

Nouvelle thérapie anticancéreuse bloquant l'énergie des cellules cancéreuses par du 3-Bromopyruvate ou du citrate : résultats expérimentaux dans le mésothéliome

New antineoplastic treatment with cancer cells anti-energy molecules: 3-Bromopyruvate or citrate - Experimental results in mesothelioma

X-D Zhang [2, 3], E Varin (b), H Lincet [2], S Allouche [4], M Paciencia [5], A Coquerel [6], L Poulain [2], P Gauduchon, P Icard [1, 2].

1. Service de chirurgie thoracique, CHU de Caen.

2. Groupe régional d'études contre le cancer, GRECAN, Caen.

3. Department of Gastrointestinal and Glands Surgery, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi, Chine.

4. Service de biochimie, CHU de Caen.

5. Service d'anatomopathologie, CHU de Caen.

6. Service de pharmacologie clinique, CHU de Caen.

Mots clés

- ◆ Glycolyse
- ◆ Effet Warburg
- ◆ Énergie
- ◆ Apoptose
- ◆ Nécrose
- ◆ Cancer
- ◆ Chimiothérapie

Résumé

Depuis plusieurs années, nous tentons de mettre à profit le métabolisme particulier de la cellule cancéreuse, à savoir sa consommation accrue de glucose avec production d'acide lactique même en présence d'oxygène, phénomène connue sous le nom d'« effet Warburg » (1, 2), pour inhiber la croissance de cellules tumorales, en particulier de mésothéliome pleural malin (MPM) humain. Nous avons ainsi montré : 1/ que la croissance de 12 lignées de divers cancers humains était arrêtée ou ralentie par du 2-deoxyglucose (2-DG), un inhibiteur des premières étapes de la glycolyse, avec une apoptose importante observée dans certaines lignées (3) ; 2/ que la survie de souris nude porteuses de mésothéliome humain dans leur péritoine était très significativement allongée ($p < 0,0001$) avec près de 20 % de réponses complètes, lorsqu'elles étaient traitées par deux séries de quatre injections intra-péritonéales de 3-Bromopyruvate (3-BrpA) (4), un inhibiteur de l'hexokinase et des réactions où intervient le pyruvate, ou par deux séries de deux injections de citrate, un inhibiteur du cycle de Krebs et de la phosphofructokinase (PFK), enzyme clé régulateur de la glycolyse, véritable jauge d'énergie dans la cellule ; 3/ que l'association de l'un de ces anti-énergétiques avec du cisplatine, inactif en lui-même sur nos cellules testées, les rendait sensibles au cisplatine, à la fois *in vivo* (4) et *in vitro* (5), probablement en privant la cellule de l'ATP et du NAD⁺ nécessaires à la réparation des lésions ADN induites par la chimiothérapie. Le 3-BrpA et le citrate ont également pu détruire, par un mécanisme de nécrose, les cellules les plus chimio-résistantes. Le citrate a également entraîné dans diverses lignées types une diminution de l'expression de la protéine Mcl-1, un des principaux verrous de l'apoptose, impliqué dans la chimiorésistance des cancers, en particulier du mésothéliome comme nous l'avons montré (6). Aucune toxicité chronique n'a été observée chez des souris pendant plusieurs semaines des injections intra-abdominales de citrate (dose of 500 mg/kg). La dose létale 50 % (DL50) était de 4 g/kg chez la souris, la survie étant cependant obtenue si les animaux recevaient une injection concomitante de gluconate de calcium. Le citrate devrait être testé chez l'homme en association avec le cisplatine, particulièrement chez les patients souffrant d'une carcinose.

Keywords

- ◆ Glycolysis
- ◆ Warburg effect
- ◆ Apoptosis
- ◆ Necrosis
- ◆ Cancer
- ◆ Chemotherapy

Abstract

Since many years we tried to use the special metabolism of most cancer cells, namely an increased consumption of glucose with lactic acid production even in the presence of oxygen (a phenomenon known as "Warburg effect"(1-2)) to inhibit growth of tumor cells, especially of human malignant pleural mesothelioma. We have shown: 1/ that the growth of 12 various human cancer lines was stopped or slowed down by the 2-deoxyglucose (2-DG), an inhibitor of the first steps of glycolysis, with significant apoptosis observed in some strains (3); 2/ that the survival of nude mice bearing human mesothelioma cells in their peritoneum was very significantly lengthened ($p < 0.0001$) with almost 20% of complete response, when animals were treated by two series of four peritoneal injections of 3-bromopyruvate (3-BrpA) (4), an inhibitor of hexokinase and of reactions that involve

Correspondance :

Pr Philippe Icard, Service de chirurgie thoracique, CHU Hôpital Côte de Nacre, Av. de la Côte de Nacre, 14033 Caen Cedex 9.
Email : icard-p@chu-caen.fr

pyruvate; similar results were observed with two sets of two injections of citrate, an inhibitor of the Krebs cycle and of phosphofructokinase (PFK), the key enzyme regulating glycolysis; 3/ that the association of one of these anti-energy molecules with cisplatin, which was inactive by itself in our cells tested, rendered sensitive these cells to cisplatin, both in vivo (4) and in vitro (5), presumably by depriving the cells in ATP and NAD^+ , which are needed for the repair of DNA damage induced by chemotherapy. 3-BrpA and citrate were also able to destroy by a mechanism of cell necrosis, our most chemo-resistant cells. Furthermore, we observed on different cell lines that citrate decreased the expression of Mcl-1, one of the main anti-apoptotic protein, involved in chemoresistance of cancer, particularly of mesothelioma, as we have shown (6). None toxicity was observed in mice when citrate was chronically administered in the peritoneum of mice at a dose of 500 mg/kg. The 50% lethal dose (LD50) of citrate are 4 g/kg in mice. However animals survived when calcium gluconate was given with citrate. The association citrate and cisplatin should be tested in human, particularly in patients suffering carcinomatosis with poor survival.

Introduction

L'effet Warburg et la reprogrammation du métabolisme de la cellule cancéreuse (fig. 1 et 2).

La cellule cancéreuse est avide de glucose. Elle consomme 10 à 15 fois plus de glucose qu'une cellule normale, glucose dont la transformation aboutit à la formation d'acide lactique dans le cytoplasme, et non pas à la production de CO_2 et H_2O par la mitochondrie. Ce phénomène qui se produit même en présence d'oxygène a été observé par Otto Warburg dans les années 1930 (1), celui-ci l'ayant interprété en 1956 comme un défaut de la respiration mitochondriale, à l'origine même du cancer (2). Le rendement énergétique de la dégradation du glucose en acide lactique est faible, 2 ATP étant produits, soit dix neuf fois moins que celui de la dégradation du glucose en CO_2 et H_2O , qui s'accompagne de la production de 38 ATP. Normalement, cette production d'ATP se fait essentiellement au niveau de la phosphorylation oxydative mitochondriale, qui se déroule dans la membrane interne des mitochondries. Les électrons générés par les réactions d'oxydoréduction de la glycolyse et du cycle de Krebs sont transportés par les cofacteurs réduits (NADH, H^+ et FADH_2), jusqu'à la membrane in-

terne, où se produit la respiration mitochondriale de l' O_2 , celle-ci étant couplée à la synthèse de l'ATP. La chaîne respiratoire est ainsi composée de cinq complexes : les complexes I-IV assurent le transfert d'électrons (en partenariat avec deux transporteurs mobiles d'électrons, le coenzyme Q ou ubiquinol et le cytochrome c), et l'énergie libérée lors de ces transferts d'électrons sert à créer un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne : c'est la force proton-motrice qui permet la synthèse d'ATP lorsque les protons reviennent de l'espace inter-membranaire via le complexe V ou ATP synthase (7, 8). Selon les besoins énergétiques de la cellule, ces complexes s'associeraient en super-complexes, permettant un transfert plus rapide et plus efficace des électrons dans la chaîne respiratoire, ces super-complexes étant stabilisés par la cardiolipine, phospholipide le plus abondant de la membrane interne. L'avidité des tumeurs cancéreuses pour le glucose a été confirmée par les études PET scan utilisées pour détecter les métastases, tandis que la diminution de la fixation du traceur (le 2-deoxy-F-D-glucose) est de plus en plus souvent considérée comme un bon signe de l'efficacité d'une chimiothérapie (9, 10), les cellules les plus glycolytiques étant même considérées comme les plus agressives et/ou les plus prolifératives (11, 12). L'acide lactique acidifie le microenvironnement des cellules cancéreuses, ce qui déclenche l'apoptose des cellules normales au contact (par le biais

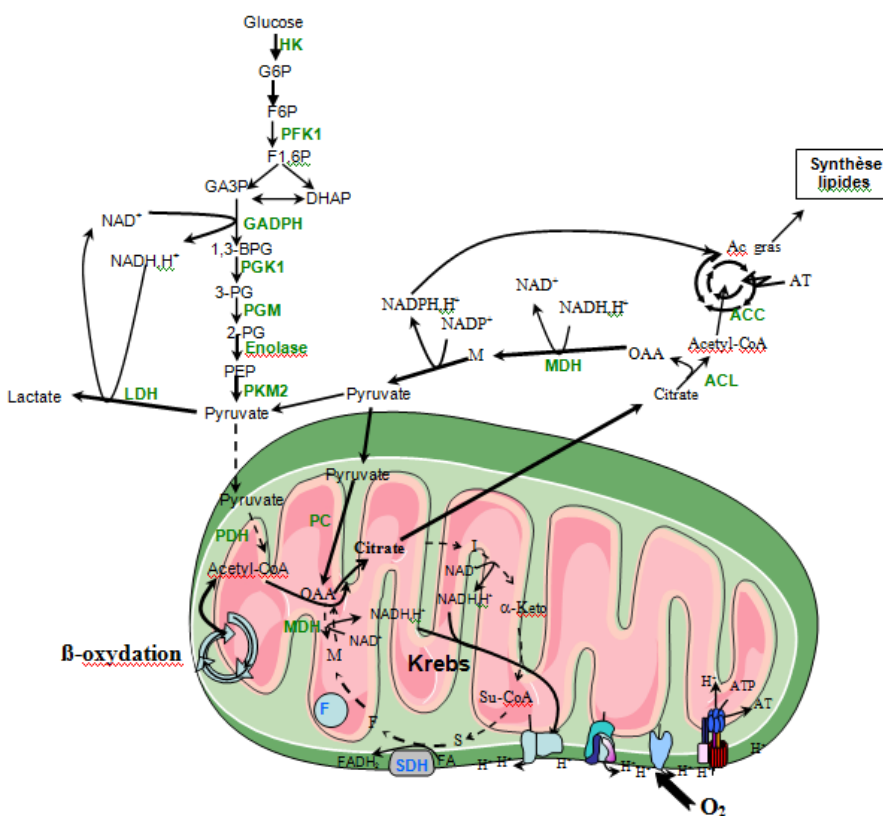


Figure 1 - Schéma de la glycolyse et de la synthèse des acides gras dans une cellule cancéreuse.

La glycolyse aboutit à la formation de lactate par la LDH avec régénération du NAD^+ nécessaire au fonctionnement de la glycolyse. Le blocage de la glycolyse au niveau de PKM2 conduit à une accumulation des intermédiaires de la glycolyse en amont, qui sont dérivés vers les synthèses d'acides aminés, de glycérol, et vers le shunt des pentoses (ribose et du NADPH, H^+) (non figuré). La β -oxydation des acides gras produit de l'acétyl coA, qui va avec l'OAA, former du citrate sous l'action de la citrate synthase. Une partie du citrate va ressortir de la mitochondrie pour servir à la synthèse de novo des acides gras, en fournissant l'acétyl coA et du NADPH, H^+ . La β -oxydation produit l'ATP et l'acétyl coA à la place de la glycolyse (la PDH est altérée), tandis que le pyruvate issu de la glycolyse, de la transamination de l'alanine (non figuré) et de la glutaminolyse, conduit au lactate ou à alimenter à chaque tour le cycle de Krebs en OAA sous l'action de la PC. Si l'OAA n'est pas régénéré, le cycle de Krebs ne peut tourner complètement, et le malade qui s'accumule, ressort de la mitochondrie (cf. Figure 2).

HK : hexokinase, PFK : phosphofructokinase, GADPH : glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogénase, PGK : phosphoglycérate kinase, PGM : phosphoglucomutase, PKM2 : pyruvate kinase de type embryonnaire, LDH : lacticodeshydrogénase, PDH : pyruvate deshydrogénase, PC : pyruvate carboxylase, MDH : malate deshydrogénase, SDH : succinate deshydrogénase, EM : enzyme malique, ACL : ATP citrate lyase, ACC : acétyl coA carboxylase.

de la protéine p53), à l'inverse des cellules cancéreuses, qui supportent cette acidification, peut-être du fait que dans plus de la moitié des cas, elles présentent une mutation du gène TP53 (13, 14) qui inactive ce gène suppresseur de tumeur. L'acidification du milieu favorise la prolifération, la dissémination et participe à la cachexie des patients (15).

La cellule cancéreuse : un « parasite » métabolique et énergétique (fig. 1 et 2)

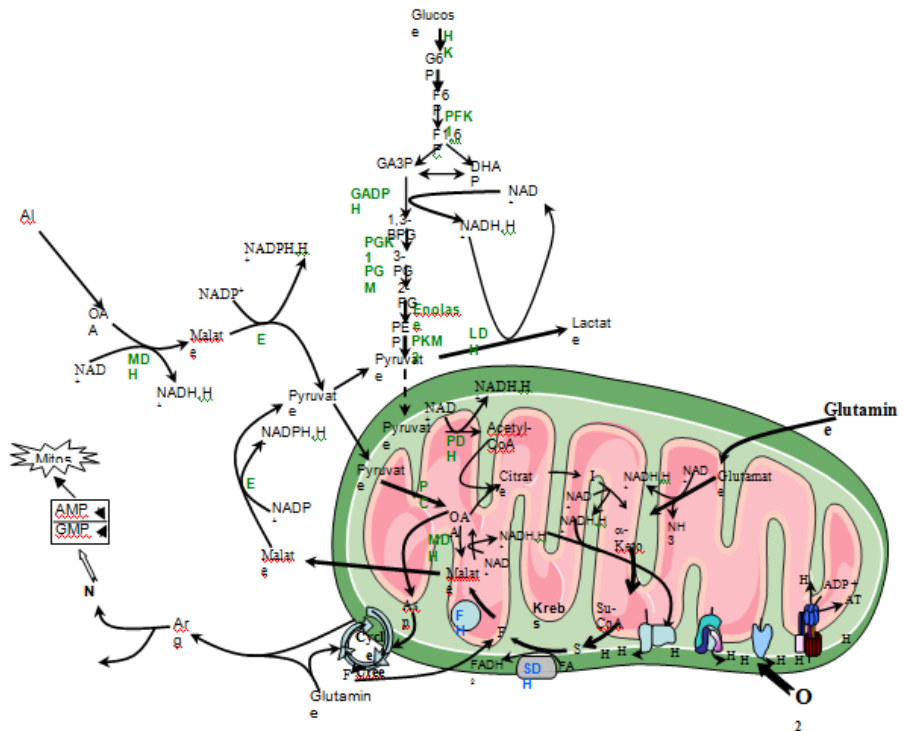
La cellule cancéreuse se comporte comme un « parasite » métabolique qui non seulement consomme le glucose circulant en produisant de l'acide lactique, ceci même en présence d'oxygène (« effet Warburg »), mais qui consomme aussi en excès les acides aminés, en particulier l'alanine (provenant de la protéolyse musculaire), ainsi que la glutamine. La glutamine est le mode de transport sanguin privilégié de l'azote (ion NH4+), et fournit des groupes amine dans plusieurs processus biosynthétiques, comme la synthèse des bases puriques et pyrimidiques (16-19). En même temps, la cellule cancéreuse brûle les graisses périphériques par la β-oxydation mitochondriale, qui est très énergétique lorsque la phosphorylation oxydative est fonctionnelle, puisque l'oxydation complète d'un palmitate, acide gras à 16 carbones, entraîne la formation de 106 ATP (7, 8). À partir des molécules intermédiaires fournies par la glycolyse, la glutaminolyse, et la β-oxydation des acides gras, la cellule cancéreuse va synthétiser toutes les macromolécules nécessaires à sa prolifération : protéines, acides nucléiques et lipides membranaires. Elle rejette l'acide lactique et l'alanine en excès, qui vont servir à reconstituer du glucose au niveau du foie, via la néoglucogénèse, voie qui consomme 6 ATP pour reformer du glucose à partir du lactate (cycle de Cori) (7, 8). La cellule cancéreuse se comporte ainsi comme un « parasite » énergétique. La fonte protéique et lipidique, favorisées par une dysrégulation des hormones (insuline, glucagon et cortisol), se rajoute aux cycles appauvrissant l'organisme en ATP, tandis que les cytokines sécrétées par la tumeur et l'acidification secondaire au rejet d'acide lactique, concourent à la cachexie et à la dissémination de la maladie. Il faut noter qu'associée à la dénutrition liée à la protéolyse et à la lipolyse, le

foie produit des corps cétoniques, qui vont favoriser la prolifération tumorale via l'β-hydroxybutyrate, molécule qui favorise la déacétylation des histones, processus qui jouerait un rôle dans l'expression ou l'inactivation de gènes (oncogènes, surexpression des enzymes de la glycolyse et de la lipolyse ; inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs comme P53 et P21 par exemple).

Du fait de l'altération possible de la respiration mitochondriale et/ou de la phosphorylation oxydative défectueuse par elle-même (20-22), la production d'ATP par la mitochondrie peut être réduite, voire nulle, la glycolyse étant alors le mode principal, sinon unique, de production de l'énergie (11, 12). Bien que la glycolyse soit peu énergétique, il faut remarquer que c'est une voie beaucoup plus rapide de production d'ATP que la phosphorylation oxydative, qui permet à la cellule d'ajuster très rapidement sa consommation de glucose à ses besoins énergétiques élevés (à l'instar des cellules musculaires à l'effort qui utilise la glycolyse pour produire l'ATP), et ce d'autant que la cellule cancéreuse va trouver dans son environnement tous les nutriments en abondance qui sont nécessaires à sa prolifération (10, 23). La cellule privilégierait les voies qui lui fournissent des molécules pour ses synthèses, plutôt qu'un rendement énergétique élevé (10, 23), et ce d'autant qu'elle trouve dans son environnement nécessaire tous les nutriments nécessaires à sa prolifération (10). La surexpression des transporteurs membranaires du glucose, ainsi que plusieurs enzymes de la glycolyse et de la synthèse des lipides (24, 25), accompagne cette reprogrammation du métabolisme de la cellule cancéreuse (Figures 1 et 2).

Les lactico-deshydrogénases (LDH) catalysent l'interconversion du pyruvate en acide lactique, en présence du cofacteur NADH,H+. La formation d'acide lactique s'accompagne de l'oxydation du NADH,H+ en NAD+, lequel est nécessaire au fonctionnement de la glycolyse au niveau de la glyceraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase (7, 8). Dans une cellule normale, le NAD+ réduit produit par la glycolyse est transporté vers la phosphorylation oxydative pour la synthèse d'ATP, ceci par un système de deux navettes (navette du glycérol-phosphate et navette malate-aspartate), car la membrane interne de la mitochondrie est imperméable au NAD/NADH. La navette malate-aspartate permet des échanges bidirectionnels du NADH,H+ entre le cytoplasme et la mitochon-

Figure 2 - Schéma de la glycolyse et de la glutaminolyse dans une cellule cancéreuse. La glutamine, mode de transport sanguin du NH4+, est transformée en glutamate dans la mitochondrie par la glutamine synthétase. Le glutamate va alimenter le cycle de Krebs via l'α-cétoglutarate. Le malate en excès ira vers le cytoplasme pour être transformé en pyruvate, où il donnera du lactate sous l'action de la LDH en régénérant du NAD+ nécessaire à la glycolyse et à la synthèse des nucléotides. Le cycle de l'urée est réprimé, conjointement au cycle de Krebs, ce qui conduit à la production de NO, d'autant plus que la phosphorylation oxydative productrice d'ATP est altérée, le NO stimulant la division cellulaire. À noter que l'alanine, produit par la protéolyse musculaire conduit au pyruvate par transamination (non figuré).
 HK : hexokinase, PFK : phosphofruktokinase, GADPH : glyceraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase, PGK : phosphoglycérate kinase, PGM : phosphoglucomutase, PKM2 : pyruvate kinase de type embryonnaire, LDH : lactico-deshydrogénase, PDH : pyruvate deshydrogénase, PC : pyruvate carboxylase, MDH : malate deshydrogénase, SDH : succinate deshydrogénase, EM : enzyme malique, FH : fumarate hydratase.



drie. Aussi, dans une cellule cancéreuse, où la phosphorylation oxydative est souvent défectueuse, celle-ci est bloquée ou fonctionne en sens inverse (26, 28), transférant vers le cytoplasme l'hydrogène du NADH produit par la β -oxydation mitochondriale des acides gras (7, 8, 18, 19, 28). Le NADH, H⁺ sera ré-oxydé en NAD⁺ dans le cytoplasme par l'action de la LDH, et/ou de deshydrogénases : glutamate deshydrogénase qui permet la désamination de la glutamine périphérique, malate deshydrogénase (MDH) qui transforme l'oxaloacétate (OAA) en malate, ou encore glycérol 3-phosphate deshydrogénase qui permet la formation de glycérol 3-phosphate. Cette dernière réaction produit du glycérol nécessaire à la formation des lipides, en même temps qu'elle est couplée à un transfert d'ion H⁺ (provenant de l'oxydation cytoplasmique du NADH, H⁺) à travers la membrane interne, qui est transféré sur le FAD⁺ pour former du FADH₂, sous l'action de la glycérol 3-phosphate mitochondriale, le FADH₂ transférant ses électrons au complexe II. Cette navette du glycérol phosphate permet ainsi de régénérer du NAD⁺ dans le cytoplasme, tout en transférant les ions H⁺ vers la mitochondrie, pouvant aller contre un gradient de protons à l'inverse de la navette malate-aspartate (8). Ce qui peut être le cas dans une cellule cancéreuse à la phosphorylation défectueuse, lorsque la β -oxydation fournit une grande quantité de NADH, H⁺. Il faut insister sur le fait que du NAD⁺ est nécessaire en grande quantité dans le cytoplasme d'une cellule normale, dans laquelle le rapport NAD⁺/NADH, H⁺ est de l'ordre de 1200 (7, 8). Il est vraisemblable que dans une cellule cancéreuse ce rapport sera plus élevé, puisque le NAD⁺ est nécessaire non seulement au fonctionnement accru de la glycolyse, mais aussi à celui de la synthèse des nucléotides, la PARP (Poly ADP-ribose polymérase) consommant une grande quantité de ce cofacteur pour fonctionner (23).

Le citrate, lorsqu'il est produit par le cycle de Krebs peut être facilement transporté en dehors de la mitochondrie par un mécanisme qui s'apparente à une diffusion facilitée, mais qui nécessite l'échange d'un malate (8). Le citrate alimente alors la synthèse cytoplasmique des acides gras : il est dans un premier temps transformé en OAA et acétyl-CoA sous l'action de l'ATP citrate lyase (ACL), enzyme qui consomme 1 ATP. L'acétyl-CoA entre dans la synthèse des acides gras sous l'action de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) enzyme clé régulateur de cette voie de synthèse, activée par le citrate (8). L'OAA, de son côté, est transformé en malate sous l'action de la MDH, transformation qui régénère du NAD⁺. Le malate est ensuite transformé en pyruvate, par l'enzyme malique qui régénère du NADPH, H⁺, nécessaire à la synthèse des lipides. Le pyruvate est finalement transformé par la LDH en acide lactique, en régénérant du NAD⁺. Au total, dans une cellule cancéreuse où la fin de la glycolyse est bloquée (pour des raisons que nous verrons plus loin), si la phosphorylation oxydative est altérée ou bloquée, ce blocage va entraîner un cycle de Krebs tronqué, dans lequel le malate, issu principalement de la β -oxydation des acides gras, vont sortir de la mitochondrie pour aller vers le cytoplasme : le malate via l'enzyme malique fournit du NADPH, H⁺, et du pyruvate, lequel sous l'action de la LDH, fournit du lactate et du NAD⁺ ; le citrate via l'ACL fournit de l'acétyl-CoA pour la synthèse des acides gras, et de l'OAA, qui via la MDH fournit du malate et du NAD⁺ sous l'action de la MDH. Le NAD⁺ servira au fonctionnement accru de la glycolyse et de la synthèse des nucléotides, tandis que l'acétyl-CoA et le NADPH, H⁺ serviront à la synthèse de novo des acides gras constitutifs des membranes. Il est important de noter que dans la cellule cancéreuse, la glycolyse est bloquée au niveau de sa terminaison, où la pyruvate kinase transforme le phosphoenolpyruvate en pyruvate. Ce blocage est lié au fait que la PK de la cellule cancéreuse est sous sa forme embryonnaire PKM2 réexprimée, forme peu active, ce qui entraîne un goulot d'étranglement vers la fin de la glycolyse (28-31). À ce goulot d'étranglement, qui ralentit

le flux glycolytique, s'associe également un défaut et/ou un blocage de la pyruvate deshydrogénase mitochondriale (PDH) qui transforme le pyruvate en acétyl-CoA (28). La PKM2 fonctionnant moins bien que la PK adulte normale (PKM1), ceci entraîne une accumulation de métabolites en amont du goulot d'étranglement, le PEP servant à fournir des acides aminés nécessaires à la synthèse des macromolécules, tandis que les intermédiaires de la glycolyse plus en amont vont être dérivés vers la formation de glycérol (nécessaire à la synthèse des lipides) avec production de NAD⁺, ou vers le shunt des pentoses phosphates, qui fournit du ribose (nécessaire à la synthèse des acides nucléiques), et du NADPH, H⁺ (nécessaire à la synthèse des lipides, et à la détoxification des radicaux libres).

Les mécanismes de l'effet Warburg

Le métabolisme biochimique dans la tumeur cancéreuse est perturbé, car les régulateurs hormonaux, les voies de signalisation et les aiguillages sur ces voies ont conduit à cette situation, favorable à la prolifération cancéreuse. Les mécanismes impliqués sont complexes et suscitent de plus en plus d'intérêt (10, 22, 23, 28, 32, 33). Schématiquement, trois niveaux de dysfonctionnements et/ou de reprogrammations cellulaires interviennent et s'intriquent.

- Une reprogrammation biochimique : un blocage et/ou un dysfonctionnement au niveau de la dernière étape de la glycolyse, transformant le phosphoenolpyruvate (PEP) en pyruvate, du fait de PKM2 peu active, voire même défectueuse (28-31), blocage de la glycolyse associé à un dysfonctionnement de la PDH, et d'un ou plusieurs complexes de la chaîne respiratoire (11), défaut de production d'ATP par la phosphorylation oxydative, par altération de l'ATP synthase (complexe V) (20), ou par excès ou suractivité des protéines découplantes UCP de la membrane interne (21). La glycolyse devra fournir une part d'autant plus importante d'ATP que la phosphorylation oxydative sera défectueuse (10, 28). En même temps, que la glycolyse produit des intermédiaires nécessaires aux synthèses de molécules indispensables à la division cellulaire (ribose, glycérol, voir plus haut), le cycle de Krebs, alimenté en premier lieu par le catabolisme des acides gras et de la glutamine (18,19), fournira les intermédiaires nécessaires à la synthèse de macromolécules, tels le glutamate et l'aspartate, qui entrent dans la composition des bases puriques et pyrimidiques (8, 9). Une part importante de l'acétyl-CoA fournit en premier lieu par la β -oxydation des acides gras, et non pas par le pyruvate issu de la glycolyse, sortira du cycle de Krebs, pour servir à la synthèse cytoplasmique des acides gras et des stérols. Il est important de noter que pour que le cycle de Krebs fonctionne, il faut que l'OAA soit reconstitué à chaque cycle. L'OAA peut provenir du pyruvate sous l'action de la pyruvate carboxylase (PC), enzyme activée par l'acétyl-CoA, ou du malate sous l'action de la MDH, cette deuxième voie étant vraisemblablement prépondérante dans une cellule cancéreuse, dans laquelle la glycolyse fournit peu de pyruvate. L'OAA est ensuite associé à l'acétyl-CoA (qui provient de l'action de la PDH et/ou surtout de la β -oxydation), pour fournir du citrate sous l'action de la citrate synthase (7, 8). Dès lors que la phosphorylation oxydative est altérée, le cycle de Krebs ne peut tourner complètement, mais fournit des intermédiaires indispensables aux synthèses, en particulier du malate et du citrate (voir plus haut). Dès lors que la phosphorylation oxydative est défectueuse, les électrons du NADH, H⁺ produit par la β -oxydation et le cycle de Krebs, vont être transférés via la navette malate-aspartate pour régénérer dans le cytoplasme du NAD⁺ par les deshydrogénases vues plus haut. Il convient de noter aussi, que le cycle de l'urée est réprimé (car lié au cycle de Krebs), ce qui conduit à l'élimination des déchets azotés par la production de créatine-phosphate (qui servira de donneur d'énergie), et à la production de NO via la phosphorylation oxydative

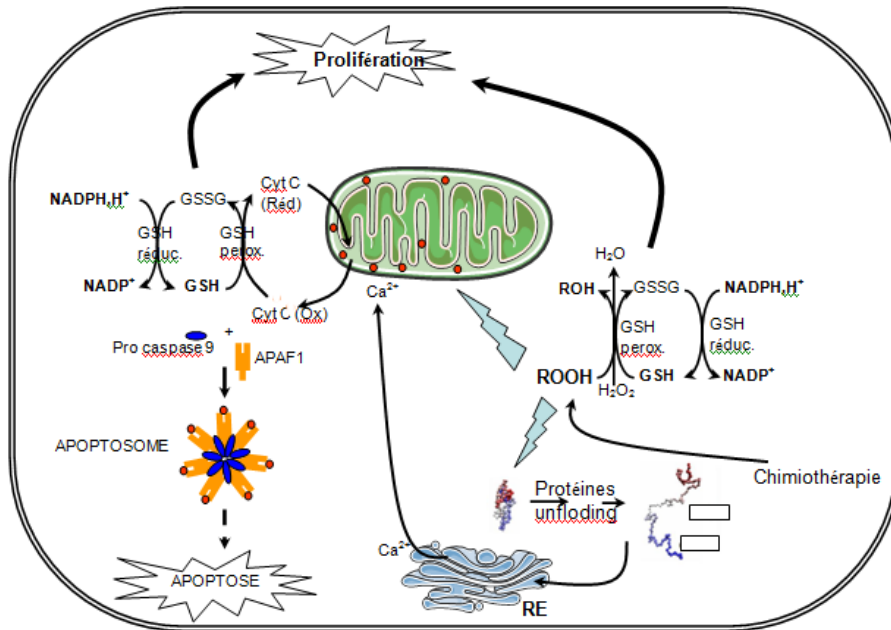


Figure 3 - Schéma des séquences conduisant des radicaux libres à l'apoptose. Les radicaux libres, résultants des dégâts induits par la chimiothérapie, sont détruits par tout un système d'enzymes réducteurs (type superoxyde dismutase), surexprimés dans les cellules cancéreuses, ainsi que par le système du glutathion réduit, lequel réduit également le cytochrome c, qui reste sous cette forme dans la membrane interne (52). Lorsque les capacités de détoxication cellulaire sont dépassées, les radicaux libres, conduisent à libération de cytochrome c oxydé par la membrane interne, qui va activer l'ouverture du MTP et l'activation des caspases, lesquelles entraînent l'apoptose (fragmentation du noyau et de la cellule endébris éliminés par les macrophages). À l'inverse, tandis que les radicaux libres et le cytochrome sont réduits par le glutathion (GSH), la prolifération de la cellule cancéreuse est stimulée par le glutathion oxydé (GSSG).

défectueuse et/ou par l'action de la guanylate cyclase (27, 28). Le NO active la mitose en augmentant le GMPc intracellulaire, ce qui diminue le rapport AMPc/GMPc, la baisse relative de ce rapport stimulant aussi la glycolyse via la PFK (8). Par ces mécanismes (diminution du rapport AMPc/GMPc, augmentation du NO, excès du β -hydroxybutyrate issu de la cétogénèse de la cellule et/ou des cellules hépatiques), la mitose est activée, ainsi que la perte de différenciation cellulaire entraînée par la dérégulation de gènes (oncogènes), la mutation de gènes suppresseurs tels que P53, P21, etc., mécanismes qui amplifie le phénomène, et active encore plus la glycolyse (diminution du rapport AMPc/GMPc).

- Au total, la reprogrammation métabolique de la cellule cancéreuse présente des similitudes avec celle de la cellule fœtale (27, 28), qui est également en phase proliférative, et comporte une glycolyse qui n'alimente pas exclusivement la combustion réalisée dans la mitochondrie, mais sert à fournir des intermédiaires indispensables aux synthèses, toutes les synthèses étant nécessairement consommatrices d'ATP. Il est fort probable que le rapport dans le cytoplasme ATP/ADP, qui est de l'ordre de 150 dans une cellule normale (7, 8), doit être considérablement augmenté dans une cellule en phase proliférative, et ce d'autant que les mitoses sont fréquentes. Pour soutenir sa prolifération, il est probable que la cellule stimule fortement sa β -oxydation, car c'est la voie la plus fortement productrice d'ATP, tandis qu'elle bloque la fin de sa glycolyse, et stimule sa glutaminolyse, produisant ainsi, à la fois l'ATP nécessaires et les molécules indispensables à sa division.
- Une reprogrammation des voies de signalisation conduit la reprogrammation des voies biochimiques. Sous l'effet des oncogènes (voie AKT, mTor, etc.) (10, 32, 33) et/ou de la perte des gènes suppresseurs (P53, P21, myc en particulier) (34), ou encore du fait de la suractivité de la voie HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) liées aux territoires fréquemment anoxiques des tumeurs (35), une reprogrammation des voies signalétiques se met en place, qui favorise le réarrangement du métabolisme nécessaires aux synthèses indispensables à la prolifération. Ces actions passent par un niveau traductionnel et transcriptionnel, HIF-1 α stimulant par exemple la surexpression des transporteurs membranaires du glucose et de plusieurs enzymes de la glycolyse (8).
- À une échelle supérieure, il est fréquemment observé un vieillissement cellulaire, en premier lieu mitochondrial (36, 37), avec troubles de la division mitochondriale (38), altéra-

tion de la phosphorylation oxydative avec surproduction de radicaux libres et dépassement des capacités de détoxication de la cellule (par le glutathion réduit notamment par le NADPH) (fig. 3), radicaux entraînant une altération de l'ADN mitochondrial particulièrement exposé, car non entouré d'histones et dépourvu d'enzymes réparant les lésions ADN, le tout aggravant en retour le dysfonctionnement cellulaire et mitochondrial, avec altération en premier lieu de la chaîne respiratoire, l'ADN mitochondrial codant pour treize des protéines entrant dans les complexes de la chaîne respiratoire (39, 40).

Quoi qu'il en soit de ces mécanismes complexes et intriqués à l'origine de l'effet Warburg, si l'on parvient à bloquer ce fonctionnement énergétique et métabolique particulier, on arrête la prolifération cellulaire, voire on induit la mort de la cellule cancéreuse.

C'est sur cette hypothèse que nous avons travaillé depuis 2005 au sein de l'équipe BIOTICLA (Biologie et Thérapies Innovantes des Cancers Localement Agressifs) du GRECAN (Groupe régional d'études sur le cancer), à la fois sur des cultures de cellules cancéreuses humaines et sur des souris nude porteuses de cancer humain (MPM).

Nous avons préférentiellement choisi de travailler sur le mésothéliome, car notre région est particulièrement touchée par ce cancer, du fait d'industries locales longtemps utilisatrices d'amiante, et ce cancer est un fléau social considérable, qui touche principalement des travailleurs d'âge mûr, le temps de latence entre l'exposition à l'amiante et la maladie étant d'environ trente ans. Dans notre pays, environ 1 500 cas par an sont diagnostiqués, 250 000 décès sont prévus dans les 25 prochaines années en Europe (41) et beaucoup plus dans les pays émergents (Brésil, Chine, Inde, Russie) qui n'ont pas de législation interdisant l'utilisation d'amiante. Du fait de la très grande chimiorésistance de ce cancer, la majorité des patients décèdent dans l'année qui suit le diagnostic, les survies au-delà de 3 ans étant exceptionnelles, quels que soient les traitements entrepris (42). Le cisplatine, chimiothérapie de référence dans le mésothéliome comme dans beaucoup d'autres tumeurs solides, n'obtient qu'un taux de réponse faible (environ 15 %), réponses en règle générale partielles, qui s'accompagnent d'un bénéfice faible en survie, même lorsque le platine est associé à un autre anti-mitotique (vinorelbine, gemcitabine ou encore pemetrexed). Le gain de survie, d'environ 3 mois, n'est d'ailleurs pas formellement prouvé par rapport aux seuls traitements de soutien (42). Dans les cas les plus favorables, où une exérèse du mésothé-

liome par pleuropneumectomie élargie au diaphragme, la survie à 5 ans est d'environ 10-15 % (43) sans bénéfice formellement prouvé par rapport à la pleurectomie-décoltation (44), et ce d'autant que des survies spontanément longues sont parfois observées. C'est dire la chimiorésistance de ce cancer, et la nécessité de trouver de nouveaux traitements pour sortir de l'impasse actuelle, les essais de thérapies ciblées restant à ce jour décevants (42). Or, sans une chimiothérapie active, les autres traitements (la chirurgie en particulier) sont voués le plus souvent à l'échec. Il en est de même de beaucoup d'autres cancers solides.

Objectif de ce travail

Notre objectif est de présenter une synthèse des travaux qui ont été réalisés en 5 ans dans notre laboratoire, pour montrer l'intérêt qu'il pourrait y avoir à bloquer la production d'énergie dans les tumeurs cancéreuses solides, afin de détruire les cellules et/ou de les sensibiliser à la chimiothérapie (le cisplatine en premier lieu), car la réparation des dégâts cellulaires causés par la chimiothérapie nécessite de grandes quantités d'ATP.

Matériels et méthodes

In vitro

Nous avons dans un premier temps (2004-2005) travaillé sur 12 lignées de cancers humains d'origines diverses, disponibles au laboratoire (foie, ovaires, cerveau, colon, ORL, mésothéliome). Nous avons vérifié la validité de notre hypothèse de départ, à savoir qu'en bloquant la glycolyse par du 2-Deoxyglucose (2-DG), un analogue du glucose qui n'est pas métabolisé, la prolifération cellulaire est nettement ralentie et/ou les cellules sont détruites (3). Puis nous nous sommes concentrés sur le mésothéliome malin en travaillant principalement sur deux lignées cellulaires humaines (MSTO-211H et NCI-H28), représentatives d'autres lignées testées (NCI-H2052, IST-Mes3). Ces lignées ont été acquises auprès de l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Le temps de doublement des MSTO-211H est de l'ordre de 24 h. Les cellules NCI-H28 prolifèrent plus lentement et sont résistantes au traitement par une forte dose de cisplatine (20 µg/mL), à l'inverse des cellules MSTO-211H sensibles à cette forte dose, mais résistantes à une dose plus faible (5 µg/mL), laquelle n'entraîne toutefois qu'un ralentissement transitoire de la prolifération, la reprise de la prolifération s'observant dès le 5ème jour après l'injection.

In vivo

Nous avons utilisé des souris Swiss/Nude CD1 femelles de 4 à 6 semaines, pesant environ 25 g (Charles River France). Ces souris, après avoir reçu une injection intrapéritonéale de 2×10^7 de cellules de la lignée MSTO-211H dans 1 mL, ont développé une carcinose péritonéale, visible à partir du 15ème jour, et qui entraînait leur décès en 30 jours environ, la prise tumorale étant généralement excellente, de 100 %. La carcinose péritonéale était faite de nodules tumoraux de mésothéliome confirmés histologiquement (Pr Françoise Galateau-Sallé, Service d'Anatomo-Pathologie, CHU de Caen). Nous avons privilégié un modèle de carcinose péritonéale, car celui-ci était plus facile à reproduire qu'un modèle pleural et il permettait de répéter des injections intra-abdominales

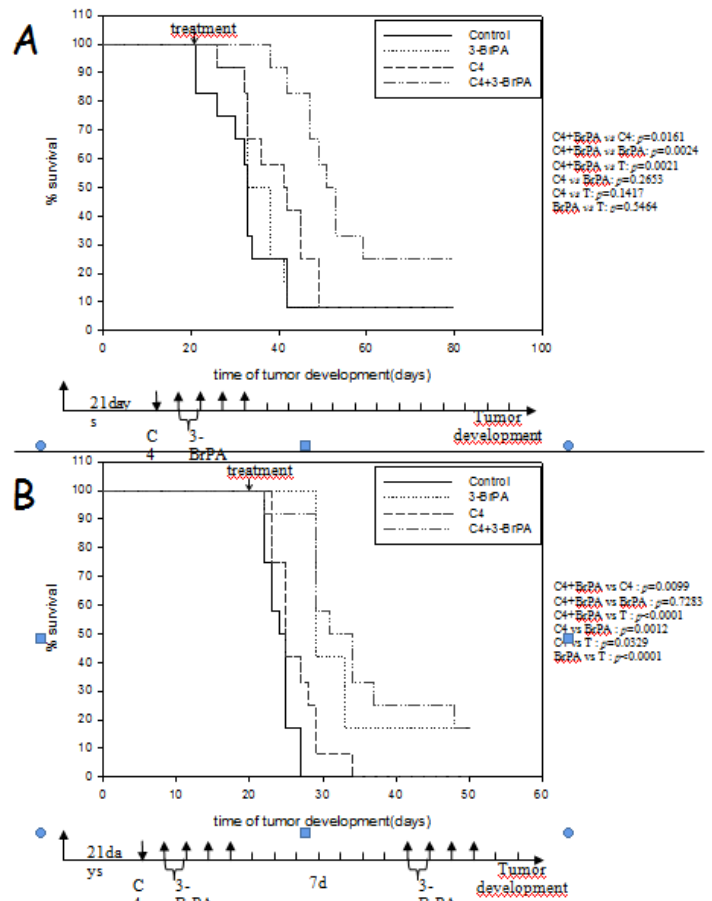


Figure 4 - Courbes de survie de souris nude porteuses d'une carcinose péritonéale par injection de cellules mésothéliales humaines MSTO-211H. Dans une première série d'expérience (A) (12 animaux par groupe), la combinaison du cisplatine injecté en intrapéritonéal (i.p) au 21ème jour avec du 3 BrpA injecté également en i.p pendant 4 jours, a entraîné un gain de survie très significatif, alors que les deux produits seuls étaient sans effet. Dans une seconde série d'expérience, lorsque les 4 injections de 3 BrpA ont été répétées la semaine suivante, le 3 BrpA administré seul a entraîné également un gain très significatif de la survie, 17 % des souris ayant avec ce protocole une réponse complète (2/12) (in: Zhang et al. Anticancer Res 2009. (4)).

à visée thérapeutique, ce que ne permettait pas, ou très difficilement le modèle pleural, du fait du risque de pneumothorax. L'atteinte du péritoine est d'ailleurs fréquente dans l'évolution du mésothéliome, que ce soit primitivement (dans près de 5 % des cas) ou secondairement.

Résultats

Nos travaux ont donné lieu à cinq publications (3-6, 45) qui nous ont permis :

- de valider notre hypothèse de départ, sur 12 lignées différentes de cancers d'origines diverses, en montrant que l'inhibition de la glycolyse par du 2-DG (exposition des cultures à 5 mM du produit) s'accompagnait à cette concentration qui est celle du glucose sanguin, d'une inhibition de la prolifération : après 7 jours d'exposition des cellules au 2-DG, la diminution de croissance s'échelonnait de 63,7 % à 94,3 % en fonction des lignées (croissance comparée dans chaque lignée à celles des cellules témoins de la même lignée non traitées) et/ou d'une mort cellulaire par apoptose ou par un mécanisme non apoptotique, d'importance variable, la cytotoxicité étant parfois très importante (3). Cette étude témoignait que l'effet Warburg était sinon un phénomène universel en tout cas un mécanisme largement répandu dans les cellules cancéreuses, et qui pouvait être mis à profit pour entraver le développement des cellules cancéreuses ;

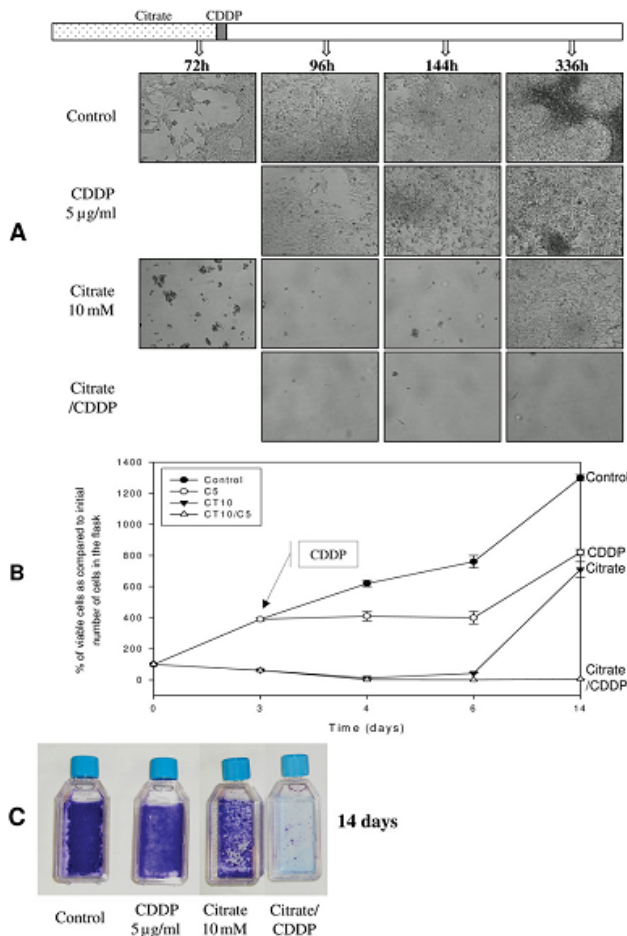
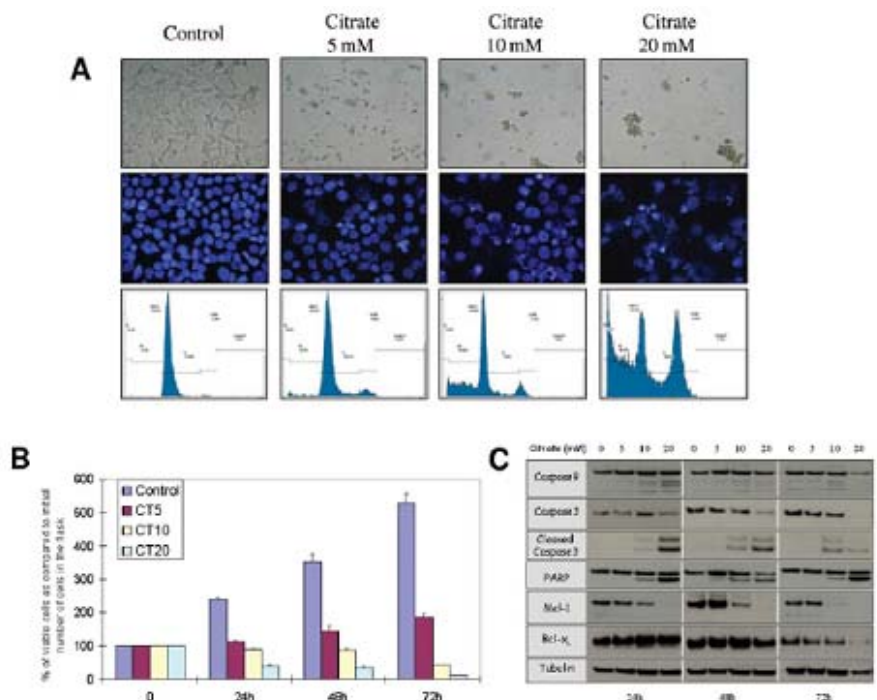


Figure 5 - Association du cisplatine et du citrate. Croissance des cellules de mésothéliome MSTO-211H après trois jours d'exposition à 10 mM de citrate, après traitement par une dose de cisplatine (5 µg/mL), ou après association des traitements. A : morphologie cellulaire ; B : courbe de croissance jusqu'au 14ème jour ; C : coloration des flasques au 14ème jour montrant que l'administration de la dose de cisplatine après trois jours d'exposition au citrate a entraîné l'éradication totale des cellules (in: Zhang et al. Anticancer Res 2009 (5)).

- de montrer que la survie de souris porteuses de mésothéliome humain était très significativement allongée ($p < 0,0001$) lorsqu'elles étaient traitées, à partir du 21ème jour, par deux séries de quatre injections hebdomadaires intra-abdominales de 3-Bromopyruvate (3 BrPA), administré à la dose de 2,67 mg/kg (0,8 mL à 500 µM) par jour (4) (fig. 4). Chez ces souris, le traitement par une injection de cisplatine seul au 21ème jour à la dose de 4 mg/kg n'avait aucun

Figure 6 - Effets du citrate sur les cellules humaines de mésothéliome MSTO-211H. A : morphologie cellulaire, morphologie nucléaire, et histogramme du contenu en ADN, obtenus après 72h d'exposition à différentes doses de citrate (5, 10, 20 mM). B : cinétique de l'évolution de la viabilité cellulaire (test au bleu trypan) en réponse à ces différentes concentrations de citrate. C : effet de ces différentes concentrations de citrate sur l'expression de la caspase 9, de la caspase 3, de la PARP, et sur les protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-xl après 24, 48 et 72 heures d'exposition des cellules MSTO-211H à ces différentes concentrations de citrate.



- effet. Nous avons choisi de tester le 3-BrPA, car ce serait un inhibiteur de la glycolyse au niveau d'HKII, qui avait montré une très bonne efficacité chez le lapin et la souris porteurs d'hépatocarcinome (46, 47). Avec notre protocole, 17 % (2/12) des souris traitées par le 3-BrPA seul, l'administration étant répétée deux semaines de suite, avaient une réponse complète avec disparition des nodules tumoraux ;
- de montrer que l'association de doses, non efficaces en elles-mêmes, de 3-BrPA et de cisplatine (*in vivo*) rendait la combinaison active, avec une prolongation très significative de la survie des souris porteuses de cancer ($p = 0,002$) (4) (fig. 4) ;
- de montrer *in vitro* que l'injection d'une dose faible de cisplatine (5 µg/mL), administrée après trois jours d'exposition au citrate, entraînait la mort apoptotique de toutes les cellules MSTO-211H sans phénomène d'échappement secondaire visible jusqu'au 14ème jour de culture alors que le cisplatine seul n'avait entraîné qu'un ralentissement temporaire de la prolifération (5) (fig. 5). Nous avons choisi de tester le citrate, car c'est un inhibiteur physiologique de la phosphofructokinase (PFK), enzyme régulateur qui contrôle l'entrée dans la glycolyse, et du fait des autres actions anti-énergétiques possibles du citrate (voir dans la discussion les mécanismes d'action du citrate). Des résultats analogues à ceux obtenus *in vivo* avec le 3-BrPA ont été obtenus avec deux injections intra-abdominales de citrate hebdomadaire à la dose de 400 mg/kg (0,4 mL à 85 mM) (résultats non publiés) ;
- de montrer que l'effet anti-tumoral du citrate, outre son action anti-énergétique (voir discussion), pouvait aussi passer par l'inhibition précoce de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, qui joue un rôle primordial, avec la protéine Bcl-xL, dans la chimiorésistance du mésothéliome, comme cela a été montré ensuite au laboratoire (6) (fig. 6). En effet, l'inhibition conjointe, *in vitro*, de ces deux « verrous » clés de l'apoptose par des siRNA spécifiques (ARN interférents anti-Mcl-1 et anti-Bcl-xL) est nécessaire et suffisante pour entraîner la mort complète des cellules MSTO-211H, tandis qu'associée à une faible dose de cisplatine (5 µg/mL), elle permettait d'éradiquer complètement les cellules NCI-211H, réfractaires à la forte dose de cisplatine (20 µg/ml). En revanche, l'inhibition d'une seule de ces molécules, associée au cisplatine, était insuffisante pour éradiquer les cellules ;

- de montrer que les cellules MSTO-211H, susceptibles d'entrer en apoptose, présentaient une respiration mitochondriale fonctionnelle en présence de succinate (substrat du complexe II de la chaîne respiratoire), à l'inverse des cellules de la lignée NCI-H28 réfractaires au cisplatine, qui n'avaient plus de respiration mitochondriale (4). Il est à noter que ces cellules NCI-211H, qui prolifèrent lentement et particulièrement « robustes », ont pu néanmoins être totalement détruites, *via* un mécanisme de nécrose, par du 3-BrPA (à la concentration de 200 μ M) ou par du citrate (20 mM) qui ont semblé agir comme de véritables poisons, au-delà d'une certaine concentration (résultats non publiés) ;
- tout récemment, nous avons confirmé sur deux lignées de cancer gastrique, un cancer particulièrement fréquent en Asie, entraînant près de 700 000 décès par an en Chine (48, 49), que l'exposition durant 3 jours des cellules à 10 mM de citrate entraînait la mort de la quasi-totalité des cellules par apoptose, tandis qu'on observait à nouveau une diminution nette et précoce de l'expression de Mcl-1 dans chaque lignée (45).

Discussion

Chimiorésistance : résistance accrue des cellules à l'apoptose et à la surproduction de radicaux libres

La plupart des chimiothérapies, lorsqu'elles sont actives, conduisent à déclencher l'apoptose des cellules cancéreuses, l'apoptose (ou « mort cellulaire génétiquement programmée ») étant un mécanisme physiologique d'homéostasie par lequel l'organisme se débarrasse de ses cellules endommagées, vieilles, tandis qu'il permet le modelage de la forme durant l'embryogénèse (50, 51). L'apoptose résulte de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale avec ouverture de pores qui permettent la libération dans le cytoplasme de molécules activatrices des caspases, en premier lieu, la libération du cytochrome c oxydé (52). Cette libération de molécules activatrices des caspases (9 et 3 notamment) va conduire à la fragmentation du noyau (dont témoigne le clivage de la PARP) et de la cellule, sous forme de débris, qui vont être éliminés par les macrophages. L'apoptose est sous contrôle de gènes, qui codent pour des protéines pro- et anti-apoptotiques, et résulte en définitive de l'équilibre entre ces deux types de protéines, appartenant toutes à la famille Bcl-2 (53-55). Il semble que les protéines pro-apoptotiques (Bak, Bax) déclenchent l'apoptose, en étant « transloquées » du cytoplasme vers la mitochondrie, après avoir inhibé par liaison directe les protéines anti-apoptotiques (type Bcl-2, MCL1, Bcl-xL) se trouvant à la surface des mitochondries, ou agissent par des mécanismes indirects faisant intervenir la sous-famille des protéines pro-apoptotiques « BH3-only » : Noxa, Pum, Bad, etc. (56). La chimiorésistance est de plus en plus considérée comme étant liée à la surexpression des protéines anti-apoptotiques (51, 53), qu'il est tentant d'inhiber en même temps qu'on favorise l'action des molécules pro-apoptotiques. Comme il a été récemment montré au laboratoire sur nos cellules de mésothéliomes, l'inhibition conjointe par des siRNA spécifiques des protéines Mcl-1, Bcl-xL a permis de détruire à elle seule les cellules MSTO-211H et de lever la forte chimiorésistance au cisplatine des cellules NCI H28, qui ont été détruites par un phénomène de nécrose (6). D'une manière concomitante, la chimiothérapie conduit très souvent à la surproduction de radicaux libres, produits en particulier par la phosphorylation oxydative mitochondriale, qui lorsque les capacités de réduction de la cellule sont dépassées (production de NADPH,H⁺), entraîne la mort cellulaire par apoptose (32, 40). La chimiorésistance est donc également liée à un mécanisme d'adaptation cellulaire à la surproduc-

tion de radicaux libres (fig. 3). Plusieurs molécules sont impliquées dans le système réducteur de la cellule, en particulier la glutathion réductase, qui nécessite que soit régénéré en permanence du NADPH,H⁺ afin de reformer du glutathion réduit, nécessaire pour dégrader les radicaux libres et permettre la détoxification de la cellule. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le NADPH,H⁺ est produit par le shunt des pentoses phosphates et par l'enzyme malique cytoplasmique qui transforme le malate en pyruvate (7, 8).

La chimiorésistance des cancers, primaire comme très souvent dans le mésothéliome ou secondaire comme souvent dans le cancer de l'ovaire, fait la gravité du cancer. En l'absence d'une chimiothérapie efficace, les autres traitements (chirurgie, radiothérapie) sont généralement voués à l'échec, dès lors que la tumeur est diagnostiquée à un stade déjà avancé. Aussi, la plupart des exéréses de cancer solides (poumon, foie, pancréas, estomac, colon, ovaires, etc.) entraînent une survie généralement inférieure à 30 % à 5 ans, tous stades confondus (49). La survie des patients non opérés n'est souvent que de quelques mois, malgré les chimiothérapies entreprises, fonction de la dissémination tumorale et de la cachexie (fonte protéique et lipidique), eux-mêmes témoins des défenses immunitaires amoindries.

Quelles que soient les chimiothérapies utilisées, elles agissent en entraînant des dégâts intracellulaires (adduits à l'ADN en particulier pour le cisplatine), s'accompagnant d'une surproduction de radicaux libres, qui aboutissent soit à la mort cellulaire par apoptose, soit à la survie. Celle-ci survient lorsque que la cellule a réussi à mettre en place des « parades » efficaces (réparation des lésions ADN, amplification du système antioxydant réduisant les radicaux, etc.), qui lui permettent de réparer les dégâts, et/ou de s'y adapter. La cellule peut aussi expulser les chimiothérapies au niveau de sa membrane cytoplasmique vers le milieu extérieur par surexpression du transporteur transmembranaire P-glycoprotéine 170, une protéine appartenant à la famille des transporteurs d'ATP, associé au phénotype MDR (Multi Drug Resistance) (28). Quels que soient ces mécanismes de chimiorésistance, ils sont tous nécessairement très consommateurs d'énergie, et d'autant plus que les dégâts sont importants.

Déplétion en énergie : déclenche l'apoptose et lève la chimiorésistance

Nous avons montré sur un large panel de cellules cancéreuses humaines que la déplétion énergétique entraîne par l'administration d'un inhibiteur de la glycolyse (le 2-DG) s'accompagnait d'un effet cytostatique (inhibition et ralentissement de la prolifération) et parfois d'un effet cytotoxique important (mort cellulaire par apoptose), ce qui démontrait l'intérêt qu'il pouvait y avoir à contrecarrer l'effet Warburg, dès lors que ces produits pourraient être utilisés en clinique (3). Nous avons ensuite montré, à la fois *in vitro* (4) et *in vivo* (5), que l'association d'un anti-énergétique (3-BrPA ou citrate) avec le cisplatine rendait efficace ce dernier, alors que ces produits administrés seuls étaient inefficaces aux doses utilisées. La chimiorésistance de nos cellules a pu être ainsi surmontée. Nous avons travaillé sur deux lignées de mésothéliome, car celles-ci sont apparues représentatives d'autres lignées testées.

Ces deux lignées, MSTO-211H et NCI-H28, se sont révélées avoir un comportement très différent, presque diamétralement opposé.

- Les cellules NCI-H28 prolifèrent lentement, n'ont plus de respiration mitochondriale fonctionnelle (4) et sont chimiorésistantes (même à de très fortes doses de cisplatine). Elles ont pu toutefois être détruites par un mécanisme de nécrose, soit par des anti-glycolytiques (citrate à 20 mM, 3-BrPA à 200 μ M), soit par du cisplatine à faible dose (5 μ g/ml), dès lors que le platine était associé à deux siRNA inhibant dans ces cellules les deux verrous clés de l'apoptose

Bcl-xL et Mcl-1. Il faut noter que l'inhibition d'une seule de ces molécules n'était pas suffisante pour rendre actif le platine sur les cellules NCI-H28 (6). D'une façon qui reste à élucider, le citrate a diminué précocement l'expression de Mcl-1 sur nos cellules mésothéliales et sur deux lignées plus récemment testées de cancer gastrique (5, 45). Cette action paraît d'autant plus intéressante qu'il n'existe que peu ou pas d'inhibiteurs de Mcl-1 actuellement disponibles en clinique, alors que des inhibiteurs de Bcl-xL font déjà l'objet d'essais de phase I (57). Or, il est nécessaire, comme nous l'avons montré au moins dans le cadre du mésothéliome, que ces deux verrous anti-apoptotiques soient inhibés conjointement pour avoir une action cytotoxique puissante en présence de platine (6). Les cellules NCI-H28, particulièrement « robustes », ont des mitochondries aux fonctions altérées, comme en témoigne leur absence de respiration mitochondriale, ce qui rend tentant de lier ce phénomène à leur grande chimiorésistance, comme l'ont fait d'autres auteurs en étudiant d'autres cellules comparables (10-12). D'une façon intéressante, l'exposition de ces cellules à de fortes doses de citrate (20 mM) ou au 3-BrPA (200 µM) a conduit néanmoins à leur mort par nécrose. Il est vraisemblable qu'au-delà d'un certain seuil, lorsque la déplétion en ATP devient suffisamment intense, la mort par nécrose se déclenche, la cellule n'étant pas capable d'apoptose, soit parce que celle-ci est bloquée par une surexpression de molécules anti-apoptotiques (6), soit par le fait que l'apoptose ne peut se déclencher, la mitochondrie n'en étant plus capable ou la déplétion en ATP étant trop intense et/ou brutale, l'apoptose étant un mécanisme de mort cellulaire qui nécessite de l'ATP (58, 59). Le 3-BrPA et le citrate pourraient avoir ainsi un intérêt primordial pour détruire ce type de cellules « robustes », dont on peut faire raisonnablement l'hypothèse qu'elles se situent dans les parties les plus hypoxiques des tumeurs, généralement au centre, où elles se divisent peu ou lentement. Robustes pour survivre dans ces conditions anoxiques (il suffit de remarquer que le centre des volumineuses tumeurs est souvent nécrosé), elles ont nécessairement adopté une glycolyse au fonctionnement accru, couplée vraisemblablement à une glutaminolyse accrue, qu'il serait assurément intéressant d'essayer de contrearrer conjointement à la glycolyse, ainsi que la β-oxydation.

- Les cellules MSTO-211H, à l'inverse, prolifèrent rapidement, sont davantage sensibles à la cisplatine (quoique résistantes à des doses modérées) et conservent une respiration mitochondriale et une apoptose fonctionnelles. Dans ce type de cellules, nous avons observé que la seule inhibition de la glycolyse (2-DG, 3-BrPA, citrate) ne permettait pas d'entraîner à elle-seule la destruction complète des cellules, ces agents entraînant essentiellement un ralentissement et/ou un arrêt de la prolifération. Ceci est dû très vraisemblablement au fait que la mitochondrie fournit une part importante de l'ATP. Néanmoins, le citrate, nous a semblé avoir la plus grande efficacité, probablement parce qu'il inhibe non seulement directement la glycolyse, mais aussi le cycle de Krebs, et indirectement la β-oxydation des acides gras (cf. plus loin les mécanismes d'action du citrate). Il a d'ailleurs été montré que l'inhibition de β-oxydation potentialisait l'apoptose induite par diverses chimiothérapies (25), tandis que l'inhibition du transporteur des acides gras (carnitine acyl transférase) au niveau de la membrane mitochondriale aiderait à déclencher l'apoptose (60). Dans ce type de cellules à la respiration mitochondriale et à l'apoptose fonctionnelle, des inhibiteurs comme le citrate ou le 3-BrPA peuvent avoir un grand intérêt, pour sensibiliser les cellules à la chimiothérapie, comme nous l'avons observé. Cette sensibilisation est vraisemblablement liée au fait que ces produits diminuent la charge en ATP et en NAD⁺ dans le cytoplasme, entravant ainsi la capacité de la cellule à réparer ses lésions, la PARP étant nécessaire à la réparation de

l'ADN, cette enzyme nécessitant une grande quantité de NAD⁺ (28). En abaissant cette charge ATP, NAD⁺ au-dessous d'un certain seuil, non seulement ces produits arrêtent la division cellulaire, mais empêchent la réparation des dégâts intracellulaires. Rappelons que les rapports ATP/ADP et NAD⁺/NADH,H⁺ sont dans le cytoplasme d'une cellule normale respectivement de l'ordre de 150 et de 1 200 (61). Ils sont vraisemblablement beaucoup plus élevés dans une cellule cancéreuse.

Mécanismes d'action du 3-Bromopyruvate et du citrate : largement hypothétiques

Le 3-Bromopyruvate

Le 3-BrPA, hormis le fait qu'il est susceptible d'inhiber toutes les réactions faisant intervenir le pyruvate (LDH, PC, PD), inhiberait en premier lieu l'hexokinase II (HK II) (62-64). HK II se trouve sur la membrane externe de la mitochondrie et transforme le glucose en glucose 6-phosphate, en utilisant le phosphate par hydrolyse d'un ATP produit par la phosphorylation oxydative mitochondriale. Cette action lie glycolyse et phosphorylation oxydative au niveau de HK II. Cet enzyme est généralement surexprimé dans les cellules cancéreuses, comme cela a été montré par des études protéomiques (62-64), cette surexpression étant liée à des régulations transcriptionnelles faisant intervenir HIF-1α et les voies de survie (MAP Kinases, AKT). HK II ferait partie du PTP (*permeability transition pore*), localisé sur la membrane externe de la mitochondrie, associé au VDAC (*voltage dependant anion channel*) (63). L'interaction du PTP avec les molécules pro-apoptotiques Bak/Bax permettrait de lever l'inhibition des molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl2, conduisant à l'ouverture des canaux et à la libération des molécules apoptogènes, en particulier du cytochrome C oxydé. L'inhibition d'HK II par le 3-BrPA conduirait à sa libération de la membrane externe, ce qui déclencherait l'apoptose par la voie mitochondriale (63). Le 3-BrPA, outre cette action hypothétique et son action anti-énergétique (chute de l'ATP), inhiberait d'autres enzymes de la glycolyse, en particulier les réactions faisant intervenir le pyruvate, tandis qu'il augmenterait aussi la production des radicaux libres toxiques pour la cellule (65).

Le citrate

Le citrate est par hypothèse un inhibiteur énergétique puissant, raison pour laquelle nous avons commencé à le tester dès 2006. Administré en excès à une cellule cancéreuse, il inhiberait non seulement sa glycolyse (par inhibition directe de la PFK (7,8) et au moins indirecte de la PK (voir plus loin), mais aussi le cycle de Krebs, par inhibition de la PDH (66) et de la succinate deshydrogénase (67), et indirectement la β-oxydation mitochondriale par l'action du malonyl coA (voir plus loin) ; en même temps, le citrate activerait la néoglucogénèse par activation de la fructose diphosphatase (7, 8) et la synthèse des acides gras par activation de l'ACC (7, 8). Ainsi, le citrate bloquerait toutes les voies productrices d'ATP, en même temps qu'il stimulerait des voies de synthèse (néoglucogénèse et synthèse des lipides) fortement consommatrices d'ATP. Cette molécule étant physiologique, il existe vraisemblablement une gamme de doses efficaces, cytotoxiques envers les cellules cancéreuses, mais sans effet sur les cellules normales car, contrairement aux cellules prolifératives, les cellules normales ne nécessitent pas une production intense d'ATP, étant le plus souvent dans un état d'équilibre, à l'état « semi-quiescent ». De plus, il est possible que dans une cellule normale le citrate en excès puisse stimuler la phosphorylation oxydative, qui par le biais des protéines découplantes, dissiperait le trop plein d'énergie sous forme de chaleur (7, 8). En outre, par son action stimulant la lipogénèse, le citrate pourrait être bénéfique pour recharger l'orga-

nisme dont les réserves ont été appauvries par le cancer.

Actions anti-énergétiques du citrate (fig. 7)

Les mécanismes biochimiques d'action du citrate sont les suivants.

- Inhibitions des PFK1 et 2. Le citrate inhibe la PFK1, enzyme clé qui régule l'entrée de la glycolyse, en transformant le fructose 6-phosphate en fructose 1-6 bisphosphate (7, 8). Cet enzyme allostérique agit comme une véritable jauge d'énergie à l'intérieur de la cellule, inhibé par l'ATP lorsque celui-ci est en excès, activé à l'inverse par l'ADP, reflet d'un manque d'énergie. Le fait que la PFK1 soit inhibée également par le citrate, produit par la première étape du cycle de Krebs, permet d'ajuster le flux de la glycolyse avec celui du cycle de Krebs, dès leurs entrées. Le blocage de la PFK1 est total si le citrate est abondant (8). En inhibant la PFK1, le citrate entraîne une accumulation de glucose-6-phosphate en amont, qui va inhiber l'action de l'HK II (par rétroaction négative) ce qui, par le mécanisme vu plus haut, peut conduire à l'apoptose par perméabilisation du PTP (62-64). Cette inhibition sera d'autant plus forte que le glucose-6-phosphate ne pourra être dérivé par le shunt des pentoses phosphates, par manque d'ATP, cette voie en étant consommatrice (6, 7).
- Le citrate inhibe non seulement la PFK1 mais aussi la PKF2 (7, 8) qui produit le fructose 2-6 bisphosphate, activateur allostérique puissant de la PFK1, puisqu'il permet physiologiquement d'outrepasser l'inhibition de la PFK1 par l'ATP, ceci lorsque le glucose est abondant, ce qui élève sa concentration. C'est vraisemblablement le cas dans la cellule cancéreuse, du fait de l'activation des transporteurs membranaires du glucose (GLUT1 et GLUT3) et de HKII, surexprimés par les effets d'HIF-1 α , de myc, de ras et par la perte de p53 (8, 68). Le fructose 2,6-bisphosphate est ainsi un signal intracellulaire clé dans la cellule cancéreuse (68), qui active la glycolyse et même temps qu'il inhibe la néoglucogénèse, en agissant sur les deux points essentiels de contrôle de ces voies, que sont respectivement la PKF1 et la fructose1,6-bisphosphatase (7, 8). L'inhibition sélective de la PKF2 inhibe ainsi la croissance des cellules cancéreuses (68). En inhibant la PFK2, le citrate diminue le fructose1,6-bisphosphate et contrecarre en même temps les effets de

cette molécules au niveau de la PFK1 et de la fructose1,6-bisphosphatase, enzymes qu'il régule d'une façon inverse au fructose 2,6-bisphosphate.

- Le citrate inhibe également la PK, au moins indirectement, car la baisse du fructose 1-6 bisphosphate (produit par l'inhibition de la PFK1) diminue l'activation allostérique puissante que cette molécule exerce sur la PK (7, 8). Dans une cellule normale, le fructose 1-6 bisphosphate permet ainsi d'ajuster immédiatement le niveau d'activité de la PK avec celui de la PFK1, et régule ainsi étroitement le flux métabolique à la sortie avec le flux à l'entrée de la glycolyse. La baisse d'activation de la PK secondaire à la diminution du fructose 1-6 bisphosphate entraînée par l'administration de citrate pourrait être encore plus forte dans une cellule cancéreuse, car celle-ci ré-exprime la forme embryonnaire PKM2, moins active que la PKM1 adulte, présente dans une cellule normale. Rappelons que cette réexpression de PKM2 crée un goulot d'étranglement à la fin de la glycolyse (28-31), qui dérive les métabolites en amont vers les synthèses nécessaires à la prolifération (acides aminés, glycérol et NAD⁺, ribose et NADPH,H⁺). Il faut noter que la PKM2 est d'autant moins active qu'elle est sous sa forme dimérique phosphorylée : le passage de la forme active (tétramérique déphosphorylée) à la forme inactive de la PK serait dû à un défaut de méthylation de la phosphatase PP2A, défaut qui jouerait un rôle central dans le processus de la cancérisation (28).
- Il faut noter que gluconéogénèse et glycolyse sont réciproquement régulées par le biais d'enzymes différents, qui ne peuvent agir thermodynamiquement que dans un seul sens, de façon qu'une voie est inactive tandis que l'autre est activée. De même, pour la synthèse du glycogène et sa dégradation ou encore pour les activités de la PDH et de la pyruvate carboxylase (PC) qui sont régulées de façon inverse par l'acétyl CoA, de telle façon qu'elles ne soient pas à leur activité maximale en même temps. La régulation allostérique et la phosphorylation réversible de ces enzymes clés sont rapides, complétées par un contrôle transcriptionnel qui se met en place en quelques heures ou en quelques jours, et qui joue alors sur leurs taux intracellulaires (8). Les réactions de phosphorylation sont elles-mêmes contrôlées par des kinases et des phosphatases (type PP2A) (7, 8, 28).

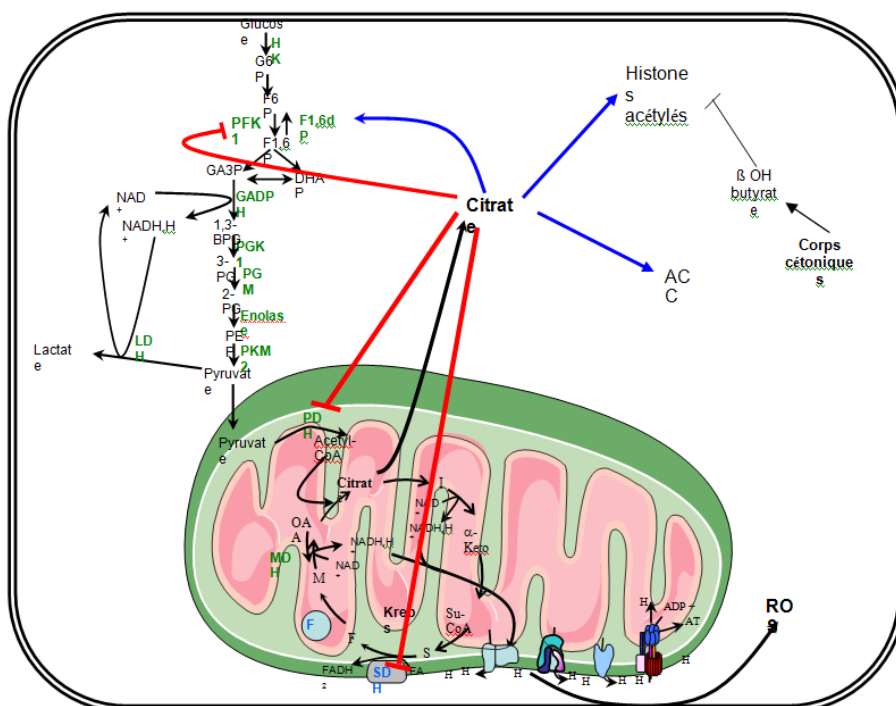


Figure 7 - Schéma récapitulatif des actions inhibitrices et activatrices du citrate. En dehors de l'action inhibitrice sur la PFK (PFK 1 et 2) et activatrice sur la fructose 1,6-bisphosphatase et l'acétyl CoA carboxylase (ACC), actions largement admises (7, 8), les autres actions du citrate sont plus hypothétiques (inhibition de la PDH, de la SDH, acétylation des histones). À noter que l'inhibition de la PKF1 entraîne une diminution du fructose 1,6-bisphosphate, ce qui lève l'activation forte de cette molécule sur la PK, d'où une inhibition au moins indirecte par cet effet, de la PK par le citrate (non figuré). À noter que PFK2 est fortement stimulée dans la cellule cancéreuse par l'entrée du glucose via les transporteurs membranaires activés et surexprimés, ainsi que HKII. PFK2 est un activateur allostérique puissant de PFK1, qui permet de lever l'inhibition de l'ATP de cet enzyme en présence d'un apport important de glucose, tout en inhibant le fructose 1,6-bisphosphate. Le citrate en inhibant PFK2 lève ainsi une activation forte de la glycolyse dans la cellule cancéreuse lié à ce mécanisme régulateur.

- Le citrate régule et ajuste non seulement le flux de la glycolyse aux besoins en ATP, mais agit de même au niveau du cycle de Krebs. Il inhiberait la PDH (66), enzyme complexe qui produit l'acétyl-CoA à partir du pyruvate, étape qui permet en définitive au produit du pyruvate d'entrer dans le cycle de Krebs. De même que la PFK est inhibée à la fois par l'ATP et le citrate, la PDH l'est également par ces deux molécules, ainsi que par l'acétyl-coA, le produit de la réaction, qui stimule à l'inverse la PC pour favoriser la néoglucogénèse. Le citrate inhibe plus loin dans le cycle, la succinate déhydrogénase (SDH) (67), qui transforme le succinate en fumarate. Il est important de noter que la SD est localisée sur la membrane interne et fait partie intégrante du complexe II de la chaîne respiratoire, liant de ce fait le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (6, 7). Via la SDH, le citrate en excès pourrait donc inhiber le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. A l'instar d'autres enzymes comme HK II (69), la SDH n'a pas de fonction univoque. Il a été récemment rapporté qu'elle interviendrait comme produit d'un gène suppresseur qui serait altéré dans le cancer (70), l'accumulation de succinate, secondaire à cette altération, entraînant un transport du succinate vers le cytosol, où cette molécule inhiberait la prolyl hydroxylase (PHD), ce qui en définitive stabilise HIF-1 α et permet son action. Rappelons que HIF-1 α est retrouvé à de fortes concentrations dans les cellules cancéreuses, particulièrement lorsqu'elles sont situées dans les régions hypoxiques, ce facteur jouant un grand rôle dans la résistance à l'apoptose et à la chimiothérapie, favorisant la surexpression des transporteurs membranaires du glucose (GLUT1, GLUT3) et de plusieurs enzymes de la glycolyse (en particulier HK, PFK, PKM2, LDH), ainsi que l'inactivation de la PDH (71). Il serait intéressant d'étudier si le citrate n'inhiberait pas HIF-1 α , soit en inhibant l'expression d'un éventuel gène suppresseur SDH altéré, soit en élevant la concentration cytosolique de l' α -cétoglutarate, molécule qui, comme l'O₂, contrecarre les effets du succinate sur la PHD et conduit à la dégradation d'HIF-1 α (71).
- Le citrate active encore d'une façon allostérique sur l'ACC cytoplasmique (7, 8), qui engage la synthèse des acides gras cytoplasmiques, enzyme également régulée par PP2A. Un taux élevé de citrate traduit normalement le fait que les unités dicarboxylées (acétyl CoA) et l'ATP sont disponibles pour cette synthèse très consommatrice d'énergie. La synthèse du palmitate (acide gras à 16 carbones), constituant majeur des phospholipides membranaires, nécessite 7 molécules d'ATP et 14 NADPH, H⁺ (7, 8).
- Le citrate en excès inhibe indirectement la β -oxydation mitochondriale, via le malonyl CoA, premier produit de l'ACC, et qui inhibe la Carnitine acyl transférase I, située sur la membrane mitochondriale externe (8). Ce transporteur permet le transfert vers la mitochondrie des acides gras, qui proviennent de la lipolyse périphérique et qui vont alimenter la β -oxydation mitochondriale fortement productrice d'ATP. Ainsi, la β -oxydation du palmitate (16 carbones) fournit 8 acétyl CoA, 7 FADH₂, 7 NADH, H⁺, qui conduiront en définitive à la formation de 106 ATP (8).

En définitive, le niveau du citrate cytoplasmique est comme celui de l'ATP, un indicateur du niveau d'énergie cellulaire, qui lui permet de réguler les entrées et les flux dans la glycolyse et le cycle de Krebs, en fonction de la production d'ATP nécessaire, fournie par la phosphorylation oxydative. En régulant l'activité d'autres enzymes en aval, comme la sortie de la glycolyse au niveau de la PK, ou le point de jonction entre le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative au niveau de la SDH, le citrate aide à ajuster étroitement les flux avec la production finale d'ATP. Lorsque la charge énergétique est abondante (ATP/AMP+ADP), l'ATP et le citrate inhibent les voies cataboliques productrices d'ATP (glycolyse, β -oxydation), tandis que les voies anaboliques de mise en réserve (néoglucogénèse, synthèse de glycogène et de lipides)

sont stimulées. En donnant du citrate en excès à une cellule cancéreuse qui nécessite une production élevée d'ATP, celui-ci va leurrer la cellule sur son niveau d'énergie, et bloquer d'un côté les voies productrices d'ATP (glycolyse, cycle de Krebs, β -oxydation, voire phosphorylation oxydative), tout en activant dans le même temps les voies consommatrices (néoglucogénèse, synthèse des acides gras), ce qui va entraîner rapidement une déplétion énergétique intense. À la concentration de 10 mM de citrate, l'arrêt de la prolifération de nos cellules en culture a été précoce, notée dès la 24^{ème} heure d'exposition (5, 45), avec blocage de la mitose en phase G0-G1. Certaines lignées, comme celles de cancers gastriques (BGC-823, SGC-7901), exposées à cette concentration de citrate (le double de concentration habituelle du glucose sanguin) étaient pratiquement totalement détruites par apoptose au 3^{ème} jour d'exposition (45). À cette même dose de 10 mM, un arrêt complet de la prolifération était observé dans la lignée MSTO-211H de mésothéliome avec de l'apoptose. Ces cellules ont été totalement détruites par apoptose lorsqu'on a ajouté une faible dose de cisplatine (5 μ g/ml) au troisième jour d'exposition au citrate (5), ces cellules étant sinon insensibles à cette dose de cisplatine. Enfin, exposées à 200 μ M de 3-BrpA pendant 3 jours, ou à des concentrations de citrate allant au-delà de 20 mM, les cellules de mésothéliome NCI-H28, les plus réfractaires au cisplatine, ont pu être totalement détruites par un phénomène de nécrose.

Les actions non énergétiques du citrate ?

Les mécanismes d'action du citrate, en dehors de ses effets largement admis (inhibition de la PFK, activation de la fructose-1,6-biphosphatase et de l'ACC), sont encore pour le reste largement hypothétiques.

Le citrate pourrait également stimuler la production de radicaux libres, si la phosphorylation oxydative est défaillante, dès lors que celle-ci est stimulée par la stimulation du cycle de Krebs suite à un apport de citrate.

Au niveau nucléaire, une action du citrate est fort probable, car cette molécule traverse vraisemblablement facilement la membrane nucléaire via les pores nucléaires. Il a été récemment montré que les histones acétyltransférases (HATs), enzymes nucléaires qui acétylent les histones et permettent l'expression de gènes par remodelage de la chromatine, sont régulées d'un point de vue dynamique par les changements physiologiques de la concentration en acétyl-CoA (72). Or le citrate est le seul donneur d'acétyl pour l'ATP citrate lyase (ACL) nucléaire, qui forme, tout comme l'ACL cytoplasmique, de l'acétyl-CoA à partir du citrate. Ainsi, pourraient être liés physiologiquement, la consommation de nutriments métabolisés, reflété par le niveau de citrate, et la régulation de l'acétylation des histones. Le citrate pouvant agir au niveau du génome, comme un activateur de gènes (néoglucogénèse, synthèse des acides gras), ou comme un répresseur (gènes glycolytiques). Dans ce cas, il s'agirait d'un mécanisme transcriptionnel peut-être similaire à celui décrit d'une façon princeps par Jacob & Monod au sujet de l'opéron lactose chez *E. Coli*, qui permet d'adapter chez la bactérie, le taux de ces enzymes à l'apport en nutriments nécessaires à la prolifération. L'action nucléaire du citrate serait d'autant plus intéressante à étudier, que les enzymes de la glycolyse et de la synthèse des lipides sont souvent surexprimés dans les cellules cancéreuses (10, 24, 25).

En favorisant la réacétylation des histones, le citrate administré en excès pourrait agir d'une façon similaire aux inhibiteurs de la déacétylation des histones, et avoir ainsi une action anticancéreuse (73), la désacétylation des histones jouant un rôle clé dans la réexpression de gènes (notamment embryonnaires) et/ou dans l'expression des oncogènes (28). Le mécanisme d'action du citrate n'est donc pas univoque, d'autant que nous avons observé qu'il entraîne aussi l'inhibition précoce de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, qui joue

un rôle primordial avec la protéine Bcl-xL dans la chimiorésistance des cancers (55-57), en particulier du mésothéliome (6). Ainsi, chez nos cellules NCI-211H, les plus fortement résistantes au cisplatine, la combinaison d'une faible dose de cisplatine (5 µg/ml) avec une combinaison de deux siRNA dirigés l'un contre Bcl-xL et l'autre contre Mcl-1 a permis d'éradiquer totalement ces cellules (6). Sachant qu'il n'existe à l'heure actuelle peu ou pas d'inhibiteurs spécifiques disponibles de Mcl-1, alors que des inhibiteurs de Bcl-xL font l'objet d'évaluations cliniques (molécules BH3 mimétiques tels que l'antimycine A3 ou le gossypol, qui est en même temps un inhibiteur de la LDH (57)), le fait que le citrate puisse exercer un effet anti-MCL1 renforce son intérêt. Le citrate pourrait être associé utilement à des inhibiteurs de Bcl-xL, puisque l'inhibition de ces deux verrous est nécessaire pour obtenir un effet cytotoxique, au moins dans le cadre du mésothéliome, comme nous l'avons observé (6).

Vers une utilisation en clinique ?

Une autre équipe ayant confirmé que le 3-BrPA permettait de potentialiser le cisplatine (65), ce produit, qui ne serait pas toxique pour les cellules normales (47,71), mériterait d'être testé en clinique.

Le citrate est un produit physiologique, et nous n'avons retrouvé dans la littérature aucune toxicité décrite après l'ingestion accidentelle de doses élevées. Une étude préliminaire de toxicité chez l'animal a été menée au sein du Service de Pharmacologie clinique du CHU de Caen (A. Coquerel et al., données non publiées). Il s'agissait de déterminer la dose maximale tolérable chez la souris après injection intrapéritonéale (voie d'administration choisie en raison des études cliniques envisagées dans l'avenir), ainsi que la toxicité aiguë et chronique dans différents organes (foie, cœur, reins, etc.). Des doses croissantes de citrate tamponné ont été administrées à 5-8 souris/lot depuis la dose de 50 mg/kg jusqu'à la dose maximale de 12 g/kg. Le citrate ne s'est avéré toxique qu'à des doses élevées, la dose létale 50 % étant de 4 g/kg, la dose minimale mortelle étant de 2 g/kg et la mortalité de 100 étant observée pour 8 g/kg. Après les injections intrapéritonéales (IP) nous n'avons observé des signes de toxicité clinique aiguë que pour des doses > 500 mg/kg ; les signes cliniques observés étaient dans l'ordre chronologique : immobilité, polypnée et cyanose des extrémités, hérissément des poils, tremblements, puis convulsions. Ces dernières survenaient dans les 3 à 8 mn qui suivaient l'injection. À l'autopsie nous n'avons noté que 2 cas d'hémorragie intra-abdominale et 2 cas d'ascite. Les doses observées pour la DL50 sont conformes à celles rapportées dans la littérature (fiche CAS des industries chimiques et alimentaires (74)) qui donnent pour DL50 4 g/kg pour la souris et 6-11 g/kg pour le rat. La survenue de convulsions sous forte doses de citrate et les propriétés connues de chélateur du calcium de cet acide nous ont amené à traiter les animaux recevant des doses létales de citrate par du chlorure de calcium, injecté immédiatement après l'injection intra-abdominale de citrate, avec une dose équimolaire. Tous les animaux ainsi traités ont alors survécu aux doses létales de citrate, ce que nous avons interprété comme la preuve indirecte qu'une hypocalcémie sévère était la cause des convulsions et de la létalité aiguë. Cette réversion des convulsions et de la défaillance cardio-vasculaire par sel de calcium a été rapportée chez l'animal (75). L'hypocalcémie après administration de citrate a été également documentée en cas de transfusions sanguines massives associées à une défaillance hépatique en particulier après transplantation, le foie étant responsable du métabolisme du citrate. Dans de tels cas, l'administration de chlorure de calcium permet de rétablir une calcémie normale et de supprimer la toxicité cardiovasculaire qui était liée à cette hypocalcémie (76). Nous avons réalisé une étude sur la toxicité chronique éventuelle du citrate sur les organes (étude histologique du foie,

des reins et du cœur ; service d'anatomo-pathologie du Pr Françoise Galateau). L'étude des coupes histologiques n'a rien révélé chez les souris traitées (10 animaux par groupe), soit 3 fois par semaine par une injection de 200 µg de citrate pendant 5 semaines, soit par 500 µg par injection 3 fois par semaine durant 3 semaines. Toutes ces souris étaient par ailleurs bien portantes avant d'être sacrifiées.

Il est intéressant de rapporter qu'Halabé Bucay (77, 78) a testé le citrate par voie orale donné pendant plusieurs mois à un jeune patient de 10 ans, pesant 22 kg, atteint d'un cancer médullaire de la thyroïde dans le cadre d'une néoplasie endocrinienne multiple de type 2B. Le citrate de sodium étant ingéré par ce patient à la dose de 6 gr par jour (0,27 gr par kg) répartie en quatre prises, cet auteur a rapporté une diminution de plus de 50 % du taux de thyrocalcitonine (78). Même si des doses élevées de citrate de sodium par voie orale semblent pouvoir être tolérées chez l'homme (les gastralgies doivent être prévenues par un anti-acide), des études de toxicité sont indispensables avant de pouvoir proposer ce produit en phase I, seul, et surtout en association avec la chimiothérapie conventionnelle (cisplatine), car, comme nous l'avons observé, il existe des clones de cellules résistantes qui ne peuvent être détruites que par l'association de citrate et de cisplatine (5). Dans le cadre de carcinoses péritonéales ou pleurales, l'administration locale de citrate pourrait être intéressante à associer à une chimiothérapie hyperthermique à base de cisplatine. Sachant qu'en intra-péritonéal, la dose efficace et non toxique que nous avons déterminé chez la souris était de 400 mg/kg (0,4 mL à 85 mM), (dose déterminée par paliers décroissants à partir d'une dose mortelle de 2 g/kg), on peut supposer par extrapolation que la dose efficace chez un homme adulte de 70 kg devrait être de 28 g, dose qui pourrait être administrée par un cathéter péritonéal.

Conclusion

Le métabolisme biochimique dans la tumeur cancéreuse est perturbé mais ce sont les régulateurs hormonaux, les voies de signalisation et les aiguillages sur ces voies qui ont conduit à cette situation. Alors que le système métabolique normal est programmé pour produire de l'énergie, des nutriments, des réserves ou encore de la matière, ces finalités qui dépendent d'un petit nombre d'aiguillages sont mal orientés en cas de cancer, où de la substance tumorale est produite au détriment des réserves, qui ne vise plus à produire des nutriments pour l'organisme. Alors que les réserves sont utilisées normalement pour produire des nutriments, corps cétoniques et glucose, la tumeur cancéreuse utilise ces réserves en brûlant du glucose pour construire de la substance tumorale. En bloquant ce métabolisme, on enraille donc le processus et la prolifération tumorale. Pour toutes ces raisons, des anti-glycolytiques comme le 3-BrpA et le citrate méritaient d'être testés en clinique, en les associant particulièrement à la chimiothérapie conventionnelle à base de cisplatine, car ces agents semblent susceptibles de surmonter la chimiorésistance des cellules en les privant de l'énergie nécessaire aux réparations des dégâts induits par la chimiothérapie. Ce genre d'association apparaît donc fondamental à tester en clinique humaine.

Références

1. Warburg O. On the origin of cancer cells. Science 1956 ; 123 : 309-14.
2. Warburg O. The Metabolism of Tumors. Constable and Company, Ltd. London 1930 ; 327 p.
3. Zhang XD, Deslandes E, Villedieu M, Poulain L, Duval M, Gauduchon P, Schwartz L, Icard P. Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro. Anticancer Res 2006 ; 26 : 3561-6.

4. Zhang X, Varin E, Briand M, Allouche S, Heutte N, Schwartz L, Poulain L, Icard P. Novel therapy for malignant pleural mesothelioma based on anti-energetic effect: an experimental study using 3-Bromopyruvate on nude mice. *Anticancer Res* 2009 ; 29 : 1443-8.
5. Zhang X, Varin E, Allouche S, Lu Y, Poulain L, Icard P. Effect of citrate on malignant pleural mesothelioma cells: a synergistic effect with cisplatin. *Anticancer Res* 2009 ; 29 : 1249-54.
6. Varin E, Denoyelle C, Brotin E, Meryet-Figuière M, Giffard F, Abeillard E, et al. Down-regulation of Bcl-xL and Mcl-1 is sufficient to induce cell death in mesothelioma cells highly refractory to conventional chemotherapy. *Carcinogenesis* 2010 ; 31 : 984-93.
7. Lehninger AL. *Biochimie. Médecine-Sciences* ; 1977.
8. Stryer L, Berg JB, and Tymoczko JL. *Biochimie. Médecine-Sciences* ; 2003.
9. Carretta A, Landoni C, Melloni G, Ceresoli GL, Compierchio A, Fazio F, Zannini P. 18-FDG positron emission tomography in the evaluation of malignant pleural diseases - a pilot study. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000 ; 17 : 377-83.
10. Vander Heiden M, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009 ; 324 :1029-33.
11. Simonnet H, Demont J, Pfeiffer K, Guenaneche L, Bouvier R, Brandt U, et al. Mitochondrial complex I is deficient in renal oncocytomas. *Carcinogenesis* 2003 ; 24 : 1461-6.
12. Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 613-21.
13. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994 ; 54 : 4855-78.
14. Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 2001 ; 277 : 15-30.
15. Gatenby RA, Gawlinski ET. The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 3847-54.
16. Eagle H, Oyama VI, Levy M, Horton CL, Fleischman R. the growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J Biol Chem* 1956 ; 218 : 607-16.
17. Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 1979 ; 254 : 2669-76.
18. DeBerardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin genet Dev* 2008 ; 18 : 54-61.
19. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 2010 ; 29 : 313-24.
20. Lopez-Rios F, Sanchez-Arago M, Garcia-Garcia E, Ortega AD, Berrendero JR, Pozo-Rodriguez F, et al. Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 9013-7.
21. Samudio I, Fiegl M, Andreoff M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect : molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 2163-6.
22. Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 613-21.
23. Grüning NM, Lehrach H, Ralser M. Regulatory crosstalk of the metabolic network. *Trends Biochem Sci* 2010 ; 35 : 220-7.
24. Mohr S, Keith G, Galateau-Salle F, Icard P, Rhin B H. Cell protection, resistance and invasiveness of two malignant mesotheliomas as assessed by 10K-microarray. *Biochim Biophys Acta* 2004 ; 1688 : 43-60.
25. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, et al. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 2005 ; 8 : 311-21.
26. Eto K, Tsubamoto Y, Terauchi Y, Sugiyama T, Kishimoto T, Takahashi N, et al. Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 1999 ; 283 : 981-5.
27. Israël M. Four hidden metamorphoses: a remark on blood, muscle, mental diseases and cancer. *Ed John Libbey Eurotext* ; 2004.
28. Israël M, Schwartz L. Cancer: a dysmethylation syndrome. *Ed John Libbey Eurotext* ; 2005.
29. Mazurek S, Grimm H, Boschek CB, Vaupel P, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *Br J Nutr* 2002 ; 87 (Suppl 1) : S23-S29.
30. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008 ; 452 : 230-3.
31. Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 2008 ; 452 : 181-6.
32. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' Heel. *Cancer cell* 2008 ; 13 : 472-82.
33. Bellance N, Lestienne P, Rossigol R. Mitochondria: from bioenergetics in the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience* 2009 ; 14 : 4015-34.
34. Olovnikov I, Kravchenko JA, Chumakov PM. Homeostatic functions of the p53 suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Seminars in Cancer Biology* 2009 ; 19 : 32-41.
35. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006 ; 3 : 177-85.
36. Seppet E, Gruno M, Peetsalu A, Gizatullina Z, Nguyen HP, Vielhaber S, et al. Mitochondria and energetic depression in cell pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2009 ; 10 : 2252-303.
37. Unterluggauer H, Mazurek S, Lener B, Hütter E, Eigenbrodt E, Zwerschke W, Jansen-Dürr P. Premature senescence of human endothelial cells induced by inhibition of glutaminase. *Biogerontology* 2008 ; 9 : 247-59.
38. Grandemange S, Herzig S, Martinou JC. Mitochondrial dynamics and cancer. *Semin Cancer Biol* 2009 ; 19 : 50-6.
39. Brandon M, Baldi P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 2006 ; 25 : 4647-62.
40. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky. Mitochondria as targets for chemotherapy. *Apoptosis* 2009 ; 14 : 624-40.
41. Peto J, Decarli A, La VC, Levi F, Negri E. The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer* 1999 ; 79 : 666-72.
42. Tsao AS, Wistuba I, Roth JA, Kindler HL. Malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 2081-90.
43. Sugarbaker DJ, Flores RM, Jaklitsch MT, Richards WG, Strauss GM, Corson JM, et al. Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural mesothelioma: results in 183 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 ; 117 : 54-63 ; discussion 63-5.
44. Flores RM, Pass HI, Seshan VE, Dycoco J, Zakowski M, Carbone M, et al. Extrapleural pneumonectomy versus pleurectomy/decortication in the surgical management of malignant pleural mesothelioma: results in 663 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008 ; 135 : 620-6.
45. Zhang XD, Zhang H, Lu Y, Lan J, Huang G, Poulain L, Icard P. Citrate induces the apoptosis death of human carcinoma cells : an anti-cancer agent for gastric cancers ? *Anticancer Res* 2010. (à paraître).
46. Geschwind JF, Georgiades CS, Ko YH, Pedersen PL. Recently elucidated energy catabolism pathways provide opportunities for novel treatments in hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Anti-cancer Ther* 2004 ; 4 : 449-57.
47. Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS, Hultinen J, Pedersen PL. Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 324 : 269-75.
48. Yang L, Parkin DM, Ferlay J, Li L, Chen Y. Estimates of cancer incidence in China for 2000 and projections for 2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 ; 14 : 243-50.
49. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin* 2005 ; 55 : 74-108.
50. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004 ; 305 : 626-9.
51. Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, Irimie A. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* 2009 ; 48 : 811-21.
52. Vaughn AE, Deshmukh M. Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2008 ; 10 : 1477-83.
53. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 2008 ; 27 : 6398-406.
54. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 ; 9 : 47-59.
55. Susnow N, Zeng L, Margineantu D, Hockenbery DM. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Seminars in Cancer Biology* 2009 ; 19 : 42-9.
56. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JL, Adams JM, Huang DC. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-

- xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 2005 ; 19 : 1294-305.
57. Warr M, Shore GC. Unique biology of Mcl-1: therapeutic opportunities in cancer. *Current Mol Med* 2008 ; 8 : 138-47.
58. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997 ; 185 : 1481-6.
59. Lelli JL Jr, Becks LL, Dabrowska MI, Hinshaw DB. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1998 ; 25 : 694-702.
60. Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 3324-9.
61. Campbell PN, Smith AD. *Biochimie illustrée*, trad. Vaysse J & Pontet M. Maloine 2002.
62. Pedersen PL, Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH. Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta* 2002 ; 1555 : 14-20.
63. Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, et al. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 2003 ; 424 : 952-6.
64. Pastorino JG, Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 2008 ; 40 : 171-82. Review.
65. Ihrlund LS, Hernlund E, Khan O, Shoshan MC. 3-Bromopyruvate as inhibitor of tumour cell energy metabolism and chemopotentiator of platinum drugs. *Mol Oncol* 2008 ; 2 : 94-101.
66. Taylor WM, Halperin ML. Regulation of pyruvate dehydrogenase in muscle. Inhibition by citrate. *J Bio Chem* 1973 ; 248 : 6080-3.
67. Hillar M, Lott V, Lennox B. Correlation of the effects of citric acid cycle metabolites on succinate oxidation by rat liver mitochondria and submitochondrial particles. *J Bioenerg* 1975 ; 7 : 1-6.
68. Yalcin A, Telang S, Clem B, Chesney J. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp Mol Pathol* 2009 ; 86 : 174-9.
69. Kim J-W, Dang CV. Multifaced roles of glycolytic enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 2005 ; 30 : 142-50.
70. King A, Selak MA, Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* 2006 ; 25 : 4675-82.
71. Marin-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem* 2009 ; 9 : 1084-101.
72. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* 2009 ; 324 : 1076-80.
73. Mutze K, Langer R, Becker K, Ott K, Novotny A, Lubber B, Hapfelmeier A, Göttlicher M, Höfler H, Keller G. Histone Deacetylase (HDAC) 1 and 2 Expression and Chemotherapy in Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* 2010 Jun 29. (Epub ahead of print)
74. Cf. Fiches internationales de sécurité chimique : acide citrique. Wikipedia ; ICSC : 0704.
75. Vagianos C, Steen S, Masson P, Fåhræus T, Sjöberg T, Kugelberg J, Solem JO. Reversal of lethal citrate intoxication by intravenous infusion of calcium. An experimental study in pigs. *Acta Chir Scand* 1990 ; 156 : 671-5.
76. Diaz J, Acosta F, Parrilla P, Sansano T, Bento M, Cura S, et al. Citrate intoxication and blood concentration of ionized calcium in liver transplantation. *Transplant Proc* 1994 ; 26 : 3669-70.
77. Halabe Bucay A. The biological significance of cancer: mitochondria as a cause of cancer and the inhibition of glycolysis with citrate as a cancer treatment. *Med Hypotheses* 2007 ; 69 : 826-8.
78. Halabe Bucay A. Hypothesis proved... citric acid (citrate) does improve cancer: a case of a patient suffering from medullary thyroid cancer. *Med Hypotheses* 2009 ; 73 : 271.