, T., et al. (2011). Glycolysis inhibition inactivates ABC transporters to restore drug sensitivity in malignant cells. *PloS one* 6, e27222.

Nakayama, K., Kanzaki, A., Ogawa, K., Miyazaki, K., Neamati, N., and Takebayashi, Y. (2002). Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *International journal of cancer* 101, 488-495.

Naleskina, L.A., Todor, I.N., Nosko, M.M., Lukianova, N.Y., Pivnyuk, V.M., and Chekhun, V.F. (2013). Alteration in lipid composition of plasma membranes of sensitive and resistant Guerin carcinoma cells due to the action of free and liposomal form of cisplatin. *Experimental oncology* 35, 192-197.

Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M.M., Pithon-Curi, T.C., and Curi, R. (2003). Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell biochemistry and function* 21, 1-9.

Nguyen, A., Loo, J.M., Mital, R., Weinberg, E.M., Man, F.Y., Zeng, Z., Paty, P.B., Saltz, L., Janjigian, Y.Y., de Stanchina, E., et al. (2016). PKLR promotes colorectal cancer liver colonization through induction of glutathione synthesis. *The Journal of clinical investigation* *126*, 681-694.

Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* *136*, 521-534.

Nielsen, S.F., Nordestgaard, B.G., and Bojesen, S.E. (2012). Statin use and reduced cancer-related mortality. *The New England journal of medicine* *367*, 1792-1802.

Nikounezhad, N., Nakhjavani, M., and Shirazi, F.H. (2017). Cellular glutathione level does not predict ovarian cancer cells' resistance after initial or repeated exposure to cisplatin. *Journal of experimental therapeutics & oncology* *12*, 1-7.

Noch, E., and Khalili, K. (2012). Oncogenic viruses and tumor glucose metabolism: like kids in a candy store. *Molecular cancer therapeutics* *11*, 14-23.

Noguchi, T., Inoue, H., and Tanaka, T. (1986). The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *The Journal of biological chemistry* *261*, 13807-13812.

O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J.N., et al. (1997). Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer research* *57*, 4285-4300.

Olaussen, K.A., Dunant, A., Fouret, P., Brambilla, E., Andre, F., Haddad, V., Taranchon, E., Filipits, M., Pirker, R., Popper, H.H., et al. (2006). DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *The New England journal of medicine* *355*, 983-991.

Olver, I.N., Green, M., Millward, M.J., and Bishop, J.F. (1998). Phase II study of acivicin in patients with recurrent high grade astrocytoma. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* *5*, 46-48.

Pavlova, N.N., and Thompson, C.B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell metabolism* *23*, 27-47.

Pei, S., Minhajuddin, M., Callahan, K.P., Balys, M., Ashton, J.M., Neering, S.J., Lagadinou, E.D., Corbett, C., Ye, H., Liesveld, J.L., et al. (2013). Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells. *The Journal of biological chemistry* *288*, 33542-33558.

Peng, H.Q., Hogg, D., Malkin, D., Bailey, D., Gallie, B.L., Bulbul, M., Jewett, M., Buchanan, J., and Goss, P.E. (1993). Mutations of the p53 gene do not occur in testis cancer. *Cancer research* *53*, 3574-3578.

Pfau, S.J., and Amon, A. (2012). Chromosomal instability and aneuploidy in cancer: from yeast to man. *EMBO reports* *13*, 515-527.

Pietrocola, F., Pol, J., Vacchelli, E., Rao, S., Enot, D.P., Baracco, E.E., Levesque, S., Castoldi, F., Jacquemet, N., Yamazaki, T., et al. (2016). Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance. *Cancer cell* *30*, 147-160.

Pinheiro, C., Albergaria, A., Paredes, J., Sousa, B., Dufloth, R., Vieira, D., Schmitt, F., and Baltazar, F. (2010). Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma. *Histopathology* *56*, 860-867.

Polanski, R., Hodgkinson, C.L., Fusi, A., Nonaka, D., Priest, L., Kelly, P., Trapani, F., Bishop, P.W., White, A., Critchlow, S.E., et al. (2014). Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *20*, 926-937.

Possemato, R., Marks, K.M., Shaul, Y.D., Pacold, M.E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.K., Jang, H.G., Jha, A.K., et al. (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* *476*, 346-350.

Poster, D.S., Bruno, S., Penta, J., Neil, G.L., and McGovren, J.P. (1981). Acivicin. An antitumor antibiotic. *Cancer clinical trials* *4*, 327-330.

Qing, G., Li, B., Vu, A., Skuli, N., Walton, Z.E., Liu, X., Mayes, P.A., Wise, D.R., Thompson, C.B., Maris, J.M., et al. (2012). ATF4 regulates MYC-mediated neuroblastoma cell death upon glutamine deprivation. *Cancer cell* *22*, 631-644.

Qiu, S., Sun, L., Jin, Y., An, Q., Weng, C., and Zheng, J. (2017). Silencing of BAG3 promotes the sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin via inhibition of autophagy. *Oncology reports* *38*, 309-316.

Qu, X., Sheng, J., Shen, L., Su, J., Xu, Y., Xie, Q., Wu, Y., Zhang, X., and Sun, L. (2017). Autophagy inhibitor chloroquine increases sensitivity to cisplatin in QBC939 cholangiocarcinoma cells by mitochondrial ROS. *PloS one* *12*, e0173712.

Raffaghello, L., Lee, C., Safdie, F.M., Wei, M., Madia, F., Bianchi, G., and Longo, V.D. (2008). Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 8215-8220.

Ramachandran, S., Pan, C.Q., Zimmermann, S.C., Duvall, B., Tsukamoto, T., Low, B.C., and Sivaraman, J. (2016). Structural basis for exploring the allosteric inhibition of human kidney type glutaminase. *Oncotarget* *7*, 57943-57954.

Rathmell, J.C., Fox, C.J., Plas, D.R., Hammerman, P.S., Cinalli, R.M., and Thompson, C.B. (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Molecular and cellular biology* *23*, 7315-7328.

Rathmell, J.C., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2000). In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Molecular cell* *6*, 683-692.

Ray Chaudhuri, A., and Nussenzweig, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 18, 610-621.

Rebsamen, M., Pochini, L., Stasyk, T., de Araujo, M.E., Galluccio, M., Kandasamy, R.K., Snijder, B., Fauster, A., Rudashevskaya, E.L., Bruckner, M., et al. (2015). SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1. *Nature* 519, 477-481.

Reck, M., Popat, S., Reinmuth, N., De Ruysscher, D., Kerr, K.M., Peters, S., and Group, E.G.W. (2014). Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 25 Suppl 3, iii27-39.

Reitzer, L.J., Wice, B.M., and Kennell, D. (1979). Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *The Journal of biological chemistry* 254, 2669-2676.

Ren, J.H., He, W.S., Nong, L., Zhu, Q.Y., Hu, K., Zhang, R.G., Huang, L.L., Zhu, F., and Wu, G. (2010). Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 25, 75-80.

Reynolds, M.R., Lane, A.N., Robertson, B., Kemp, S., Liu, Y., Hill, B.G., Dean, D.C., and Clem, B.F. (2014). Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. *Oncogene* 33, 556-566.

Rivera, S., Azcon-Bieto, J., Lopez-Soriano, F.J., Miralpeix, M., and Argiles, J.M. (1988). Amino acid metabolism in tumour-bearing mice. *The Biochemical journal* 249, 443-449.

Roberts, E., Simonsen, D.G., Tanaka, K.K., and Tanaka, T. (1956). Free amino acids in growing and regressing ascites cell tumors: host resistance and chemical agents. *Cancer research* 16, 970-978.

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

Robitaille, A.M., Christen, S., Shimobayashi, M., Cornu, M., Fava, L.L., Moes, S., Prescianotto-Baschong, C., Sauer, U., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2013). Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis. *Science* 339, 1320-1323.

Rocha, C.R., Garcia, C.C., Vieira, D.B., Quinet, A., de Andrade-Lima, L.C., Munford, V., Belizario, J.E., and Menck, C.F. (2014). Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells in vitro and in vivo. *Cell death & disease* 5, e1505.

Rosell, R., Carcereny, E., Gervais, R., Vergnenegre, A., Massuti, B., Felip, E., Palmero, R., Garcia-Gomez, R., Pallares, C., Sanchez, J.M., et al. (2012). Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology* 13, 239-246.

Rosenberg, B., Vancamp, L., and Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* *205*, 698-699.

Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J.E., and Mansour, V.H. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* *222*, 385-386.

Rysman, E., Brusselmans, K., Scheys, K., Timmermans, L., Derua, R., Munck, S., Van Veldhoven, P.P., Waltregny, D., Daniels, V.W., Machiels, J., et al. (2010). De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer research* *70*, 8117-8126.

Sabatini, D.M. (2006). mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature reviews. Cancer* *6*, 729-734.

Sadowski, M.C., Pouwer, R.H., Gunter, J.H., Lubik, A.A., Quinn, R.J., and Nelson, C.C. (2014). The fatty acid synthase inhibitor triclosan: repurposing an anti-microbial agent for targeting prostate cancer. *Oncotarget* *5*, 9362-9381.

Safaei, R., Holzer, A.K., Katano, K., Samimi, G., and Howell, S.B. (2004). The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. *Journal of inorganic biochemistry* *98*, 1607-1613.

Safdie, F.M., Dorff, T., Quinn, D., Fontana, L., Wei, M., Lee, C., Cohen, P., and Longo, V.D. (2009). Fasting and cancer treatment in humans: A case series report. *Aging* *1*, 988-1007.

Sakamoto, M., Kondo, A., Kawasaki, K., Goto, T., Sakamoto, H., Miyake, K., Koyamatsu, Y., Akiya, T., Iwabuchi, H., Muroya, T., et al. (2001). Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray. *Human cell* *14*, 305-315.

Samimi, G., Safaei, R., Katano, K., Holzer, A.K., Rochdi, M., Tomioka, M., Goodman, M., and Howell, S.B. (2004). Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *10*, 4661-4669.

Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* *320*, 1496-1501.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Gaddameedhi, S., Selby, C.P., Ye, R., Chiou, Y.Y., Kemp, M.G., Hu, J., Lee, J.H., and Ozturk, N. (2015). Circadian clock, cancer, and chemotherapy. *Biochemistry* *54*, 110-123.

Sasaki, T., and Janne, P.A. (2011). New strategies for treatment of ALK-rearranged non-small cell lung cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *17*, 7213-7218.

Sauer, L.A., Stayman, J.W., 3rd, and Dauchy, R.T. (1982). Amino acid, glucose, and lactic acid utilization in vivo by rat tumors. *Cancer research* *42*, 4090-4097.

- Sawant, A., Kothandapani, A., Zhitkovich, A., Sobol, R.W., and Patrick, S.M. (2015). Role of mismatch repair proteins in the processing of cisplatin interstrand cross-links. *DNA repair* 35, 126-136.
- Schaefer, N.G., Geschwind, J.F., Engles, J., Buchanan, J.W., and Wahl, R.L. (2012). Systemic administration of 3-bromopyruvate in treating disseminated aggressive lymphoma. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 159, 51-57.
- Sellers, K., Fox, M.P., Bousamra, M., 2nd, Slone, S.P., Higashi, R.M., Miller, D.M., Wang, Y., Yan, J., Yuneva, M.O., Deshpande, R., et al. (2015). Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation. *The Journal of clinical investigation* 125, 687-698.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 3, 721-732.
- Sharaf el dein, O., Gallerne, C., Brenner, C., and Lemaire, C. (2012). Increased expression of VDAC1 sensitizes carcinoma cells to apoptosis induced by DNA cross-linking agents. *Biochemical pharmacology* 83, 1172-1182.
- Shiroki, T., Yokoyama, M., Tanuma, N., Maejima, R., Tamai, K., Yamaguchi, K., Oikawa, T., Noguchi, T., Miura, K., Fujiya, T., et al. (2017). Enhanced expression of the M2 isoform of pyruvate kinase is involved in gastric cancer development by regulating cancer-specific metabolism. *Cancer science* 108, 931-940.
- Sinani, D., Adle, D.J., Kim, H., and Lee, J. (2007). Distinct mechanisms for Ctrl-mediated copper and cisplatin transport. *The Journal of biological chemistry* 282, 26775-26785.
- Smith, A., Murphy, L., Sharp, L., O'Connor, D., Gallagher, W.M., Bennett, K., and Barron, T.I. (2016). De novo post-diagnosis statin use, breast cancer-specific and overall mortality in women with stage I-III breast cancer. *British journal of cancer* 115, 592-598.
- Smith, J., Tho, L.M., Xu, N., and Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research* 108, 73-112.
- Snell, K. (1984). Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Advances in enzyme regulation* 22, 325-400.
- Som, P., Atkins, H.L., Bandopadhyay, D., Fowler, J.S., MacGregor, R.R., Matsui, K., Oster, Z.H., Sacker, D.F., Shiue, C.Y., Turner, H., et al. (1980). A fluorinated glucose analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18): nontoxic tracer for rapid tumor detection. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 21, 670-675.
- Son, J., Lyssiotis, C.A., Ying, H., Wang, X., Hua, S., Ligorio, M., Perera, R.M., Ferrone, C.R., Mullarky, E., Shyh-Chang, N., et al. (2013). Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature* 496, 101-105.
- Srivastava, R.C., Farookh, A., Ahmad, N., Misra, M., Hasan, S.K., and Husain, M.M. (1996). Evidence for the involvement of nitric oxide in cisplatin-induced toxicity in rats. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 9, 139-142.
- Stalnecker, C.A., Ulrich, S.M., Li, Y., Ramachandran, S., McBrayer, M.K., DeBerardinis, R.J., Cerione, R.A., and Erickson, J.W. (2015). Mechanism by which a recently discovered allosteric

inhibitor blocks glutamine metabolism in transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, 394-399.

Stolzing, A., and Grune, T. (2004). Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *18*, 743-745.

Stumvoll, M., Perriello, G., Meyer, C., and Gerich, J. (1999). Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney international* *55*, 778-792.

Su, Z., Li, G., Liu, C., Ren, S., Deng, T., Zhang, S., Tian, Y., Liu, Y., and Qiu, Y. (2017). Autophagy inhibition impairs the epithelial-mesenchymal transition and enhances cisplatin sensitivity in nasopharyngeal carcinoma. *Oncology letters* *13*, 4147-4154.

Sugimoto, K., Suzuki, H.I., Fujimura, T., Ono, A., Kaga, N., Isobe, Y., Sasaki, M., Taka, H., Miyazono, K., and Komatsu, N. (2015). A clinically attainable dose of L-asparaginase targets glutamine addiction in lymphoid cell lines. *Cancer science* *106*, 1534-1543.

Sullivan, E.J., Kurtoglu, M., Brenneman, R., Liu, H., and Lampidis, T.J. (2014). Targeting cisplatin-resistant human tumor cells with metabolic inhibitors. *Cancer chemotherapy and pharmacology* *73*, 417-427.

Sun, R.C., and Denko, N.C. (2014). Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth. *Cell metabolism* *19*, 285-292.

Tajeddine, N., Galluzzi, L., Kepp, O., Hangen, E., Morselli, E., Senovilla, L., Araujo, N., Pinna, G., Larochette, N., Zamzami, N., et al. (2008). Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death. *Oncogene* *27*, 4221-4232.

Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., and Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & development* *25*, 795-800.

Thangavelu, K., Pan, C.Q., Karlberg, T., Balaji, G., Uttamchandani, M., Suresh, V., Schuler, H., Low, B.C., and Sivaraman, J. (2012). Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 7705-7710.

Thent, Z.C., Zaidun, N.H., Azmi, M.F., Senin, M.I., Haslan, H., and Salehuddin, R. (2017). Is Metformin a Therapeutic Paradigm for Colorectal Cancer: Insight into the Molecular Pathway? *Current drug targets* *18*, 734-750.

Thompson, C.B. (2011). Rethinking the regulation of cellular metabolism. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* *76*, 23-29.

Tieche, C.C., Peng, R.W., Dorn, P., Froment, L., Schmid, R.A., and Marti, T.M. (2016). Prolonged pemetrexed pretreatment augments persistence of cisplatin-induced DNA damage and eliminates resistant lung cancer stem-like cells associated with EMT. *BMC cancer* *16*, 125.

Timerbaev, A.R., Hartinger, C.G., Aleksenko, S.S., and Keppler, B.K. (2006). Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. *Chemical reviews* *106*, 2224-2248.

Ting, S., Mairinger, F.D., Hager, T., Welter, S., Eberhardt, W.E., Wohlschlaeger, J., Schmid, K.W., and Christoph, D.C. (2013). ERCC1, MLH1, MSH2, MSH6, and betaIII-tubulin: resistance proteins associated with response and outcome to platinum-based chemotherapy in malignant pleural mesothelioma. *Clinical lung cancer* *14*, 558-567 e553.

Tirado-Velez, J.M., Jourmady, I., Saez-Benito, A., Cozar-Castellano, I., and Perdomo, G. (2012). Inhibition of fatty acid metabolism reduces human myeloma cells proliferation. *PloS one* *7*, e46484.

Tiseo, M., Bordi, P., Bortesi, B., Boni, L., Boni, C., Baldini, E., Grossi, F., Recchia, F., Zanelli, F., Fontanini, G., et al. (2013). ERCC1/BRCA1 expression and gene polymorphisms as prognostic and predictive factors in advanced NSCLC treated with or without cisplatin. *British journal of cancer* *108*, 1695-1703.

Todor, I.N., Lukyanova, N.Y., and Chekhun, V.F. (2012). The lipid content of cisplatin- and doxorubicin-resistant MCF-7 human breast cancer cells. *Experimental oncology* *34*, 97-100.

Tong, J., Xie, G., He, J., Li, J., Pan, F., and Liang, H. (2011). Synergistic antitumor effect of dichloroacetate in combination with 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology* *2011*, 740564.

Tonigold, M., Rossmann, A., Meinold, M., Bette, M., Marken, M., Henkenius, K., Bretz, A.C., Giel, G., Cai, C., Rodepeter, F.R., et al. (2014). A cisplatin-resistant head and neck cancer cell line with cytoplasmic p53(mut) exhibits ATP-binding cassette transporter upregulation and high glutathione levels. *Journal of cancer research and clinical oncology* *140*, 1689-1704.

Torre, L.A., Siegel, R.L., Ward, E.M., and Jemal, A. (2014). International variation in lung cancer mortality rates and trends among women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* *23*, 1025-1036.

Torre, L.A., Siegel, R.L., Ward, E.M., and Jemal, A. (2016). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* *25*, 16-27.

Torres-Duran, M., Ruano-Ravina, A., Parente-Lamelas, I., Leiro-Fernandez, V., Abal-Arca, J., Montero-Martinez, C., Pena-Alvarez, C., Castro-Anon, O., Golpe-Gomez, A., Martinez, C., et al. (2015). Residential radon and lung cancer characteristics in never smokers. *International journal of radiation biology* *91*, 605-610.

Travis, W.D., Brambilla, E., and Riely, G.J. (2013). New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *31*, 992-1001.

Tuzel, E., Yorukoglu, K., Ozkara, E., and Kirkali, Z. (2015). Association of metallothionein expression and clinical response to cisplatin based chemotherapy in testicular germ cell tumors. Central European journal of urology 68, 45-50.

Ueda, S., Shirabe, K., Morita, K., Umeda, K., Kayashima, H., Uchiyama, H., Soejima, Y., Taketomi, A., and Maehara, Y. (2011). Evaluation of ERCC1 expression for cisplatin sensitivity in human hepatocellular carcinoma. Annals of surgical oncology 18, 1204-1211.

Ulker, M., Duman, B.B., Sahin, B., and Gumurdulu, D. (2015). ERCC1 and RRM1 as a predictive parameter for non-small cell lung, ovarian or pancreas cancer treated with cisplatin and/or gemcitabine. Contemporary oncology 19, 207-213.

Vaezi, A., Wang, X., Buch, S., Gooding, W., Wang, L., Seethala, R.R., Weaver, D.T., D'Andrea, A.D., Argiris, A., Romkes, M., et al. (2011). XPF expression correlates with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 17, 5513-5522.

Vaisman, A., Varchenko, M., Umar, A., Kunkel, T.A., Risinger, J.I., Barrett, J.C., Hamilton, T.C., and Chaney, S.G. (1998). The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. Cancer research 58, 3579-3585.

van den Berghe, P.V., Folmer, D.E., Malingre, H.E., van Beurden, E., Klomp, A.E., van de Sluis, B., Merkx, M., Berger, R., and Klomp, L.W. (2007). Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake. The Biochemical journal 407, 49-59.

van den Heuvel, A.P., Jing, J., Wooster, R.F., and Bachman, K.E. (2012). Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth. Cancer biology & therapy 13, 1185-1194.

van Geldermalsen, M., Wang, Q., Nagarajah, R., Marshall, A.D., Thoeng, A., Gao, D., Ritchie, W., Feng, Y., Bailey, C.G., Deng, N., et al. (2016). ASCT2/SLC1A5 controls glutamine uptake and tumour growth in triple-negative basal-like breast cancer. Oncogene 35, 3201-3208.

van Meerbeeck, J.P., Gaafar, R., Manegold, C., Van Klaveren, R.J., Van Marck, E.A., Vincent, M., Legrand, C., Bottomley, A., Debruyne, C., Giaccone, G., et al. (2005). Randomized phase III study of cisplatin with or without raltitrexed in patients with malignant pleural mesothelioma: an intergroup study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group and the National Cancer Institute of Canada. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 23, 6881-6889.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science 324, 1029-1033.

Vansteenkiste, J., De Ruysscher, D., Eberhardt, W.E., Lim, E., Senan, S., Felip, E., Peters, S., and Group, E.G.W. (2013). Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology 24 Suppl 6, vi89-98.

Vaseva, A.V., Marchenko, N.D., Ji, K., Tsirka, S.E., Holzmann, S., and Moll, U.M. (2012). p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* 149, 1536-1548.

Venneti, S., Dunphy, M.P., Zhang, H., Pitter, K.L., Zanzonico, P., Campos, C., Carlin, S.D., La Rocca, G., Lyashchenko, S., Ploessl, K., et al. (2015). Glutamine-based PET imaging facilitates enhanced metabolic evaluation of gliomas *in vivo*. *Science translational medicine* 7, 274ra217.

Vie, N., Copois, V., Bascoul-Mollevi, C., Denis, V., Bec, N., Robert, B., Fraslon, C., Conseiller, E., Molina, F., Larroque, C., et al. (2008). Overexpression of phosphoserine aminotransferase PSAT1 stimulates cell growth and increases chemoresistance of colon cancer cells. *Molecular cancer* 7, 14.

Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., and Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science* 122, 253-270.

Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., and Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, 385-392.

Vousden, K.H., and Lane, D.P. (2007). p53 in health and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 275-283.

Wang, C., Guo, K., Gao, D., Kang, X., Jiang, K., Li, Y., Sun, L., Zhang, S., Sun, C., Liu, X., et al. (2011). Identification of transaldolase as a novel serum biomarker for hepatocellular carcinoma metastasis using xenografted mouse model and clinic samples. *Cancer letters* 313, 154-166.

Wang, J.B., Erickson, J.W., Fuji, R., Ramachandran, S., Gao, P., Dinavahi, R., Wilson, K.F., Ambrosio, A.L., Dias, S.M., Dang, C.V., et al. (2010). Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer cell* 18, 207-219.

Wang, Q., Hardie, R.A., Hoy, A.J., van Geldermalsen, M., Gao, D., Fazli, L., Sadowski, M.C., Balaban, S., Schreuder, M., Nagarajah, R., et al. (2015a). Targeting ASCT2-mediated glutamine uptake blocks prostate cancer growth and tumour development. *The Journal of pathology* 236, 278-289.

Wang, S.T., Ho, H.J., Lin, J.T., Shieh, J.J., and Wu, C.Y. (2017). Simvastatin-induced cell cycle arrest through inhibition of STAT3/SKP2 axis and activation of AMPK to promote p27 and p21 accumulation in hepatocellular carcinoma cells. *Cell death & disease* 8, e2626.

Wang, W., Sheng, W., Yu, C., Cao, J., Zhou, J., Wu, J., Zhang, H., and Zhang, S. (2015b). REV3L modulates cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer H1299 cells. *Oncology reports* 34, 1460-1468.

Wang, X., Jiang, P., Wang, P., Yang, C.S., Wang, X., and Feng, Q. (2015c). EGCG Enhances Cisplatin Sensitivity by Regulating Expression of the Copper and Cisplatin Influx Transporter CTR1 in Ovary Cancer. *PloS one* 10, e0125402.

Wangpaichitr, M., Wu, C., Li, Y.Y., Nguyen, D.J.M., Kandemir, H., Shah, S., Chen, S., Feun, L.G., Prince, J.S., Kuo, M.T., et al. (2017). Exploiting ROS and metabolic differences to kill cisplatin resistant lung cancer. *Oncotarget* 8, 49275-49292.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* *123*, 309-314.

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

Wei, C., Bajpai, R., Sharma, H., Heitmeier, M., Jain, A.D., Matulis, S.M., Nooka, A.K., Mishra, R.K., Hruz, P.W., Schiltz, G.E., et al. (2017). Development of GLUT4-selective antagonists for multiple myeloma therapy. *European journal of medicinal chemistry* *139*, 573-586.

Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W.W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G.M., Budinger, G.R., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 8788-8793.

Wheaton, W.W., Weinberg, S.E., Hamanaka, R.B., Soberanes, S., Sullivan, L.B., Anso, E., Glasauer, A., Dufour, E., Mutlu, G.M., Budigner, G.S., et al. (2014). Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *eLife* *3*, e02242.

Wieman, H.L., Wofford, J.A., and Rathmell, J.C. (2007). Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Molecular biology of the cell* *18*, 1437-1446.

Wilson, K.F., Erickson, J.W., Antonyak, M.A., and Cerione, R.A. (2013). Rho GTPases and their roles in cancer metabolism. *Trends in molecular medicine* *19*, 74-82.

Wiltshaw, E., and Kroner, T. (1976). Phase II study of cis-dichlorodiammineplatinum(II) (NSC-119875) in advanced adenocarcinoma of the ovary. *Cancer treatment reports* *60*, 55-60.

Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., et al. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 18782-18787.

Wise, D.R., and Thompson, C.B. (2010). Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in biochemical sciences* *35*, 427-433.

Wise, D.R., Ward, P.S., Shay, J.E., Cross, J.R., Gruber, J.J., Sachdeva, U.M., Platt, J.M., DeMatteo, R.G., Simon, M.C., and Thompson, C.B. (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 19611-19616.

Wolf, A., Agnihotri, S., Micallef, J., Mukherjee, J., Sabha, N., Cairns, R., Hawkins, C., and Guha, A. (2011). Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *The Journal of experimental medicine* *208*, 313-326.

Wong, C.M., Tsang, H., Lai, H.K., Thomas, G.N., Lam, K.B., Chan, K.P., Zheng, Q., Ayres, J.G., Lee, S.Y., Lam, T.H., et al. (2016). Cancer Mortality Risks from Long-term Exposure to Ambient Fine Particle. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the*

American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 25, 839-845.

Wysham, W.Z., Roque, D.R., Han, J., Zhang, L., Guo, H., Gehrig, P.A., Zhou, C., and Bae-Jump, V.L. (2016). Effects of Fatty Acid Synthase Inhibition by Orlistat on Proliferation of Endometrial Cancer Cell Lines. *Targeted oncology* 11, 763-769.

Xian, S.L., Cao, W., Zhang, X.D., and Lu, Y.F. (2016). 3-Bromopyruvate inhibits human gastric cancer tumor growth in nude mice via the inhibition of glycolysis. *Oncology letters* 12, 5377.

Xiang, Y., Stine, Z.E., Xia, J., Lu, Y., O'Connor, R.S., Altman, B.J., Hsieh, A.L., Gouw, A.M., Thomas, A.G., Gao, P., et al. (2015). Targeted inhibition of tumor-specific glutaminase diminishes cell-autonomous tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation* 125, 2293-2306. Xiao, X., Liu, H., and Li, X. (2017). Orlistat treatment induces apoptosis and arrests cell cycle in HSC-3 oral cancer cells. *Microbial pathogenesis*.

Xu, P., Oosterveer, M.H., Stein, S., Demagny, H., Ryu, D., Moullan, N., Wang, X., Can, E., Zamboni, N., Comment, A., et al. (2016). LRH-1-dependent programming of mitochondrial glutamine processing drives liver cancer. *Genes & development* 30, 1255-1260.

Xu, X., Zur Hausen, A., Coy, J.F., and Lochelt, M. (2009). Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells. *International journal of cancer* 124, 1330-1337.

Xuelei, M., Jingwen, H., Wei, D., Hongyu, Z., Jing, Z., Changle, S., and Lei, L. (2015). ERCC1 plays an important role in predicting survival outcomes and treatment response for patients with HNSCC: a meta-analysis. *Oral oncology* 51, 483-492.

Yamasaki, M., Makino, T., Masuzawa, T., Kurokawa, Y., Miyata, H., Takiguchi, S., Nakajima, K., Fujiwara, Y., Matsuura, N., Mori, M., et al. (2011). Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in chemoresistance and clinical outcome in oesophageal squamous cell carcinoma. *British journal of cancer* 104, 707-713.

Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S.H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., et al. (2001). Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochimica et biophysica acta* 1514, 291-302.

Yang, C.S., Matsuura, K., Huang, N.J., Robeson, A.C., Huang, B., Zhang, L., and Kornbluth, S. (2015a). Fatty acid synthase inhibition engages a novel caspase-2 regulatory mechanism to induce ovarian cancer cell death. *Oncogene* 34, 3264-3272.

Yang, L., Shi, T., Liu, F., Ren, C., Wang, Z., Li, Y., Tu, X., Yang, G., and Cheng, X. (2015b). REV3L, a promising target in regulating the chemosensitivity of cervical cancer cells. *PloS one* 10, e0120334.

Ye, J., Mancuso, A., Tong, X., Ward, P.S., Fan, J., Rabinowitz, J.D., and Thompson, C.B. (2012). Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6904-6909.

Ye, J., Palm, W., Peng, M., King, B., Lindsten, T., Li, M.O., Koumenis, C., and Thompson, C.B. (2015). GCN2 sustains mTORC1 suppression upon amino acid deprivation by inducing Sestrin2. *Genes & development* 29, 2331-2336.

Yen, K., Travins, J., Wang, F., David, M.D., Artin, E., Straley, K., Padyana, A., Gross, S., DeLaBarre, B., Tobin, E., et al. (2017). AG-221, a First-in-Class Therapy Targeting Acute Myeloid Leukemia Harboring Oncogenic IDH2 Mutations. *Cancer discovery* 7, 478-493.

Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L., et al. (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 149, 656-670.

Yoshida, H., Teramae, M., Yamauchi, M., Fukuda, T., Yasui, T., Sumi, T., Honda, K., and Ishiko, O. (2013). Association of copper transporter expression with platinum resistance in epithelial ovarian cancer. *Anticancer research* 33, 1409-1414.

Yousef, M., and Tsiani, E. (2017). Metformin in Lung Cancer: Review of in Vitro and in Vivo Animal Studies. *Cancers* 9.

Yu, H., Su, J., Xu, Y., Kang, J., Li, H., Zhang, L., Yi, H., Xiang, X., Liu, F., and Sun, L. (2011). p62/SQSTM1 involved in cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by clearing ubiquitinated proteins. *European journal of cancer* 47, 1585-1594.

Yu, J., Dabholkar, M., Bennett, W., Welsh, J., Mu, C., Bostickbruton, F., and Reed, E. (1996). Platinum-sensitive and platinum-resistant ovarian cancer tissues show differences in the relationships between mRNA levels of p53, ERCC1 and XPA. *International journal of oncology* 8, 313-317.

Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R., and Lazebnik, Y. (2007). Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *The Journal of cell biology* 178, 93-105.

Yuwen, D., Mi, S., Ma, Y., Guo, W., Xu, Q., Shen, Y., and Shu, Y. (2017). Andrographolide enhances cisplatin-mediated anticancer effects in lung cancer cells through blockade of autophagy. *Anti-cancer drugs* 28, 967-976.

Zhang, J., Pavlova, N.N., and Thompson, C.B. (2017). Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *EMBO J* 36, 1302-1315.

Zhang, Q., Shi, J., Yuan, F., Wang, H., Fu, W., Pan, J., Huang, Y., Yu, J., Yang, J., and Chen, Z. (2016a). Higher expression of XPF is a critical factor in intrinsic chemotherapy resistance of human renal cell carcinoma. *International journal of cancer* 139, 2827-2837.

Zhang, W., Zhou, H., Yu, Y., Li, J., Li, H., Jiang, D., Chen, Z., Yang, D., Xu, Z., and Yu, Z. (2016b). Combination of gambogic acid with cisplatin enhances the antitumor effects on cisplatin-resistant lung cancer cells by downregulating MRP2 and LRP expression. *OncoTargets and therapy* 9, 3359-3368.

Zhao, Y., Liu, H., Liu, Z., Ding, Y., Ledoux, S.P., Wilson, G.L., Voellmy, R., Lin, Y., Lin, W., Nahta, R., et al. (2011). Overcoming trastuzumab resistance in breast cancer by targeting dysregulated glucose metabolism. *Cancer research* 71, 4585-4597.

Zhao, Y., Wang, L., and Pan, J. (2015). The role of L-type amino acid transporter 1 in human tumors. *Intractable & rare diseases research* 4, 165-169.

Zheng, W., Ren, H., Ke, X., Xue, M., Zhang, Y., Xie, Y., Lin, N., Tu, M., Liu, W., Ping, L., et al. (2017). PEG-asparaginase in BFM-90 regimen improves outcomes in adults with newly diagnosed lymphoblastic lymphoma. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu* 29, 66-74.

Zhu, Q., Li, H., Liu, Y., and Jiang, L. (2017a). Knockdown of CFTR enhances sensitivity of prostate cancer cells to cisplatin via inhibition of autophagy. *Neoplasma* 64, 709-717.

Zhu, S., Shanbhag, V., Wang, Y., Lee, J., and Petris, M. (2017b). A Role for The ATP7A Copper Transporter in Tumorigenesis and Cisplatin Resistance. *Journal of Cancer* 8, 1952-1958.

Zidovetzki, R., and Levitan, I. (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et biophysica acta* 1768, 1311-1324.

Zwenger, A.O., Grosman, G., Iturbe, J., Leone, J., Vallejo, C.T., Leone, J.P., Verdera, P.P., Perez, J.E., and Leone, B.A. (2015). Expression of ERCC1 and TUBB3 in locally advanced cervical squamous cell cancer and its correlation with different therapeutic regimens. *The International journal of biological markers* 30, e301-314.

Titre : Les vulnérabilités métaboliques des cancers résistants au cisplatine**Mots clés :** antimétabolites, chimiothérapie, glutamine, métabolisme cellulaire, nucléotides

Résumé : Le cisplatine est l'agent chimiothérapeutique le plus largement utilisé pour le traitement de la majorité des tumeurs solides, et la résistance des cellules néoplasiques à ce composé cytotoxique pose un problème majeur en oncologie clinique. Ici, nous avons exploré les vulnérabilités métaboliques potentielles de lignées cellulaires du cancer du poumon non à petites cellules résistantes au cisplatine. Il s'est avéré que les clones résistants au cisplatine (Cis-R) étaient plus sensibles à la mort induite par la privation nutritionnelle *in vitro* et *in vivo* en comparaison à leurs contrôles parentaux sensibles au cisplatine (Cis-S). La susceptibilité des cellules Cis-R à la privation nutritionnelle pourrait s'expliquer par une dépendance particulièrement forte vis-à-vis de la glutamine. La déplétion en glutamine était suffisante pour restaurer la sensibilité au cisplatine des clones initialement résistants, et la supplémentation en glutamine a permis le sauvetage des clones Cis-R de la mort induite par la privation nutritionnelle. Les analyses du métabolome par spectrométrie de masse et les interventions spécifiques sur le métabolisme de la glutamine ont révélé que, dans les cellules Cis-R, la glutamine est surtout nécessaire pour la biosynthèse des nucléotides plutôt que pour les réactions anaplerotiques, bioénergétiques ou redox. En conséquence, les cancers Cis-R sont devenus extrêmement sensibles au traitement par des antimétabolites ciblant le métabolisme des nucléosides.

Title : Metabolic vulnerability of cisplatin-resistant cancers**Keywords :** antimetabolites, chemotherapy, glutamine, cell metabolism, nucleotides

Abstract : Cisplatin is the most widely used chemotherapeutic agent, and resistance of neoplastic cells against this cytotoxicant pose a major problem in clinical oncology. Here, we explored potential metabolic vulnerabilities of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer and ovarian cancer cell lines. Cisplatin resistant clones were more sensitive to killing by nutrient deprivation *in vitro* and *in vivo* than their parental cisplatin-sensitive controls. The susceptibility of cisplatin-resistant cells to starvation could be explained by a particularly strong dependence on glutamine. Glutamine depletion was sufficient to restore cisplatin responses of initially cisplatin-resistant clones, and glutamine supplementation rescued cisplatin resistant clones from starvation-induced death. Mass spectrometric metabolomics and specific interventions on glutamine metabolism revealed that, in cisplatin-resistant cells, glutamine is mostly required for nucleotide biosynthesis rather than for anaplerotic, bioenergetic or redox reactions. As a result, cisplatin-resistant cancers became exquisitely sensitive to treatment with antimetabolites that target nucleoside metabolism.

