#### UNIVERSITÉ DE NANTES FACULTÉ DE MÉDECINE

### ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

## Implication du métabolisme dans l'apoptose et la différenciation des cellules souches cancéreuses de gliome murin

## **THÈSE DE DOCTORAT Discipline : Biologie-Santé Spécialité : Cancérologie**

*Présentée et soutenue publiquement par* 

## **Marie MORFOUACE** *Le 22 octobre 2010, devant le jury ci-dessous*

Président du jury : **Pr Pascal Reynier** 

Rapporteurs : Dr Marie-Pierre JUNIER

**Dr Jean-Ehrland RICCI** 

Directeur de thèse : Dr. François VALLETTE PUPH UFR Sciences Médicales, Angers

Directeur de Recherche, UMR 894 Université Paris Descartes

Chargé de Recherche, UMR 895 Université de Nice

Directeur de Recherche, UMR 892 Université de Nantes

## Sommaire

INTRODUCTION	1
Cellules souches et cellules souches tumorales	2
A- Généralités sur les cellules souches	3
1- Capacité d'auto-renouvellement	3
2- Capacité de différenciation	5
3- Classification	7
B- Cellules souches et cerveau	9
1- Les cellules du système nerveux central (SNC)	10
2- Mise en place du cerveau au cours du développement embryonnaire	11
3- Neurogénèse adulte	12
4- Notion de niche neurogénique	13
C- Marqueurs et voies de signalisation propres aux cellules souches	15
1- Pluripotence et facteurs de transcription : Oct4 – Sox2 – Nanog	16
2- Marqueurs de cellules souches neurales	19
D- Cellules souches cancéreuses	20
1- Historique et définition des CSC	22
2- Mise en évidence de la présence de CSC dans les GBM	23
3- Voies de signalisation et rôle de la niche	26
Développement tumoral : présence de stress	29
<b>Développement tumoral : présence de stress</b>	<b>29</b> 30
Développement tumoral : présence de stress         A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose         1- Les protéines de la famille Bcl-2	<b>29</b> 30 31
Développement tumoral : présence de stress         A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose         1- Les protéines de la famille Bcl-2         2- Généralités sur l'apoptose	<b>29</b> 30 31 32
Développement tumoral : présence de stress         A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose         1- Les protéines de la famille Bcl-2         2- Généralités sur l'apoptose         3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC	<b>29</b> 30 31 32 35
<ul> <li>Développement tumoral : présence de stress</li> <li>A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose</li> <li>1- Les protéines de la famille Bcl-2</li> <li>2- Généralités sur l'apoptose</li> <li>3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC</li> <li>B- Présence d'un stress hypoxique important au sein des GBM</li> </ul>	<b>29</b> 30 31 32 35 37
<ul> <li>Développement tumoral : présence de stress</li> <li>A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose</li> <li>1- Les protéines de la famille Bcl-2</li> <li>2- Généralités sur l'apoptose</li> <li>3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC</li> <li>B- Présence d'un stress hypoxique important au sein des GBM</li> <li>1- Morphologie de la tumeur : cœur nécrotique</li> </ul>	<b>29</b> 30 31 32 35 37 37
<ul> <li>Développement tumoral : présence de stress</li> <li>A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose</li> <li>1- Les protéines de la famille Bcl-2</li> <li>2- Généralités sur l'apoptose</li> <li>3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC</li> <li>B- Présence d'un stress hypoxique important au sein des GBM</li> <li>1- Morphologie de la tumeur : cœur nécrotique</li> <li>2- Régulation de HIF</li> </ul>	<b>29</b> 30 31 32 35 37 37 37
<ul> <li>Développement tumoral : présence de stress</li> <li>A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose</li> <li>1- Les protéines de la famille Bcl-2</li> <li>2- Généralités sur l'apoptose</li> <li>3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC</li> <li>B- Présence d'un stress hypoxique important au sein des GBM</li> <li>1- Morphologie de la tumeur : cœur nécrotique</li> <li>2- Régulation de HIF</li> <li>3- Rôle de HIF dans la prolifération tumorale</li> </ul>	29 30 31 32 35 37 37 37 37 37 39
<ul> <li>Développement tumoral : présence de stress</li> <li>A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose</li> <li>1- Les protéines de la famille Bcl-2</li> <li>2- Généralités sur l'apoptose</li> <li>3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC</li> <li>B- Présence d'un stress hypoxique important au sein des GBM</li> <li>1- Morphologie de la tumeur : cœur nécrotique</li> <li>2- Régulation de HIF</li> <li>3- Rôle de HIF dans la prolifération tumorale</li> <li>4- HIF et cellules souches</li> </ul>	29 30 31 32 35 37 37 37 37 39 41
<ul> <li>Développement tumoral : présence de stress</li> <li>A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose</li> <li>1- Les protéines de la famille Bcl-2</li> <li>2- Généralités sur l'apoptose</li> <li>3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC</li> <li>B- Présence d'un stress hypoxique important au sein des GBM</li> <li>1- Morphologie de la tumeur : cœur nécrotique</li> <li>2- Régulation de HIF</li> <li>3- Rôle de HIF dans la prolifération tumorale</li> <li>4- HIF et cellules souches</li> <li>5- Autophagie : avantage tumoral ou cible thérapeutique ?</li> </ul>	<b>29</b> 3031323537373737394143
<ul> <li>Développement tumoral : présence de stress</li> <li>A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose</li> <li>1- Les protéines de la famille Bcl-2</li> <li>2- Généralités sur l'apoptose</li> <li>3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC</li> <li>B- Présence d'un stress hypoxique important au sein des GBM</li> <li>1- Morphologie de la tumeur : cœur nécrotique</li> <li>2- Régulation de HIF</li> <li>3- Rôle de HIF dans la prolifération tumorale</li> <li>4- HIF et cellules souches</li> <li>5- Autophagie : avantage tumoral ou cible thérapeutique ?</li> <li>C- Stress métabolique</li> </ul>	<b>29</b> 303132353737373739414344
<ul> <li>Développement tumoral : présence de stress</li></ul>	29 30 31 32 35 37 37 37 37 37 37 37 39 41 43 44 45
<ul> <li>Développement tumoral : présence de stress</li></ul>	<b>29</b> 30313235373737373941434546
<ul> <li>Développement tumoral : présence de stress</li> <li>A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose</li> <li>1- Les protéines de la famille Bcl-2</li> <li>2- Généralités sur l'apoptose</li> <li>3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC</li> <li>B- Présence d'un stress hypoxique important au sein des GBM</li> <li>1- Morphologie de la tumeur : cœur nécrotique</li> <li>2- Régulation de HIF</li> <li>3- Rôle de HIF dans la prolifération tumorale</li> <li>4- HIF et cellules souches</li> <li>5- Autophagie : avantage tumoral ou cible thérapeutique ?</li> <li>C- Stress métabolique</li> <li>1- Description de l'effet Warburg</li> <li>2- Avantages de l'effet Warburg</li> <li>3- Régulation de l'effet Warburg</li> </ul>	<b>29</b> 303132353737373739414344454648
<ul> <li>Développement tumoral : présence de stress</li> <li>A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose</li> <li>1- Les protéines de la famille Bcl-2</li> <li>2- Généralités sur l'apoptose</li> <li>3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC</li> <li>B- Présence d'un stress hypoxique important au sein des GBM</li> <li>1- Morphologie de la tumeur : cœur nécrotique</li> <li>2- Régulation de HIF</li> <li>3- Rôle de HIF dans la prolifération tumorale</li> <li>4- HIF et cellules souches</li> <li>5- Autophagie : avantage tumoral ou cible thérapeutique ?</li> <li>C- Stress métabolique</li> <li>1- Description de l'effet Warburg</li> <li>2- Avantages de l'effet Warburg</li> <li>3- Régulation de l'effet Warburg</li> <li>4- Pyruvate kinase et effet Warburg</li> </ul>	$ \begin{array}{c}    $
Développement tumoral : présence de stress         A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose         1- Les protéines de la famille Bcl-2         2- Généralités sur l'apoptose         3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC         B- Présence d'un stress hypoxique important au sein des GBM         1- Morphologie de la tumeur : cœur nécrotique         2- Régulation de HIF         3- Rôle de HIF dans la prolifération tumorale         4- HIF et cellules souches         5- Autophagie : avantage tumoral ou cible thérapeutique ?         C- Stress métabolique         1- Description de l'effet Warburg         3- Régulation de l'effet Warburg         5- Autophagie se l'effet Warburg         5- Autophagie de l'effet Warburg         5- Autophagie ce l'effet Warburg         5- Avantages de l'effet Warburg         5- Avantages de l'effet Warburg         5- Molécules ciblant ce métabolisme particulier.	$ \begin{array}{c}    $
Développement tumoral : présence de stress         A- Prolifération anarchique et résistance à l'apotose         1- Les protéines de la famille Bcl-2         2- Généralités sur l'apoptose         3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC         B- Présence d'un stress hypoxique important au sein des GBM         1- Morphologie de la tumeur : cœur nécrotique         2- Régulation de HIF         3- Rôle de HIF dans la prolifération tumorale         4- HIF et cellules souches         5- Autophagie : avantage tumoral ou cible thérapeutique ?         C- Stress métabolique         1- Description de l'effet Warburg         2- Avantages de l'effet Warburg         3- Régulation de l'effet Warburg         5- Autophagie : ciblant ce métabolisme particulier.         6- Métabolisme et apoptose	$ \begin{array}{c}    $

MATERIELS ET METHODES	•••••	60
A- Culture et caractérisation des cellules souches neurales et cancéreuses		61
1- Conditions de culture	61	
2- Mise en culture de cellules souches neurales issues d'embryons de rats	61	
3- Mise en culture de cellules souches neurales issues de cerveaux de rats		
adultes	62	
4- Mise en culture d'astrocytes de rats	62	
5- Mesure de la proportion de cellules souches par dilutions limites	62	
6- Vérification de la capacité de différenciation des NSC	63	
7- Immunofluorescence et lecture à l'apotome	64	
8- Analyse des marqueurs de cellules souches et de différenciation	64	
B- Mesure de la consommation cellulaire d'oxygène par oxygraphie	64	
C- Extraction de protéines liées à la chromatine pour Western Blot	65	
D- Mesure d'interaction par la technique Duolink ou PLA	66	
E- Statistiques	66	

RESULTATS	57
-----------	----

A- Analyse comparative de cellules souches neurales et cancéreuses	68
B- Rôle du DCA, une drogue ciblant le métabolisme, sur l'induction d'apoptose	e dans
les CSC	99
C- Le DCA induit la différenciation des CSC de tumeurs cérébrales de rat, via	une
interaction entre l'isoforme M2 de la pyruvate kinase et Oct4	117
1-DCA et pyruvate kinase M2	.117
2- Le DCA stimule l'interaction de PKM2 avec Oct4	122
3- L'interaction d'Oct4 avec PKM2 diminue son potentiel transcriptionnel	123
4- DCA et différenciation des cellules souches cancéreuses de rat	.127
5- La diminution d'expression d'Oct4 entraîne une modification du métabo	olisme
des CSC et de leur réponse au DCA et 2DG	.130

- Marqueurs	et	voies	de	signalisation	identifiés	dans	les
nourosnhàra	C			0	Ū.		136

ANNEXES		152
	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES161
--------------------------------

#### Liste des illustrations

- Figure 1- Auto-renouvellement des cellules souches
- Figure 2- Prolifération des cellules souches
- Figure 3- Les différents types de cellules souches
- Figure 4- Définition des cellules souches neurales (NSC)
- Figure 5- Neurogénèse adulte
- Figure 6- Les domaines protéiques de Nanog, Oct4 et Sox2
- Figure 7- Régulation transcriptionnelle des cellules ES par Oct4- Sox2 et Nanog
- Figure 8- Voies de signalisation impliquées dans la maintenance des cellules ES
- Figure 9- Modèles pour expliquer l'hétérogénéité des tumeurs
- Figure 10- Interactions entre les CSC et leur niche
- Figure 11- Les protéines de la famille Bcl-2
- Figure 12- La voie extrinsèque de l'apoptose
- Figure 13- Voie mitochondriale de l'apoptose
- Figure 14- Régulation de l'activation de HIF-1

Figure 15- Liste des gènes cibles de HIF impliqués dans des étapes essentielles de la tumorogénèse

Figure 16- Métabolisme du glucose

Figure 17- Phosphorylation oxydative, glycolyse anaérobie et effet Warburg

Figure 18- Voies de signalisation métaboliques actives dans les cellules cancéreuses

Figure 19- Représentation schématique d'un monomère de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase

Figure 20- Rôle de l'isoforme M2 dans la régulation du métabolisme des cellules cancéreuses

Figure 21- Propriétés cinétiques et conséquences métaboliques des formes dimériques et tétramériques de l'isoforme M2

Figure 22- Quelques drogues inhibant le métabolisme glycolytique des cellules cancéreuses

Figure 23- Mode d'action du DCA

Figure 24- Caractérisation des cellules souches cancéreuses utilisées dans cette étude

Figure 25- Comparaison par 2D-DIGE de neurosphères normales and cancéreuses

Figure 26- Validation des analyses de 2D-DIGE

Figure 27- Signification biologique du métabolisme mis en évidence dans les neurosphères cancéreuses

Figure 28- Effet du DCA sur les CSC in vitro et in vivo

Figure 29- Effet du DCA sur le métabolisme des cellules souches neurales et cancéreuses

Figure 30- Le DCA diminue la résistance à l'apoptose des CSC induite par l'Etoposide ou les irradiations

Figure 31- Le DCA induit une apoptose Bax-dépendante

Figure 32- Augmentation de p53 et de Foxo3 après traitement au DCA

Figure 33- Expression des isoformes M1 et M2 de pyruvate kinase

Figure 34- Localisation cellulaire de la PKM2 dans les P7<sup>CSC</sup>

Figure 35- Validation de la diminution d'expression de PKM2

Figure 36- Viabilité des cellules transfectées avec un sh RNA scramble ou dirigé contre

les isoformes M1 et M2 de la pyruvate kinase

Figure 37- Mesure du niveau de phosphorylation de la PKM2

Figure 38- Mesure de l'activité enzymatique de la pyruvate kinase

Figure 39- Mise en évidence d'une interaction entre Oct4 et PKM2

Figure 40- Mise en évidence de l'interaction entre PKM2 et Oct4 par la méthode de Duolink dans les cellules P7<sup>CSC</sup>

Figure 41- Diminution de la quantité de Oct4 lié à la chromatine des cellules P7<sup>CSC</sup>

Figure 42- Expression relative de 4 gènes-cibles de Oct4 dans les NSC et les P7<sup>CSC</sup>

Figure 43- Niveau d'expression protéique de Stat3 et Sox2 dans les NSC et les P7<sup>CSC</sup>

Figure 44- Effet des shRNA dirigés contre les isoformes M1 et M2 de la pyruvate kinase sur le niveau d'expression de gènes-cibles d'Oct4

Figure 45- Expression relative de la nestine dans les NSC, les C6<sup>CSC</sup> et les P7<sup>CSC</sup>

Figure 46- Analyse par cytométrie en flux de l'évolution des marqueurs nestine, GFAP,

Tuj et Rip dans les NSC et les P7<sup>CSC</sup> après un traitement au DCA

Figure 47- Analyse par immunohistochimie de l'évolution des marqueurs nestine, GFAP

et Tuj dans des tumeurs induites par injection de P7<sup>CSC</sup> dans des souris nudes

Figure 48- Validation de la diminution d'expression d'Oct4

Figure 49- Effet des shRNA dirigés contre Oct4 sur le niveau d'expression de gènescibles d'Oct4

Figure 50- Dosage enzymatique de la pyruvate kinase et de la lactate déshydrogénase dans les P7<sup>CSC</sup> et les P7 transfectées avec les shRNA 28 et 48

Figure 51- Viabilité des P7<sup>CSC</sup> et P7 transfectées avec le shRNA 28 et 48 traitées avec du 2DG

Figure 52- Viabilité des P7<sup>CSC</sup> et P7 transfectées avec le shRNA 28 et 48, traitées avec du

DCA, de l'Etoposide ou co-traitées avec Etoposide et DCA

Figure 53- Analyse par cytométrie en flux des marqueurs nestine, GFAP, Tuj et Rip dans

les P7<sup>CSC</sup> transfectées avec un shRNA scramble ou le shRNA 28

Figure 54- Modification du métabolisme cellulaire dans les cellules cancéreuses

Figure 55- Bilan des régulations métaboliques retrouvées dans les CSC

Figure 56- Schéma-bilan de l'action du DCA sur les cellules cancéreuses souches et non souches

### Liste des abréviations

**2DG**: 2-Déoxyglucose ABC: "ATP-binding cassette" **ABT**: Abbott Ac-CoA : Acétyl-Coenzyme A APE1 : "Apurinic / apyrimidinic Endonuclease 1" **ARNT** : "hydrocarbon receptor nuclear translocator" **bFGF** : "basic Fibroblast Groth Factor" **BH** : domaines d'homologie avec la protéine Bcl-2 Bmi-1 : "polycomb ring finger oncogene" BMP: "Bone Morphogenic Protein" **CNTF** : "Cilia Neurotrophic Factor" **CPN**: Cellules Progénitrices Neurales **CSC** : Cellules Souches Cancéreuses **CSM** : Cellules Souches Mésenchymateuses **DCA** : Dichloro-acétate **DED**: "Death Effector Domain **DISC**: "Death-Inducing Signaling Complex" EGF: "Epidermal Growth Factor" EGFR : "Epidermal Growth Factor Receptor" **ES** : "Embryonic Stem cell" **FADD**: "Fas-Associated protein with Death Domain" FBP : Fructose-2,6-Phosphate FIH : Facteurs Inhibant HIF GAPDH : "Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase" **GBM** : Glioblastome Multiforme **GDNF** : "Glial cell-Derived Neurotrophic Factor" **GFAP** : "Glial Fibrillary Acidic Protein" **GSH** : glutathion HDAC: "Histone deacetylases" **HIF** : "Hypoxia-Inducible Factor" **HK** : héxokinase hnRNP : "heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein" HRE : "Hypoxia Response Element" IAP: "Inhibitors of Apoptosis" **IDH** : isocitrate déshydrogénase IL : interleukine **iPS**: cellules souches pluripotentes induites JNK : c-Jun N-terminal kinase **Klf4**: "Krueppel-like factor 4" KO: "knock-out" **LDH** : lactate déshydrogénase LIF: "Leukemia Inhibitory Factor"

MCT : "Monocarboxylate Transporteur"

MOMP: "Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization"

mTOR : "mammalian Target Of Rapamycin"

**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide

**NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NEP : cellules souches neuroépithéliales

**NGF** : "Nerve Growth Factor"

NSC: "Neural Stem Cell"

Oct: famille des facteurs de transcription à domaine POU

**PDGF** : "Platelet Derived Growth Factor"

**PDH** : Pyruvate Déshydrogénase

**PDK** : Pyruvate Déshydrogénase Kinase

**PEP** : Phospho-Enol-Pyruvate

**PG** : Progéniteur Glial

**PHD** : Prolyl-Hydroxylases

**PI3K** : "Phosphoinositol-3 Kinase"

PIP3 : Phosphatidylinositol Phosphorylé

**PK** : Pyruvate Kinase

**PN** : Progéniteur Neuronal

Ptc : Patched 1

**PTEN** : "Phosphatase and TENsing homologue"

**R5P** : Ribose 5-Phosphate

**RE**: Réticulum Endoplasmique

ROS: "Reactive Oxygen Species"

SGZ : "Subgranular Zone"

Shh : Sonic Hedghog

Sirt1: Sirtuine 1

**SNC**: système nerveux central

**Sox** : "SRY(Sex determining Region Y)-related HMG (Hight Mobility Group) box"

STAT3 : "Signal Tranduction and Activator of Transcription"

SVZ : "Sub-Ventricular Zone "

**TFAM** : "Transcription Factor A"

**TNF** : "Tumor Necrosis Factor"

**TNFR** : "TNF Receptor"

TRADD: "TRAIL Receptor Associated protein with Death Domain"

TRAIL : "TNF Related Apoptosis Inducing Ligand"

UPR: "Unfolded Protein Response"

**VDAC** : "Voltage Dependent Anion Channel"

VEGF : "Vascular Endothelial Growth Factor"

**VHL** : Von Hippel Lindau

Wnt : Wingless

REGARDEZ LES FAITS AVEC LES YEUX D'UN JEUNE ENFANT, SOYEZ PRET A RENONCER A TOUTE IDEE PRECONCUE, SUIVEZ HUMBLEMENT LA NATURE OU QU'ELLE VOUS MENE, MEME SI C'EST A L'ABIME, SINON VOUS N'APPRENDREZ RIEN THOMAS HENRI HUXLEY, EVOLUTION AND ETHICS, 1894

# **INTRODUCTION**

## **PREMIERE PARTIE**

# CELLULES SOUCHES ET CELLULES SOUCHES TUMORALES

#### Première partie : Cellules souches et cellules souches tumorales

Le terme « cellule souche » est apparu dans la littérature à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, dans les travaux du biologiste allemand Ernst Haeckel (Haeckel, 1868). Il a été tout d'abord utilisé dans le contexte de la transmission du patrimoine génétique (Weismann, 1885, Bovery, 1892, Häcker, 1892) ainsi que dans le système hématopoïétique pour décrire un précurseur commun à toutes les cellules sanguines (Pappenheim, 1896, pour revue : Ramalho-Santos and Willenbring, 2007).

#### A. Généralités sur les cellules souches

Les cellules souches sont définies sur la base de deux critères principaux : une capacité de prolifération quasi-indéfinie *in vitro* (auto-renouvellement) (Avery et al., 2006) et la capacité de donner naissance à des cellules spécialisées (différenciation) (Morrison et al., 1997, Weissman, 2000). Les cellules souches ne possèdent pas de fonctions définies et sont considérées comme immatures. Elles sont maintenues dans un état quiescent au sein de niches et dépendent de signaux extérieurs pour se diviser et s'engager dans une voie de différenciation (Morrison and Spradling, 2008). Le fait qu'elles soient quiescentes entraîne une moindre sensibilité aux rayonnements et aux drogues induisant l'apoptose, utilisées en chimiothérapie.

#### 1. Capacité d'auto-renouvellement

L'auto-renouvellement est un processus par lequel les cellules souches se divisent de façon symétrique ou asymétrique afin de donner naissance à une ou deux cellules souches « fille(s) » avec le même potentiel de différenciation. Cette capacité d'auto-renouvellement est essentielle aux cellules souches car elle leur permet par exemple de maintenir le pool de cellules souches dans les tissus adultes (He et al., 2009). Cependant, même si les cellules souches sont capables de s'auto-renouveler intensément (ex : cellules souches hématopoïétiques et transplantation dans des souris irradiées), elles restent le

plus souvent quiescentes, *in vivo*, dans des conditions physiologiques (Wilson et al., 2008).



**Figure 1 : Auto-renouvellement des cellules souches**. *a)* Division symétrique : une cellule souche donne naissance à deux cellules filles identiques entre elles et avec le même potentiel de différenciation que la cellule mère. b) Division asymétrique : une cellule souche donne naissance à deux cellules filles, l'une identique à la cellule mère, l'autre se mettant à proliférer et commençant un processus de différenciation pour aboutir à une cellule spécialisée. Adapté de Knoblich 2001.

Les cellules souches sont capables de se diviser de façon symétrique ou asymétrique, de manière stochastique ou en réponse à des signaux de leur environnement (Figure1). Les divisions symétriques prédominent quand les cellules souches doivent proliférer (en réponse à une blessure par exemple) alors que les divisions asymétriques permettent de maintenir une balance entre cellules souches et cellules différenciées (Morrison and Kimble, 2006). Dans le cadre de la division asymétrique, chaque cellule donne naissance à deux cellules filles qui présentent des différences au niveau taille, potentiel de différenciation et contenu protéique (Knoblich, 2008). L'une des cellules filles exprimera le programme génétique lui permettant de se différencier en une cellule mature alors que l'autre restera quiescente dans la niche, permettant ainsi le maintien du pool de cellules souches (Morrison and Kimble, 2006).

Les mécanismes impliqués dans l'auto-renouvellement sont à la fois intrinsèques et extrinsèques. Dans le cas de mécanismes intrinsèques, des régulateurs de l'autorenouvellement sont localisés asymétriquement durant la mitose, de telle façon qu'une seule cellule fille en hérite (Yu et al., 2006). Les mécanismes extrinsèques consistent principalement en des signaux en provenance de la niche. En effet, non seulement les niches procurent un site d'ancrage pour les cellules souches, mais elles sécrètent aussi des signaux qui régulent la survie des cellules souches, ainsi que leur cycle cellulaire et leur différenciation (ex : Notch, BMP, EGF, bFGF,...) (He et al., 2009).

La capacité d'auto-renouvellement des cellules souches dans les tissus adultes leur confère une capacité de régénération accrue, cependant cela leur confère également un risque plus élevé de développer des cancers, car elles sont capables, en théorie, de proliférer indéfiniment (Morrison and Kimble, 2006).

#### 2. Capacité de différenciation

Les cellules souches sont capables de se diviser dans des organismes adultes et sont responsables de la régénération des tissus. La plupart des cellules souches se divisant lentement, les cellules différenciées sont obtenues à partir de cellules à potentiel plus restreint mais étant capables de se diviser rapidement : les cellules d'amplification transitoire (Figure2).



**Figure 2 : Prolifération des cellules souches.** Après réception de signaux appropriés, les cellules souches sont capables de générer, par division asymétrique, des cellules à potentiel plus restreint mais dotées d'une intense capacité proliférative : les cellules d'amplification transitoire. Adapté de Knoblich 2001.

Toutes les cellules souches ne sont pas identiques dans leur capacité de différenciation. Ainsi, on peut distinguer plusieurs types de cellules souches (Figure3) :

- Les cellules souches totipotentes sont capables de créer un organisme dans son intégralité. Ces cellules ne se retrouvent que dans le zygote ou lors de ses premières divisions (jusqu'au stade morula) (Bongso and Richards, 2004).

- Les cellules souches pluripotentes sont capables de se différencier en cellules issues de n'importe lequel des trois feuillets embryonnaires (endoderme, ectoderme, mésoderme) (Zernicka-Goetz, 2002). Elles sont cependant incapables, à l'inverse des cellules totipotentes, de générer les annexes embryonnaires comme le placenta ou l'amnios. Elles proviennent de la masse cellulaire interne du blastocyste (stade 40 cellules) et correspondent à ce qui est communément appelé « cellules souches embryonnaires » ou cellules ES.

- Les cellules souches multipotentes, présentes dans l'embryon ou dans l'organisme adulte, sont capables de donner naissance à l'ensemble des cellules d'un organe ou d'un tissu donné, mais ont un potentiel de différenciation plus restreint que les cellules ES. Ainsi, les cellules souches neurales sont capables de générer les trois principaux types cellulaires du système nerveux central (neurones, astrocytes, oligodendrocytes). Ces cellules peuvent néanmoins présenter une certaine plasticité ou transdifférenciation, c'està-dire que sous l'influence de certains signaux, elles sont capables de donner naissance à des types cellulaires différents de ceux du feuillet embryonnaire dont elles sont issues (Filip et al., 2005).

- Les cellules souches unipotentes sont incapables d'auto-renouvellement et ne donnent naissance qu'à un seul type cellulaire, comme par exemple les kératinocytes de la peau.



**Figure 3 : Les différents types de cellules souches.** Les cellules souches peuvent se classer en trois grande catégories : les cellules totipotentes, présentes jusqu'au stade Morula, les cellules souches pluripotentes, embryonnaires présentes dans le blastocyste et les cellules souches multipotentes que l'on retrouve dans le fœtus et dans les tissus adultes.

3. Classification

Les cellules souches peuvent être classées en trois grandes catégories en fonction de leur origine spatio-temporelle:

 les cellules souches embryonnaires (cellules ES) ont été isolées chez la souris il y a plus de 20 ans (Evans and Kaufman, 1981, Martin, 1981) et décrites pour la première fois chez l'homme par le groupe de Thomson (Thomson et al., 1998).

Les cellules ES murines peuvent être maintenues *in vitro* dans un état indifférencié et pluripotent en présence de fibroblastes servant de cellules nourricières (feeders), dans un milieu nutritif contenant des facteurs de croissance spécifiques comme le LIF (facteur inhibiteur de leucémie, cytokine de la famille de l'IL-6) (Smith et al., 1988). Le LIF, par l'activation du facteur STAT3 (Signal Tranduction and Activator of Transcription), favorise l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules ES murines (Ying et al., 2003).

Les cellules ES humaines ont été caractérisées par des tests de différenciation *in vitro* et de formation de tératomes *in vivo* et présentent un degré de pluripotence identique à

celui des ES murines, même si pour des raisons éthiques évidentes, le chimérisme et la transmission à la lignée germinale n'ont pas été testés. Cependant, les ES humaines ne présentent pas de dépendance au LIF, car celui-ci semble incapable d'activer la voie STAT3 (Thomson et al., 1998).

- les cellules souches adultes d'origine fœtale (sang de cordon, liquide amniotique) sont également présentes dans l'organisme adulte. Celles-ci se distinguent des cellules ES par trois caractéristiques principales : la multipotence, une capacité d'autorenouvellement limitée et leur hétérogénéité car elles proviennent de différents tissus. Ces cellules souches adultes jouent un rôle prépondérant dans l'homéostasie d'un tissu ou d'un organe. En effet, elles sont capables de remplacer les cellules mortes ou endommagées, assurant ainsi la pérennité de la fonction de l'organe au cours de la vie de l'individu. Ces cellules ont été identifiées dans différents tissus : la peau (Rochat et al., 1994), le sang (Morrison and Weissman, 1994), le cerveau (Gage, 2000), l'os (Bianco and Gehron Robey, 2000), l'intestin (Booth and Potten, 2000), le pancréas, les muscles lisses et squelettiques (Renault et al., 2000) ainsi que le foie et le cœur (Torella et al., 2005). Les cellules souches du sang, de la peau et de l'intestin fonctionnent en permanence dans l'organisme adulte alors que les autres cellules souches ne sont activées que lors d'une nécessité de réparation tissulaire.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) se distinguent des cellules souches adultes de par leur hétérogénéité en terme de potentiel. Elles ont été identifiées pour la première fois dans la moëlle osseuse par le groupe de Friedenstein (Friedenstein et al., 1970). Ces cellules peuvent se différencier en cellules musculaires (Wakitani et al., 1995), en os (Rickard et al., 1996), en cartilage (Fortier et al., 1998), en tendon, ligament et graisse (Pittenger et al., 1999) ou en cellules pulmonaires (Ortiz et al., 2003), même si leur principale fonction semble être un rôle de soutien de l'hématopoïèse (Arai et al., 2004).

- les cellules souches pluripotentes induites (iPS), sont des cellules pluripotentes, dérivées de cellules somatiques (Sung et al., 2006, Hanna et al., 2008). Ces iPS permettent d'une part de contourner les problèmes éthiques liés à l'utilisation des cellules souches humaines et d'autre part, facilitent l'accès des chercheurs à ces cellules souches. Les premières iPS ont été dérivées de fibroblastes murins transfectés à l'aide de vecteurs rétroviraux pour les gènes Oct4 (famille des facteurs de transcription à domaine POU), Sox2 (SRY(Sex determining Region Y)-related HMG (Hight Mobility Group) box2), Klf4 (Krueppel-like factor 4) et c-Myc (Takahashi and Yamanaka, 2006). Dès 2007, les premières iPS humaines ont été dérivées par la même technique, pour les gènes Oct3/4, Sox2, Klf4 et Lin 28 (Takahashi et al., 2007, Yu et al., 2007a).

Les iPS sont considérées comme des cellules souches pluripotentes car elles expriment des marqueurs de cellules souches et possèdent la capacité de former des tératomes (Maherali and Hochedlinger, 2008). Cependant, l'utilisation de rétrovirus pour la re-programmation induit un risque important d'intégration de transgènes dans le génome. De plus, Klf4 et c-Myc sont des oncogènes, ce qui accentue le risque de formation de tumeurs après injection chez l'animal.

Bien que l'utilisation thérapeutique des iPS humaines ne soit pas encore possible, ces cellules peuvent néanmoins être utilisées intensément en recherche. Elles permettent, par exemple la mise en place de lignées de cellules pluripotentes de patients atteints de maladie génétique, rendant possible la production de cellules somatiques spécifiques d'une maladie pour le screening de nouvelles drogues à visée thérapeutique (Chamberlain et al., 2008).

#### B. Cellules souches et cerveau

Le système nerveux central (SNC), et le cerveau en particulier, est un tissu à la composition cellulaire hétérogène. Cette hétérogénécité lui permet de traiter des quantités importantes d'informations et de les transmettre dans tout l'organisme.

1- Les cellules du système nerveux central (SNC)

Le SNC est composé de deux types principaux de cellules : les neurones et les cellules gliales. Les neurones sont des cellules excitables constituant l'unité structurale fonctionnelle du SNC. Ils communiquent entre eux à l'aide de synapses, assurant la transmission d'un signal bioélectrique appelé influx nerveux. Les neurones ont un métabolisme particulier car ils utilisent comme substrat principal, voire unique, le glucose. Les neurones sont cependant beaucoup moins nombreux que les cellules gliales, qui constituent environ 90% du SNC chez l'Homme. Ces cellules assurent plusieurs fonctions, notamment le soutien et la nutrition des neurones mais ont également un rôle de guide pendant la migration neuronale. Il existe quatre types principaux de cellules gliales : les astrocytes (Ramon y Cajal, 1913), les oligodendrocytes, les cellules de la microglie et les cellules épendymaires. Les astrocytes sont des cellules en étoile, qui ont un rôle de soutien mécanique et de régulateur des échanges métaboliques entre le sang, le liquide céphalo-rachidien et les neurones. Les oligodendrocytes ont pour fonction principale la myélinisation des axones des neurones. La microglie correspond aux représentants du système monocyte/macrophage du SNC, de par leur capacité de migration et de phagocytose. Enfin, les cellules épendymaires constituent un épithélium qui permet de séparer le tissu nerveux du liquide céphalorachidien.

Les neurones et les cellules gliales dérivent d'un même pool de cellules : les cellules souches neurales ou NSC, qui persistent dans certaines régions localisées du cerveau adulte : la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone sous-granulaire (SGZ) (Reynolds and Weiss, 1992). Ces NSC possèdent les deux principales caractéristiques des cellules souches : une capacité d'auto-renouvellement ainsi qu'une capacité de prolifération et de multipotence (Figure4).

Enfin, ces cellules souches neurales sont capables, *in vitro* en présence de facteurs de croissance spécifiques (Cf. Matériels et Méthodes), de former des neurosphères, qui sont composées de NSC mais également de cellules à différents stades de différenciation (progéniteurs mais aussi cellules différenciées).



**Figure 4 : Définition des cellules souches neurales (NSC).** Les NSC sont capables d'auto-renouvellement. Elles peuvent se diviser pour donner des cellules progénitrices neurales (CPN), à potentiel plus restreint. Les CPN peuvent s'engager dans deux voies de différenciation en donnant un progéniteur glial (PG) ou neuronal (PN). Les PG donneront naissance aux astrocytes et oligodendrocytes et les PN aux neurones. Adapté de Gage 2000.

2- Mise en place du cerveau au cours du développement embryonnaire

Au stade embryonnaire (E10.5 chez le rat), le tube neural est constitué par une population cellulaire homogène et proliférative, appelée cellules souches neuroépithéliales (NEP), qui représentent les premières cellules souches neurales (Kalyani et al., 1997). Le cerveau se met en place à partir du neuroépithélium, qui au départ, ne représente qu'une simple couche d'épithélium pseudostratifié, correspondant à la zone ventriculaire. Afin de générer une quantité importante de neurones, les cellules neuroépithéliales subissent tout d'abord des divisions asymétriques dans le but d'amplifier le pool de cellules souches (Knoblich, 2008). Les cellules NEP de la zone ventriculaire génèrent la majorité des neurones et cellules gliales par l'intermédiaire de progéniteurs neuronaux (neuroblastes) ou gliaux (glioblastes) (Temple, 2001). Parallèlement à ces processus de migration/différenciation, la zone ventriculaire diminue en taille pour disparaître peu après la naissance. En revanche, de nouvelles zones germinales apparaissent, comme par exemple la zone sous-ventriculaire (Clarke, 2003).

#### 3- Neurogénèse adulte

La neurogénèse est un processus qui génère des neurones fonctionnels à partir de cellules souches ou progénitrices. Ramon y Cajal, au début du XXème siècle, établit que la neurogénèse ne se déroulait qu'au cours du développement embryonnaire chez les mammifères (Ramon y Cajal, 1913). Ce fut grâce aux travaux de Joseph Altman que les premières preuves de l'existence de neurones proliférant dans plusieurs zones du cerveau de rats adultes furent avancées (Altman, 1962, Altman, 1963). Cependant, ce ne fut qu'au début des années 1990 que la présence de cellules souches dans le cerveau adulte de rongeurs (Reynolds and Weiss, 1992), puis chez l'homme (Kukekov et al., 1999) fut démontrée.

Chez la plupart des mammifères, une neurogénèse active a lieu, tout au long de la vie adulte, dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux (Lois and Alvarez-Buylla, 1993, Lois and Alvarez-Buylla, 1994, Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996) et dans la zone sous-granulaire (SGZ) de l'hippocampe (Cameron et al., 1993, Kuhn et al., 1996, Eriksson et al., 1998) (Figure5). Cette neurogénèse semble provenir de cellules, appelées cellules souches neurales, qui présentent des caractéristiques d'astrocytes spéciaux exprimant la nestine (filament marqueur de cellule souche) et la GFAP (protéine acide fibrillaire gliale, marqueur d'astrocyte), mais pas S-100β (marqueur d'astrocyte mature) et présentant certaines propriétés de glie radiaire (Alvarez-Buylla and Lim, 2004). Cependant, en dehors de ces deux régions, la neurogénèse semble quasi-inexistante (Rakic, 2002, pour revue : Gould, 2007).



**Figure 5 : Neurogénèse adulte.** La neurogénèse adulte a lieu dans deux zones principales du cerveau : la zone sous ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux et la zone sous granulaire (SGZ) du gyrus denté. Les neurones générés dans la SVZ migrent à travers le courant migratoire rostral jusqu'au bulbe olfactif, alors que les cellules formées dans la SGZ migrent dans la couche granulaire du gyrus denté. Adapté de Zhao et al. 2008.

Les neurones formés dans la SVZ migrent sur une longue distance à travers le courant migratoire rostral et se différencient notamment en interneurones dans le bulbe olfactif (Lois and Alvarez-Buylla, 1994, Kornack and Rakic, 2001, Carlen et al., 2002). Les neurones formés dans la SGZ migrent dans la couche granulaire du gyrus denté et deviennent des cellules granulaires (Cameron and McKay, 2001, pour revue : Ming and Song, 2005).

La neurogénèse est régulée par des évènements physiologiques et pathologiques à tous les niveaux, parmi lesquels la prolifération des cellules souches et progénitrices neurales adultes, la différenciation et le devenir des progéniteurs, ainsi que la survie, la maturation et l'intégration des neurones nouvellement formés. La neurogénèse adulte est également réduite au cours du vieillissement.

#### 4- Notion de niche neurogénique

Les cellules souches adultes résident dans un environnement spécial, appelé « niche », qui varie en fonction du temps et du type tissulaire. L'hypothèse de la « niche » a été décrite pour la première fois par Schofield en 1978 et constitue un microenvironnement particulier avec un rôle de soutien pour les cellules souches (Schofield, 1978, Fuchs and Whartenby, 2004). Des niches ont été décrites dans de nombreux tissus, comme le système hématopoïétique (Orkin, 2000, Till and Mc, 1961, Weissman et al., 2001), ou la peau (Cotsarelis et al., 1990).

Dans le système nerveux, des niches neurogéniques ont été mises en évidence au niveau de la SVZ et de la SGZ (Doetsch et al., 1999, Palmer et al., 1997, Shen et al., 2004). Ces niches sont composées de multiples types cellulaires, à savoir des astrocytes, des cellules endothéliales, des cellules épendymaires ainsi que d'une lame basale (Zhao et al., 2008a). Les cellules endothéliales fournissent un site d'attachement aux cellules souches et génèrent également de nombreux signaux induisant un contrôle sur l'autorenouvellement et la différenciation des cellules souches (Doetsch, 2003, Shen et al., 2004, pour revue : Li and Xie, 2005). Ces signaux incluent les BMPs (Bone Morphogenic Proteins) ainsi que leurs antagonistes (Temple, 2001), la voie Sonic Hedghog (shh), la voie des Wingless (Wnt), mais aussi les signaux provenant des jonctions gap présentes entre cellules de la niche et composées de cadhérines et de  $\beta$ -caténines. Tous ces signaux jouent un rôle dans le maintien du pool de cellules souches (Chenn and Walsh, 2002).

La niche permet donc un contrôle homéostatique de la population de cellules souches en modulant la balance auto-renouvellement-différenciation en fonction des besoins du tissu.

La notion de niche est également importante dans le cadre des cancers. En effet, il semble de plus en plus évident que la masse de cellules cancéreuses provienne de quelques cellules, multipotentes et étant capables de s'auto-renouveler : les cellules souches cancéreuses (CSC) (Singh et al., 2004). A l'heure actuelle, on ne sait pas si les CSC proviennent de cellules souches normales ou de cellules plus différenciées. Cependant, une hypothèse est que ces CSC proviendraient de cellules souches normales qui auraient acquis des mutations leur permettant d'échapper au contrôle de la niche (Wodarz, 2006). Une autre hypothèse est que la dérégulation de facteurs de croissance sécrétés par la niche pourrait entraîner une prolifération anarchique des cellules souches et une tumorigénèse (Clarke and Fuller, 2006, Calabrese et al., 2007).

#### C. Marqueurs et voies de signalisation propres aux cellules souches

Les cellules souches neurales expriment des facteurs de transcription et utilisent des voies de signalisation particulières. De nombreuses études ayant montré qu'Oct4, Sox2 et Nanog sont les trois facteurs de transcription gouvernant la pluripotence, nous nous intéresserons plus particulièrement à eux.

En ce qui concerne les voies de signalisation, il a été montré que les voies Sonic Hedghog (Shh) (Ruiz i Altaba et al., 2002), Wingless (Wnt) (Rijsewijk et al., 1987), Notch (Hambardzumyan et al., 2008), ainsi que Bmi-1 étaient nécessaires à l'autorenouvellement de ces cellules. En effet, Notch augmente l'auto-renouvellement des NSC et inhibe leur différenciation en neurones ou en cellules gliales (Hitoshi et al., 2002). De surcroît, des souris ivalidées pour le gène de la Wnt présentent une perte du cerveau médian, suggérant que les protéines de la famille Wnt auraient un rôle dans l'autorenouvellement des NSC et bloqueraient leur différenciation (Lee et al., 2000). En outre, le blocage de la voie de signalisation Shh dans des souris adultes induit une diminution de prolifération des cellules de la SVZ (Palma et al., 2005). En ce qui concerne les BMP, ils promeuvent la prolifération ou l'arrêt mitotique des NSC en fonction des interactions avec d'autres signaux (Chen and Panchision, 2007). Enfin, Bmi-1 (polycomb ring finger oncogene) augmente l'auto-renouvellement des cellules souches en inhibant la transcription de Ink4a/Arf (Bruggeman et al., 2005).

La niche est également capable de synthétiser des facteurs mitogènes tels que l'EGF (facteur de croissance épidermique) et le bFGF (Facteur de croissance basique des fibroblastes). Ces facteurs de croissance jouent un rôle prépondérant pour la prolifération des cellules souches neurales. En particulier, l'EGF exogène induit la différenciation des NSC en cellules gliales *in vivo* (Gregg and Weiss, 2003). Au contraire, le bFGF stimule la prolifération des NSC et un apport de bFGF exogène permet de restaurer, chez la souris âgée, un taux de neurogénèse correspondant à celui d'une souris plus jeune (Jin et al., 2003). Ces deux facteurs de croissance sont ceux qui sont rajoutés *in vitro* pour la culture des NSC (voir Matériels et Méthodes).

D'autres facteurs tels que le NGF (facteur de croissance nerveuse), le CNTF (facteur neurotrophique ciliaire), le GDNF (facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales) ou

des cytokines comme les interleukines 1 et 6 sont également sécrétés par des astrocytes de la niche en réponse à des stimuli physiologiques ou pathologiques. De même, les cellules endothéliales sécrètent des facteurs trophiques importants pour les NSC comme le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) ou le PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes).

#### 1- Pluripotence et facteurs de transcription : Oct4 – Sox2 – Nanog

De nombreux facteurs de transcription jouent un rôle important dans le devenir des cellules souches. En particulier, des travaux ont récemment montré que les facteurs de transcription Oct4 (POU5F1, famille des facteurs de transcription à domaine POU (Scholer et al., 1990), Sox2 (SRY(Sex determining Region Y)-related HMG (Hight Mobility Group) box2) et Nanog régulent la pluripotence des cellules souches. Ces trois facteurs de transcription possèdent des domaines de liaison à l'ADN (5'-ATGCAAAT-3' pour Oct4, 5'-TAAT[GT][GT]-3' ou 5'-[CG][GA][CG]C[GC]ATTAN[GC]-3' pour Nanog et 5'-[A/T][A/T]CAA[A/T]G-3' pour Sox2) ainsi que des domaines de transcription leur permettant d'activer l'ADN polymérase II et d'initier la transcription de leurs gènes cibles (Figure6).

Ces trois facteurs de transcription sont importants pour le développement embryonnaire. En effet, des embryons de souris privés de Oct4 meurent au stade blastocyste (Nichols et al., 1998). De même, des embryons déficients en Sox2 meurent directement après implantation dans l'utérus (Avilion et al., 2003). Enfin, une perte de Nanog conduit à des embryons incapables de développer un épiblaste (feuillet externe de l'embryon) (Mitsui et al., 2003).



**Figure 6 : Les domaines protéiques de Nanog, Oct4 et Sox2.** Les domaines de liaison à l'ADN sont en vert et les domaines de transactivation en jaune. Nanog possède un domaine de dimérisation (en bleu), riche en tryptophanes (WR), qui sépare les deux domaines terminaux CD1 et CD2. Le domaine de liaison à l'ADN se situe en N-terminal de la protéine. Oct4 possède deux domaines de liaison à l'ADN : les domaines POU ainsi que deux domaines de transactivation (N-TAD et C-TAD). Sox2 est un membre de la famille des « High Mobility Group » (HMG) et possède également un domaine de transactivation (TAD). Adapté de Chambers et Tomlinson 2009.

*In vitro*, des études montrent que des cellules ES déplétées en Nanog se différencient en endoderme (Mitsui et al., 2003). De même, un niveau précis du facteur de transcription Oct4 est nécessaire pour maintenir la pluripotence des cellules ES. En effet, une diminution dans son niveau d'expression induit une différenciation en trophectoderme alors que sa surexpression induit une différenciation en endoderme et mésoderme (Niwa, 2001, Yeom et al., 1996). De plus, une diminution de l'expression de Oct4 dans les cellules ES entraîne un arrêt de leur cycle en phase  $G_0/G_1$ , via une augmentation du niveau d'expression de p21 (Lee et al., 2010). En ce qui concerne Sox2, une augmentation de ce facteur de transcription induit une différenciation des cellules ES en cellules présentant des marqueurs de neuroectoderme, mésoderme et trophectoderme (Kopp et al., 2008), alors qu'une diminution induit des cellules avec des marqueurs de trophectoderme (Chew et al., 2005).

De plus, des études sur le génome de cellules ES de souris (Chen et al., 2008, Loh et al., 2006) ou humaines (Boyer et al., 2005) mettent en évidence que ces trois facteurs de transcription activent ou co-activent de nombreux gènes formant le réseau caractéristique qui maintient la pluripotence. La coopération entre Oct4 et Sox2 a été particulièrement décrite et permettrait notamment de réguler leur propre transcription (Chew et al., 2005)

ainsi que celle de Nanog (Rodda et al., 2005). Deux mécanismes ont été mis en évidence. Le premier est lié au fait que Oct4 peut se fixer en position proximale ou distale sur les promoteurs de ses gènes cibles. Cependant, quand il se fixe en position proximale, il a besoin d'un autre facteur de transcription pour activer l'ARN polymérase, comme par exemple Sox2 (Scholer, 1991). Il a été également montré que Oct4, via son POU domaine, et Sox2, via sa boite HMG, sont capables de se lier à l'ADN de façon coopérative (Ambrosetti et al., 1997, Ambrosetti et al., 2000) (Figure7).



**Figure 7 : Régulation transcriptionnelle des cellules ES par Oct4- Sox2 et Nanog.** *Identification des gènes régulés par Oct4-Sox2 et Nanog dans les cellules ES et classement par rapport à leur fonction. Adapté de Boyer et al. 2005.* 

En outre, ces trois facteurs de transcription sont capables de reprogrammer des cellules somatiques en iPS (Takahashi and Yamanaka, 2006, Meissner et al., 2007). Enfin, il a été mis en évidence qu'Oct4, Sox2 et Nanog pouvaient être activés par les intégrines, BMP4 ou la voie Wnt (Figure8).



**Figure 8 : Voies de signalisation impliquées dans la maintenance des cellules ES.** *Des récepteurs membranaires comme les Bone Morphogenic Proteins (BMP), les intégrines ou les protéines de la famille wingless (Wnt) initient des signaux qui sont propagés jusqu'au noyau et affectent les facteurs de transcription clés de la maintenance de la pluripotence des cellules ES : Oct4-Sox2 et Nanog. Ceci entraîne des changements dans l'expression de gènes et des modifications dans le devenir de la cellule. Adapté de Boiani et Scholer 2005.* 

Ces trois facteurs de transcription sont importants pour maintenir la pluripotence des cellules ES. C'est pourquoi, une dérégulation de l'expression de ces facteurs de transcription serait propice à la transformation cancéreuse, et particulièrement au maintien des cellules souches cancéreuses.

2- Marqueurs des cellules souches neurales

La caractérisation des cellules souches neurales pourrait permettre l'étude de populations homogènes de NSC. Plusieurs marqueurs ont déjà été mis en évidence. Ainsi,

l'antigène CD133 (AC133) chez l'homme ou prominine1 (glycoprotéine transmembranaire) chez la souris, a été utilisé pour isoler les NSC issues de plusieurs régions du cerveau de mammifères (Corti et al., 2007, Uchida et al., 2000). De même, la protéine de liaison à l'ADN Mushahi-1, le facteur de transcription Sox1 ou le carbohydrate LeX/ssca-1 ont été décrits comme étant des marqueurs de NSC.

Néanmoins, le marqueur le plus utilisé pour identifier les NSC est la nestine, une protéine appartenant à la classe VI des filaments intermédiaires (Lendahl et al., 1990). Elle est fortement exprimée dans les cellules souches multipotentes du neuroépithélium en développement. Au cours de la différenciation, l'expression de la nestine est inhibée et cette protéine est progressivement remplacée par des filaments intermédiaires spécifiques des cellules différenciées, comme la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, classe III) pour les astrocytes ou les neurofilaments (classe IV) pour les neurones (Frederiksen and McKay, 1988).

Si l'utilisation de ces différents marqueurs permet d'enrichir par tri une population cellulaire hétérogène en NSC, il n'existe pas, pour l'instant, un ensemble de marqueurs permettant de discriminer NSC-progéniteurs et cellules différenciées. Ainsi, l'identification formelle de NSC requiert toujours la démonstration fonctionnelle de ses deux propriétés fondamentales que sont l'auto-renouvellement et la capacité de multipotence. Ces deux caractéristiques majeures ont d'ailleurs permis la mise en place d'outils, *in vitro*, tels que les dilutions limites ou les tests de formation de colonies, permettant d'obtenir une estimation du nombre de cellules souches dans une population cellulaire.

#### D. Cellules souches cancéreuses

Comme les tissus sains, les tumeurs sont le plus souvent composées d'une population hétérogène de cellules différant au niveau morphologique, tumorogénique, de l'expression de marqueurs et de la capacité de prolifération. Cette hétérogénéité peut être expliquée par des différences génétiques, au niveau du microenvironnement ainsi qu'au niveau des stades de différenciation des cellules. Cependant, l'hypothèse actuelle, au vu de l'organisation hiérarchique des tumeurs, est plutôt qu'il existerait des cellules souches cancéreuses (CSC) au sein de ces populations (Vermeulen et al., 2008). Ces CSC seraient responsables de la croissance et de la dispersion de la tumeur (Clarke and Fuller, 2006).

Actuellement, une controverse existe sur le fait de savoir si ces CSC proviennent de cellules souches normales qui se seraient transformées (besoin de moins de mutations, mais les cellules souches sont une population rare au sein d'un organisme) ou de cellules cancéreuses qui se seraient dédifférenciées (Vermeulen et al., 2008). Dans le cas de la première hypothèse, les CSC pourraient être considérées comme les « cellules initiatrices de tumeurs ».

Cependant, toutes les tumeurs ne semblent pas suivre le modèle proposé par la présence de CSC. En effet, certaines tumeurs présentent peu d'hétérogénéité. Elles semblent donc suivre plutôt un modèle d'évolution clonale ou modèle stochastique, dans lequel une population de cellules prolifératives donne naissance à l'ensemble de la tumeur (Visvader and Lindeman, 2008). Néanmoins, les deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs. En effet, des CSC peuvent subir une évolution clonale et devenir plus agressives suite à des mutations ou à des modifications épigénétiques. Ce phénomène a été décrit dans le cadre des leucémies (Barabe et al., 2007) et peut être également mis en évidence dans le cas des transplantations en série dans des animaux, qui génèrent des tumeurs de plus en plus agressives (Clark et al., 2000) (Figure 9).



**Figure 9: Modèles pour expliquer l'hétérogénéité des tumeurs.** *a)* Dans le modèle de l'évolution clonale, toutes les cellules différenciées présentent la même capacité tumorogénique. b) Dans le modèle des cellules souches cancéreuses, seulement les CSC ont la capacité de générer des tumeurs. c) Mélange des deux modèles. Au départ, la croissance tumorale est liée à une cellule souche cancéreuse (CSC1). Au cours de la progression tumorale, une deuxième CSC (CSC2), issue d'une évolution clonale de la première, mais présentant de nouvelles mutations ou modifications génétiques la rendant plus agressive, va diriger la progression tumorale. D'après Visvader et al. 2008.

1- Historique et définition des CSC

Les cellules souches cancéreuses ont été définies, par analogie avec les cellules souches normales, par le fait qu'elles sont capables d'auto-renouvellement et qu'elles peuvent générer toutes les cellules différenciées retrouvées au sein de la tumeur (Clarke et al., 2006). Pratiquement, les CSC sont mises en évidence par le fait qu'elles peuvent générer des tumeurs identiques à celles dont elles sont issues dans des souris immunodéprimées. De plus, afin de mettre en évidence la capacité d'auto-renouvellement, la tumeur xénotransplantée doit pouvoir subir des transplantations en série dans des animaux immunodéprimés.

Les CSC furent mises en évidence pour la première fois dans la leucémie myéloïde aiguë (Lapidot et al., 1994). Elles furent décrites comme une population cellulaire rare (0,01-1% de la population totale), pouvant induire des leucémies après transplantation en série dans des souris immunodéficientes.

Les CSC ont été par la suite décrites dans diverses tumeurs solides. Dans les tumeurs du sein, une population CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/low</sup> enrichie en CSC a été identifiée par le groupe de Clarke (Al-Hajj et al., 2003). En outre, elles ont été décrites dans les tumeurs du cerveau telles que le glioblastome multiforme (GBM) (Singh et al., 2004), le méduloblastome et l'épendynome (Taylor et al., 2005), ainsi que dans des tumeurs colorectales (O'Brien et al., 2007), pancréatiques (Hermann et al., 2007), ovariennes (Szotek et al., 2006), du foie (Suetsugu et al., 2006), de la prostate (Patrawala et al., 2006) du poumon (Eramo et al., 2008) et dans les mélanomes (Schatton et al., 2008).

#### 2- Mise en évidence de la présence de cellules souches cancéreuses dans les GBM

Les gliomes étaient considérés comme dérivant d'une cellule différenciée (astrocyte ou cellule gliale). En effet, l'infection d'oncogènes (K-ras et Akt ou PDGF) dans des cellules gliales matures par des rétrovirus suffit à induire la formation de GBM (Holland, 2001). Cependant, le fait que ces tumeurs présentent une organisation hiérarchique et un mélange de marqueurs nerveux et gliaux laisse plutôt supposer la présence de cellules souches.

Dans les GBM, les CSC ont été mises en évidence sur la base du marqueur CD133 (ou prominine1) par le groupe de Dirks (Singh et al., 2004). Ces cellules sont capables de former des neurosphères quand elles sont cultivées en milieu défini (Cf. Matériels et Méthodes), elles sont multipotentes, i.e. capables de donner naissance à des cellules neurales et gliales, capables d'auto-renouvellement et bien sûr sont capables de former des tumeurs quand elles sont injectées dans des animaux immunodéprimés. En effet, 100 cellules cancéreuses CD133<sup>+</sup> sont suffisantes pour former une tumeur dans une souris immunodéprimée (Singh et al., 2004).

De plus, différents groupes ont montré que ces cellules cancéreuses CD133<sup>+</sup> présentaient une résistance accrue aux traitements classiques des GBM et seraient responsables de la résurgence des tumeurs. En effet, après irradiation, une augmentation du nombre de cellules CD133<sup>+</sup> a été mise en évidence. Cela proviendrait du fait que ces cellules présentent une meilleure réparation de l'ADN : une activation accrue des kinases checkpoint (phosphorylation de Chk1 et 2), corrélée avec une réparation plus efficace de

l'ADN. Ces mécanismes expliquent la radiorésistance des cellules CD133<sup>+</sup> (Bao et al., 2006). De même, ces cellules cancéreuses CD133<sup>+</sup> sont résistantes à la chimiothérapie. Une analyse génétique de ces cellules montre qu'elles surexpriment la MGMT (O<sup>6</sup>-méthylguanine-méthyltransférase), une protéine réparant l'ADN, marqueur de mauvaise réponse au traitement par le Témozolomide quand le gène est hypométhylé ainsi que des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-xl ou la survivine (Liu et al., 2006).

Néanmoins, le rôle physiologique et pathologique de la protéine CD133 n'est pas connu actuellement. En outre, plusieurs équipes ont montré que des populations n'exprimant pas le marqueur CD133 (ou CD133<sup>-</sup>) étaient également capables d'autorenouvellement, de multipotence et d'initier la formation de tumeurs dans des animaux immunodéprimés (Wang et al., 2008, Ogden et al., 2008, Kelly et al., 2007). De plus, il a été montré que ce marqueur CD133 était un gène cible de HIF (Hypoxia-Inductible Factor) et qu'après passage en hypoxie, la proportion de cellules CD133<sup>+</sup> était fortement augmentée (Matsumoto et al., 2009). De même ce marqueur est également augmenté par un dysfonctionnement chimique ou génétique de la mitochondrie (Griguer et al., 2008). Une controverse existe donc sur le fait de savoir si le CD133 est un bon marqueur pour les cellules souches cancéreuses dans les tumeurs du cerveau.

La nestine, qui est un marqueur de NSC, peut également être utilisé comme marqueur de CSC. En effet, le groupe de Dahlstrand a montré qu'un niveau d'expression élevé de la nestine était corrélé avec un grade de malignité fort des tumeurs du cerveau (i.e. GBM) (Dahlstrand et al., 1992). De ce fait, l'expression de la nestine peut être associée avec le statut dédifférencié des cellules tumorales et l'augmentation de la malignité des tumeurs.

Le marqueur CD15, aussi connu sous le nom de SSEA1 ou Lewis X est également un marqueur de CSC (Son et al., 2009). Cependant, tout comme le CD133, ce marqueur est controversé car certaines équipes mettent en évidence que même s'il est présent dans les neurosphères primaires, son expression diminue au fur et à mesure des passages des neurosphères (Patru et al., 2010).

Une autre caractéristique des CSC est leur capacité d'expulser des produits chimiques le plus souvent lipophiles, via des transporteurs membranaires (MultiDrug Resistance proteins). Ainsi, quand les cellules cancéreuses sont cultivées avec du Hoechst 33342, une partie de cette population, non marquée, peut être isolée sur le fait qu'elle rejette cette drogue. Cette population (0,15 à 1,2% de la population totale) présente des caractéristiques de CSC : formation de neurosphères *in vitro* et formation de tumeurs après injection dans des souris immunodéprimées (Harris et al., 2008). Cependant, il a également été montré, notamment dans le cancer du sein, que les CSC n'étaient pas retrouvées dans la fraction excluant le Hoechst 33342 (Clarke et al., 2006). De plus, le fait que ce marquage puisse présenter une toxicité rend plus difficile l'interprétation des expériences de validation sur les populations isolées.

Un autre moyen de déterminer la présence de CSC dans une population est la formation de neurosphères en milieu défini (sans sérum, avec les facteurs de croissance EGF et bFGF) (Galli et al., 2004), pour conserver les caractéristiques de la tumeur (Lee et al., 2006). En effet si une population cancéreuse est capable de former des neurosphères sur le long terme (auto-renouvellement) en conservant l'aptitude à se différencier en neurones et cellules gliales à chaque passage (multipotence), cette population contient des CSC (Cheng et al., 2009). Cependant, cette technique ne permet de déterminer la présence de CSC que rétrospectivement et ne permet pas d'isoler ces cellules.

A l'heure actuelle, la technique la plus reconnue pour déterminer la présence de CSC dans une population est la transplantation en série des cellules dans des animaux immunodéprimés (Cheng et al., 2009). Mais cette technique présente les mêmes inconvénients que celle de formation de neurosphères.

Finalement, même si le CD133 ne semble pas être un bon marqueur de CSC, il serait un facteur pronostique pour des GBM. En effet, Zeppernick et al. ont analysé l'expression du CD133 dans 95 gliomes par immunohistochimie et montré qu'elle était corrélée avec la survie du patient, indépendamment du grade du gliome ou de l'âge du patient (Zeppernick et al., 2008). De plus, une analyse du profil génétique de 30 GBM issus de patients ayant subi une chimiothérapie a montré qu'une faible survie de ces patients était associée à l'expression de gènes dits « HOX », contenant le CD133 (Murat et al., 2008). 3- Voies de signalisation et rôle de la niche

De nombreuses voies de signalisation actives dans les NSC le sont également dans les cellules tumorales et en particulier dans les CSC (Cf. I-C).

Notch-1 et ses ligands sont surexprimés dans de nombreux gliomes et lignées cellulaires de gliome (Purow et al., 2005, Kanamori et al., 2007). De façon intéressante, des données suggèrent que cette voie de signalisation favorise la formation de cellules souches cancéreuses dans le gliome (Shih and Holland, 2006a). De plus, une activation constitutive de Notch dans des lignées cellulaires de gliome augmente la prolifération et accentue la formation de neurosphères en milieu défini (Zhang et al., 2008).

La voie Wnt est dérégulée dans de nombreux cancers, notamment dans le côlon (van de Wetering et al., 2002), la peau (Gat et al. 1998) ou encore le sang (Jamieson et al., 2004). De plus, un des membre de la famille Wnt, i.e. Wnt5a, a été montré comme étant surexprimé dans des gliomes humains et une extinction de son expression réduit considérablement la prolifération de ces cellules en culture (Yu et al., 2007b).

La voie de signalisation Sonic Hedgehog est également dérégulée dans les méduloblastomes et les gliomes. En effet, le groupe de Ruiz i Altaba a montré qu'elle est active dans les gliomes (expression de Gli1, Shh et Ptc1) et corrélée avec le grade de la tumeur. En outre, une extinction de Gli1 dans des cellules de gliome induit une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose de ces cellules (Clement et al., 2007).

En ce qui concerne les BMP, le groupe de Piccirillo a montré que les cellules de GBM humaines expriment non seulement les BMP, mais également leurs récepteurs. Ce groupe a très élégamment mis en évidence qu'après traitement avec des BMP, la prolifération des cellules diminue et les CSC commencent à se différencier en cellules ayant une morphologie proche de celles des astrocytes. De plus, ces cellules traitées ne sont plus capables de former des tumeurs après transplantation en série dans des animaux immunodéprimés (Piccirillo and Vescovi, 2006). Cette étude suggère un nouvel angle de traitement pour les GBM qui serait de forcer les CSC à entrer en différenciation, ce qui permettrait, d'une part, de réduire la prolifération tumorale et d'autre part, de diminuer la résistance à l'apoptose de ces cellules, induite par la chimio et la radiothérapie.

Enfin, les neurosphères de CSC, tout comme celles de NSC, expriment l'oncogène Bmi-1, un répresseur de transcription nécessaire pour la prolifération des NSC *in vivo*. Il a été montré que les populations cancéreuses déficientes en Bmi-1 ont moins de cellules positives pour la nestine, ce qui suggère qu'elles ont moins de CSC (Bruggeman et al., 2007).

Les CSC expriment également les facteurs de transcription Oct4-Sox2 et Nanog. Oct4 étant ré-exprimé dans les cancers (avec une fréquence variable), il a été suggéré que son expression est restaurée par le processus de transformation (Gidekel et al., 2003). De plus, son promoteur contient une séquence reconnue par HIF-2 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor) et le groupe de Covello a montré que l'expression de Oct4 est induite par HIF-2 $\alpha$  en hypoxie (Covello et al., 2006). Ces données mettent en évidence l'importance de Oct4 dans la tumorogénèse et par voie de conséquence, celle de Sox2 et de Nanog.

Un autre facteur de transcription important pour la gliomagénèse serait Olig2. En effet, ce dernier est un facteur de transcription exprimé presque exclusivement dans le SNC. Au cours du développement du cerveau, Olig2 est exprimé dans les progéniteurs qui donneront des oligodendrocytes (Li et al., 2009b). Des analyses de tissus cancéreux mettent en évidence que ce facteur de transcription est présent dans presque tous les astrocytomes, y compris les GBM et qu'il est nécessaire pour l'initiation tumorale (Ligon et al., 2007).

Tout comme les NSC, les CSC sont dépendantes des facteurs de croissance EGF et bFGF *in vitro*. Elles expriment également le PDGF-A et B et leurs récepteurs, ce qui laisse suggérer l'importance d'une boucle de régulation autocrine/paracrine pour la croissance des GBM (Shih and Holland, 2006b).

La niche semble donc tout aussi importante pour les CSC qu'elle l'est pour les NSC (Calabrese et al., 2007). Il reste cependant à déterminer si les CSC proviennent de cellules souches normales ayant acquis des mutations leurs permettant d'échapper au contrôle de la niche ou si ce sont des signaux aberrants de la niche qui entraînent une prolifération anormale des cellules souches et la tumorigénèse (Figure 10).


**Figure 10 : Interactions entre les CSC et leur niche.** *a) Niche normale. b) Transformation d'une cellule souche entraînant la prolifération de la niche. c) Transformation de la niche entraînant une prolifération anormale des cellules souches et leur tumorogénèse. d) La niche s'adapte aux CSC et recrute des cellules qui ne devraient pas être présentes. D'après Visvader et al. 2008.* 

A l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus pour définir les CSC de GBM. L'absence de marqueurs de CSC rend impossible un tri a priori de ces cellules et les seules caractéristiques reconnues qui sont la formation de neurosphères et l'induction de tumeurs dans des animaux immunodéprimés ne permettent que de valider le fait qu'il existe des CSC dans une population cellulaire. De plus, au sein d'une neurosphère coexistent des cellules à différents stades de différenciation, ce qui ne permet pas de travailler sur une population « pure » de CSC mais seulement sur une population enrichie en CSC.

### **DEUXIEME PARTIE**

## DEVELOPPEMENT TUMORAL : PRESENCE DE STRESS

#### Deuxième partie : Développement tumoral : présence de stress

#### A. Prolifération anarchique et résistance à l'apoptose

Les CSC ont de nombreux points communs avec les NSC. Par exemple, ces deux types cellulaires possèdent une capacité d'auto-renouvellement et de différenciation. Cependant, alors que ces mécanismes sont hautement contrôlés dans le cas des NSC, ils sont totalement dérégulés chez les CSC.

Les voies de survie (ex : Shh, Notch, Wnt, des BMP,...) qui sont médiées par des cytokines, des hormones ou des facteurs de croissance (notamment produits par la niche (ex : EGF, bFGF, PDGF)) sont très souvent dérégulées dans les cellules cancéreuses, à cause d'activation d'oncogènes ou de perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs. Ceci induit une prolifération anormale de ces cellules (Yao et al., 2009) via l'activation de voies de signalisation comme Ras ou PI3K/Akt (Phosphoinositol-3 kinase). Ainsi, la kinase Akt est trouvée suractivée dans 70% des GBM et la voie Ras est augmentée dans presque tous les GBM (Koul, 2008).

De plus, des mutations sur PTEN (Phosphatase and tensing homolog on chromosome 10), un gène suppresseur de tumeur, sont souvent retrouvées dans les gliomes (30 à 40%). Cette inactivation de PTEN entraîne une absence de régulation négative des voies de signalisation JNK (c-Jun N-terminal kinase) et PI3K, provoquant prolifération et survie cellulaire (Navis et al., 2010).

Outre l'activation anormale des voies de survie, les cellules cancéreuses présentent également une résistance à l'apoptose, résistance encore accrue dans le cas des CSC.

L'apoptose joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et cellulaire tout au long de la vie d'un organisme (Vaux and Korsmeyer, 1999). Elle permet l'élimination des cellules superflues ou endommagées et est souvent déficiente dans les cellules cancéreuses (phénomène d'échappement tumoral).

Au cours de l'apoptose, les cellules subissent des changements morphologiques importants. La membrane plasmique se désorganise ce qui entraîne le détachement de la cellule apoptotique, la chromatine se condense, l'ADN s'hydrolyse et la cellule finit par se fragmenter en corps apoptotiques qui seront rapidement phagocytés par les cellules voisines ou les macrophages. Différentes familles protéiques sont importantes pour l'apoptose et je m'intéresserai plus particulièrement, par la suite, aux protéines de la famille Bcl-2, qui ont un rôle déclencheur dans l'apoptose.

1- Les protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 peuvent se diviser en protéines anti- ou proapoptotiques. Les molécules anti-apoptotiques de la famille BCL2 contiennent quatre domaines appelés BH (pour domaine d'homologie à Bcl-2) (BH1 à BH4) correspondant à des hélices alpha et essentiels aux fonctions anti-apoptotiques de Bcl-2. Le domaine BH4, spécifique des molécules anti-apoptotiques, n'est pas retrouvé dans les molécules pro-apoptotiques. Les protéines pro-apoptotiques peuvent se diviser en deux groupes en fonction du nombre de domaines BH qu'elles possèdent. Les protéines Bax et Bak contiennent les domaines BH 1-3 et sont connues comme étant des protéines proapoptotiques à multidomaines, alors que les autres protéines pro-apoptotiques (Bad, Puma, Noxa, Bid, Bim, Harakiri, Bik,...) ne contiennent que le domaines BH3 et sont donc connues sous le nom protéines à BH3 seul (Figure11). Ces protéines à BH3-seul sont des initiateurs de la mort cellulaire et peuvent être induites par différents signaux apoptotiques. Par exemple, suite à des dommages à l'ADN, p53 active la transcription de Noxa et Puma. Noxa est également un gène cible de HIF-1α et de E2F1 (Ploner et al., 2008). De même, après une carence nutritive, Bim va être relâché par le cytosquelette (chaîne légère de la dynéine) et pourra activer l'apoptose (Verma et al., 2006). Bad (Bcl-2 Associated Death promoter) est inactivé après phosphorylation par des kinases de survie, telles que Akt (Zha et al., 1996). En ce qui concerne Bid, il est exprimé constitutivement mais sous forme inactive dans le cytosol. Après un stimulus apoptotique, il est clivé par la caspase 8 en forme p15-tBid ou par le granzyme B en forme p13-tBid. Ces clivages en Nterminal induisent le changement de conformation de Bid qui pourra aller activer respectivement Bak ou Bax (Cartron et al., 2003). Enfin, les protéines à domaine BH3seul n'agissent pas toutes de la même façon sur les protéines pro-apoptotiques. Puma, Bid et Bim peuvent en effet, activer directement Bax et Bak, alors que Noxa et Bad ne sont capables que de dissocier le complexe Bax-Bcl-xl, ce qui a pour effet de libérer Bax en conformation active (Moreau et al., 2003). Il faut également noter que chaque protéine à BH3-seul va lier préférentiellement une protéine anti-apoptotique. Ainsi, Bad se liera sélectivement à Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-w, Noxa à Mcl-1 et Bim, Bid et Puma à tous indifféremment (Brunelle and Letai, 2009).



**Figure 11: Les protéines de la famille Bcl-2.** Les protéines anti-apoptotiques présentent des domaines BH1-4, les pro-apoptotiques à multidomaines possèdent les domaines BH1-3, enfin comme leur nom l'indique, les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3-seul ne possèdent que le domaine BH3. D'après Cory et al. 2002

2- Généralités sur l'apoptose

Classiquement, deux voies apoptotiques peuvent être définies : la voie mitochondriale de l'apoptose (intrinsèque) et la voie des récepteurs à domaine de mort (extrinsèque).

La voie extrinsèque est déclenchée par l'activation des récepteurs à domaine de mort présents sur la membrane plasmique. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) et les plus étudiés sont les récepteurs au TNF (TNFR), à Fas ligand (CD95/Fas, Apo1) et les récepteurs TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand, DR4 et DR5). L'activation de ces récepteurs provoque le recrutement des protéines adaptatrices FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) et TRADD (TRAIL Receptor Associated protein with Death Domain) via leur domaine de mort mutuel. Ces protéines adaptatrices possèdent également un domaine DED (Death Effector Domain), qui peut lier et activer les caspases 8 et 10 en formant le complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex). La caspase 8, une fois activée clive la caspase 3, caspase effectrice qui va déclencher l'apoptose (Tan and White, 2008). Le signal de mort peut être ensuite amplifié par la voie mitochondriale, via le clivage de Bid en tBid par la caspase 8 (Figure 12).



**Figure 12: La voie extrinsèque de l'apoptose.** Suite à l'activation des récepteurs à domaine de mort, il y a formation d'une structure appelée DISC, qui va médier l'apoptose en activant les caspases effectrices. Il y a également clivage de Bid, entraînant l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. D'après Igney and Krammer, 2002.

La voie intrinsèque de l'apoptose est activée par différents stimuli tels que des dommages cellulaires induits par les irradiations ou les agents cytotoxiques mais aussi l'hypoxie, des dommages à l'ADN ou une carence en facteurs de croissance. Une des fonctions de p53 est de reconnaître les dommages à l'ADN, de transmettre le signal et si besoin, d'induire l'apoptose. En conditions normales, Bax est en conformation inactive dans le cytoplasme (en monomère ou en hétérodimère avec une protéine anti-apoptotique), alors que Bak est présent dans la membrane mitochondriale. Après un stimulus apoptotique, les protéines à BH3-seul viennent activer Bax et Bak (activation directe, i.e. sans nécessité de liaison avec un anti-apoptotique, pour Puma, Bid et Bim, ou rupture du complexe Bax-protéine anti-apoptotique pour toutes les protéines à BH3-seul). L'activation de Bax et Bak induit leur changement de conformation et la migration de Bax à la mitochondrie (Hsu et al., 1997). Bax et Bak s'insèrent dans la membrane

externe de la mitochondrie, s'oligomérisent et provoquent une perméabilisation de cette membrane (ou MOMP pour Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization), conduisant au relargage dans le cytosol de protéines apoptogéniques (cytochrome c, Smac/Diablo et HtrA2/Omi) (Wang, 2001). Ces protéines vont activer les caspases effectrices via la formation d'un apoptosome et l'inhibition des protéines IAP (Inhibitors of Apoptosis) et entraîner le clivage de leurs cibles (fission mitochondriale, condensation et fragmentation de l'ADN) (Figure13).



**Figure 13: Voie mitochondriale de l'apoptose.** Après un stimulus apoptotique, les protéines à domaine BH3-seul vont « activer » Bax, qui migre à la mitochondrie et permet entre autre le relargage de cytochrome c. Ceci entraîne l'activation des caspases effectrices et le clivage de leurs cibles.

L'apoptose peut également être déclenchée suite à une accumulation de protéines anormales dans le réticulum endoplasmique (RE), induite par l'hypoxie, un stress oxydatif ou une carence nutritive (fréquents au niveau des tumeurs). La voie dite de l'UPR (Unfolded Protein Response) est alors activée, via Grp78 (ou BiP) et ses senseurs (IRE1, PERK et ATF6) et du calcium est relargué dans le cytosol par le RE. Cette activation entraîne une diminution de la traduction des ARN<sub>m</sub>, notamment avec la phosphorylation de eIF2- $\alpha$  par PERK et dans le cas d'un stress prolongé ou important une mort cellulaire encore mal caractérisée (Rutkowski and Hegde, 2010). Dans les gliomes, la protéine Grp78 a été montrée comme étant surexprimée, ce qui augmente le niveau de stress « supportable » par le RE avant le déclenchement de l'apoptose, puisque plus de Grp78 est disponible pour lier les protéines non conformes (Pyrko et al., 2007).

3- Mécanismes de résistance à l'apoptose des CSC

L'activation des voies d'apoptose est le mécanisme d'action principal de la radio et chimiothérapie et une surexpression des protéines anti-apoptotiques dans les cellules cancéreuses entraîne une résistance à ces deux traitements et est nécessaire à la progression tumorale (Ziegler et al., 2008). De plus, il semble que les CSC présentent une résistance accrue à l'apoptose par rapport aux cellules de la masse tumorale (Fulda and Pervaiz, 2010).

Globalement, la résistance à l'apoptose peut être due à n'importe quelle dérégulation des voies apoptotiques : perte de l'expression de protéines à BH3-seul, de l'expression de Bax ou Bak, surexpression de protéines anti-apoptotiques, des protéines IAP, dysfonctionnement des récepteurs à domaines de mort,...

Dans le gliome, un niveau d'expression élevé de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 a été corrélé avec la résistance à l'ABT-737, un inhibiteur de Bcl-2 (Tagscherer et al., 2008). De plus, une surexpression des protéines Bcl-2 et Bcl-xl est retrouvée dans les cellules CD133<sup>+</sup> (Fulda and Pervaiz, 2010). Les protéines IAP sont également surexprimées dans les gliomes, notamment dans ceux de haut grade et semblent être des marqueurs de mauvais pronostique pour les patients (Ziegler et al., 2008).

La voie de signalisation p53 est composée d'un réseau de gènes et de protéines qui gèrent la réponse cellulaire aux stress, notamment aux dommages à l'ADN. La perte de p53, retrouvée dans de nombreux cancers (plus de 50% des cancers et environ dans 35% des GBM), induit de l'instabilité génomique, une perte de régulation du cycle cellulaire et une résistance à l'apoptose induite par la chimio et la radiothérapie (Tan and White, 2008). L'inactivation de p53 dans les gliomes peut également être médiée par l'amplification de MDM2 (retrouvée dans 14% des GBM), inhibiteur direct de p53 (Van Meir et al., 2010).

Le groupe de Clarke a récemment montré, dans le cancer du sein, que les CSC forment moins de ROS (Reactive Oxygen Species) après irradiation, et que ceci est associé à une augmentation de l'expression de protéines dégradant les ROS. Or, les ROS sont des médiateurs importants de la mort cellulaire induite par les irradiations. De plus, ce même groupe a montré que si l'on inhibe le système de dégradation des ROS dans les CSC de sein, ces cellules deviennent moins radiorésistantes (Diehn et al., 2009).

Enfin, la résistance peut être également due au fait que les cellules cancéreuses possèdent des transporteurs membranaires expulsant les drogues (MDR proteins) ainsi qu'une activation constitutive des voies de réparations de l'ADN. En effet, les cellules rejetant le Hoechst 33342 (Cf. partie I-D-2), présentent une surexpression de BCRP1, une protéine appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) (Liu et al., 2006). En outre, Bao et al., ont montré que les cellules CD133<sup>+</sup> présentaient une réparation de l'ADN plus rapide que le reste des cellules de la tumeur (visible par essai comète), grâce une activation plus importante au niveau des kinases des points de controles cdk (Bao et al., 2006). Ils ont également montré que cette radiorésistance serait due à la surexpression de SirT1 (silencing information regulator), un membre de la famille des Sirtuin. SirT1 est une histone désacétylase dépendante de NAD (HDAC), et un médiateur essentiel de la survie cellulaire après restriction calorique. SirT1 est retrouvée surexprimée dans les cellules CD133<sup>+</sup> et après extinction de cette protéine, ces cellules perdent, en partie, leur radiorésistance (Chang et al., 2009). Enfin la radiorésistance serait accrue dans les populations positives pour la nestine (Kang et al., 2008).

Le caractère souche des CSC augmente donc leur capacité de résistance à l'apoptose. Comme décrit précédemment (Cf. partie I-D-3), essayer de différencier ces cellules pour induire l'apoptose, notamment par les BMP pourrait être une nouvelle approche thérapeutique (Piccirillo and Vescovi, 2006).

#### B. Présence d'un stress hypoxique important au sein des GBM

#### 1- Morphologie de la tumeur : cœur nécrotique

Les cellules cancéreuses proliférant de façon incontrôlée, la tumeur grossit rapidement et certaines cellules se retrouvent au-delà de la limite de diffusion de l'oxygène dans les tissus (qui est d'environ 100  $\mu$ m). Certaines parties de la tumeur deviennent donc hypoxiques. La première réponse cellulaire à l'hypoxie, médiée par les protéines HIF (Hypoxia-Inducible Factors), va être la vascularisation de la tumeur en attirant des vaisseaux sanguins. Cependant, la croissance tumorale est telle que la revascularisation est souvent rapidement dépassée, ce qui crée des fluctuations du niveau d'O<sub>2</sub> au sein de la tumeur, une caractéristique retrouvée dans de nombreuses tumeurs solides. Alors que la pression partielle en O<sub>2</sub> est d'environ 7% (53 mmHg) dans les tissus sains, elle varie de 7 à moins de 1% (hypoxie sévère) d'oxygène dans les tumeurs. Cette hypoxie sévère est une autre caractéristique des tumeurs solides et se retrouve particulièrement au niveau des cœurs nécrotiques des tumeurs (Heddleston et al., 2010).

#### 2- Régulation de HIF

Les protéines HIF sont des facteurs de transcription dont la stabilité est régulée par la pression partielle en oxygène. Ils sont constitués en dimères avec une sous-unité  $\alpha$  et une sous-unité  $\beta$ . Pour la sous-unité  $\alpha$ , trois isoformes (HIF 1-3) ont été décrites et leur stabilité est régulée par la pression partielle en oxygène. HIF-1 est la mieux caractérisée des protéines HIF. Elle a un rôle de senseur de l'oxygène dans de nombreux types cellulaires. HIF-2 a une homologie d'environ 48% avec HIF-1 et son expression, contrairement à celle de HIF-1 est restreinte à des types cellulaires spécifiques (cellules endothéliales, gliales, cardiomyocytes, fibroblastes, hépatocytes,...). HIF-3 est la moins décrite des protéines HIF et son rôle dans la régulation hypoxique *in vivo* est mal connu à l'heure actuelle. Son ARN<sub>m</sub> se retrouve dans différents tissus comme par exemple les poumons, le cerveau, le cœur, les reins,... (Rankin and Giaccia, 2008).

La sous-unité  $\beta$ , aussi appelée aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ou ARNT, est exprimée constitutivement et n'est pas sous le contrôle de la pression partielle en O<sub>2</sub>. En conditions hypoxiques, la sous-unité  $\alpha$  est stabilisée, migre dans le noyau et s'hétérodimérise avec une sous-unité  $\beta$ . Ensemble, elles s'associent à des séquences particulières de l'ADN appelées HRE (Hypoxia Response Element : 5'-RCGTG-3') afin d'initier la transcription de leurs gènes cibles via le recrutement de co-activateurs : p300/CBP (Rankin and Giaccia, 2008).

En présence d'oxygène, les sous-unités  $\alpha$  sont hydroxylées sur des résidus prolines, au niveau de leur domaine de dégradation oxygène-dépendant, par des prolylhydroxylases (PHD). Cette hydroxylation entraîne la reconnaissance de la sous-unité  $\alpha$ par la protéine VHL (Von Hippel Lindau), qui recrute la ligase ubiquitine-E3, induisant la dégradation de HIF-1 $\alpha$  par le protéasome. Les prolyl-hydroxylases de HIF (PHD 1-3) sont des enzymes sensibles à l'oxygène, inactives en conditions hypoxiques (Semenza, 2010).

Un deuxième niveau de contrôle des sous-unités  $\alpha$  se situe au niveau du domaine de transactivation de cette sous unité, où un résidu asparagine oxygène-sensible peut être hydroxylé par des facteurs inhibant HIF (FIH), facteurs également inhibés en conditions hypoxiques (Hill et al., 2009). Cette hydroxylation bloque la liaison de p300/CBP, des co-activateurs de HIF, et empêche donc l'activation de ce dernier.

Ces deux contrôles sont inactivés par l'hypoxie, d'une part car l'oxygène, qui est le substrat des hydroxylases, diminue et d'autre part via la génération de ROS (Reactive Oxygen Species), qui peut oxyder le Fe(II), présents dans les centres catalytiques des hydroxylases (Semenza, 2010). Cependant, la sensibilité à l'hypoxie de PHD2 et FIH-1 n'est pas la même. En effet, une faible hypoxie (1 à 4% d'O<sub>2</sub>) suffit à inhiber PHD2 alors que les protéines FIH-1 ne sont inhibées que quand l'hypoxie est forte (moins de 1% de  $O_2$ ) (Figure 14). Ceci entraîne que certains gènes contrôlés par HIF vont être exprimés dès une faible hypoxie (VEGF, glucose transporter-1, anhydrase carbonique 9,...), alors que d'autres, ayant besoin de la partie régulée par FIH pour être transcrits, ne le seront pas (cathepsine D, glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase,...) (Hill et al., 2009).



Figure 14 : Régulation de l'activation de HIF-1. D'après Oliver et al., 2009.

Enfin, il a été montré que la perte ou l'inactivation de p53, qui est un évènement précoce dans la genèse des gliomes, stabilise HIF-1α (Kaur et al., 2005).

3- Rôle de HIF dans la prolifération tumorale

HIF est capable de promouvoir des étapes-clés de la croissance tumorale via ses gènes cibles, impliqués dans l'angiogénèse, le métabolisme, la prolifération ou la métastase (Figure 15). Par la suite, je développerai plus particulièrement le rôle de l'hypoxie dans le métabolisme des cellules cancéreuses.



**Figure 15 : Liste des gènes cibles de HIF impliqués dans des étapes essentielles de la tumorogénèse**. *D'après Rankin and Giaccia, 2008*.

HIF-1 augmente la transcription de Glut1 et Glut3, des transporteurs de glucose nécessaires à l'entrée du glucose dans la cellule, d'enzymes de la glycolyse telles que les hexokinases HK1 et 2, de la pyruvate kinase PKM2 ainsi que d'enzymes impliquées dans la dégradation du pyruvate comme la lactate déshydrogénase A (LDHA). Toutes ces enzymes contribuent à ce qui est couramment appelé l'effet Warburg (métabolisme glycolytique des cellules cancéreuses, Cf. II-C-1). En outre, HIF-1 induit l'expression du gène codant pour la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), enzyme qui inhibe la pyruvate déshydrogénase (PDH) qui catalyse la transformation : pyruvate — AcétylCoA en la phosphorylant et qui, de ce fait, inhibe l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs (Figure 16). Enfin, HIF-1 régule aussi l'expression du monocarboxylate transporteur 4 (MCT4), qui transporte le lactate en dehors de la cellule (Semenza, 2010).



**Figure 16 : Métabolisme du glucose.** Les gènes régulés par HIF-1 (en jaune) ont un rôle essentiel dans la conversion du glucose extracellulaire en lactate extracellulaire et dans le blocage de l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs. D'après Semenza, 2010.

Il a également été montré que HIF régule négativement la fonction mitochondriale. Le premier mécanisme est la surexpression du gène codant pour la PDK. Ceci entraîne une diminution de la génération de réducteurs servant de « combustibles » à la chaîne respiratoire. Cette réduction génère une diminution des phosphorylations oxydatives, une diminution de la consommation globale d' $O_2$  et de la génération de ROS (Kim et al., 2006).

Un deuxième mécanisme par lequel HIF contrôle la demande d' $O_2$  est la régulation de la biogenèse mitochondriale. En effet, HIF diminue la biogenèse mitochondriale en activant MXI1, un régulateur négatif de la famille MYC, qui va inhiber l'interaction MAX-MYC. Or, le complexe MAX-MYC peut directement trans-activer le

facteur de transcription A (TFAM), qui contribue à l'expression du génome mitochondrial et aux gènes nécessaires à la réplication de l'ADN mitochondrial. La rupture de ce complexe par MXI1 entraîne une diminution de l'expression de TFAM, une diminution de la masse mitochondriale et donc de la consommation d'oxygène. Cependant, il faut noter que HIF et MYC sont connus pour coopérer au niveau de leur fonction transcriptionnelle et que MYC, en tant qu'oncogène, favorise le métabolisme glycolytique des cellules. Son rôle dans la biogenèse mitochondriale semble donc contradictoire (Denko, 2008). Le fait de diminuer la fonction mitochondriale permet aux cellules cancéreuses de diminuer la quantité de ROS, d'augmenter la quantité de substrats anaboliques et de conserver de l'O<sub>2</sub> pour d'autres rôles que celui d'accepteur final d'électron, ce qui confère aux cellules cancéreuses un avantage métabolique en hypoxie.

Une des conséquences principales du métabolisme glycolytique est l'acidification du microenvironnement de la tumeur. Un changement dans le pH du microenvironnement tumoral module l'activité des protéases qui dégradent la matrice extracellulaire et de ce fait, un taux élevé de lactate a été corrélé avec un fort risque de métastase (Brahimi-Horn et al., 2007). HIF semble donc être un marqueur de mauvais pronostic. En effet, des niveaux élevés de HIF-1 $\alpha$  ont été corrélés positivement avec la progression tumorale et avec une mauvaise survie chez des patients atteints de tumeurs cérébrales (Hill et al., 2009). En ce qui concerne HIF-2 $\alpha$ , il est exprimé de façon importante dans les cellules endothéliales normales, mais son expression est aberrante dans les gliomes comme dans d'autres cancers (Seidel et al., 2010).

#### 4- HIF et cellules souches

De nombreuses études ont montré l'importance de l'hypoxie dans le maintien des cellules souches dans les tissus sains et en particulier dans celui des NSC, par l'inhibition de la mort cellulaire (Clarke and van der Kooy, 2009). De même, l'hypoxie bloque la différenciation des NSC via la voie de signalisation Notch. En effet, sous hypoxie, HIF- $1\alpha$  est recruté sur des promoteurs normalement sous le contrôle transcriptionnel de Notch et augmente ainsi la transcription des gènes cibles de Notch (Gustafsson et al., 2005). En outre, une étude génétique sur des modèles «knock-in» pour des allèles HIF- $1\alpha$ 

remplacés par HIF-2 $\alpha$  montre que HIF-2 $\alpha$  est directement impliqué dans la transcription de Oct4, suggérant un rôle de l'hypoxie dans la surexpression de Oct4 (Covello et al., 2006).

En ce qui concerne les cellules souches cancéreuses, une publication récente met en évidence que l'hypoxie, et en particulier HIF-1α, permet l'extension d'une souspopulation de cellules positives pour le marqueur CD133 (Soeda et al., 2009). De plus, un autre groupe a montré que l'hypoxie n'augmente pas seulement la fraction de cellules  $CD133^+$ , mais augmente également le phénotype « souche » de ces cellules *in vitro*, comme la formation de neurosphères et l'expression de marqueurs de cellules souches. En effet, avec l'aide de techniques de micro-array, ils ont montré que des gènes tels que Sox2 ou Oct4 sont surexprimés en hypoxie dans des lignées de gliomes (McCord et al., 2009). Ces changements ont été observés pour des concentrations d'O2 de 5%, c'est-àdire quand seulement HIF- $2\alpha$  est stabilisé. En outre, le groupe de Rich a mis en évidence une expression d'ARN<sub>m</sub> de HIF-1 $\alpha$  et de HIF-2 $\alpha$  différentielle entre les cellules cancéreuses souches et non souches (Li et al., 2009a). En effet, HIF-1a est présent aussi bien dans les populations souches et non souches et n'est stabilisé que pour des conditions d'hypoxie plus sévères, alors que HIF-2a n'est présent que dans les CSC et est stable même quand la concentration d'O<sub>2</sub> est de 5% (faible hypoxie). Ces résultats ont été confirmés dans une publication récente mettant en évidence le rôle de la niche hypoxique dans la régulation des CSC (Seidel et al., 2010).

L'hypoxie et particulièrement HIF-2 $\alpha$ , semblent donc importants pour le maintien et la prolifération des CSC. C'est pourquoi le ciblage de protéines HIF pourrait être une bonne thérapeutique. Dans cette optique, il a été montré que dans des cellules de gliomes de rat, la surexpression de VHL entraîne la diminution d'expression de HIF-1 $\alpha$  et de VEGF, induisant une diminution de la croissance tumorale (Sun et al., 2006). De même, une étude récente montre que le FM19G11, qui inhibe l'expression et l'activité transcriptionnelle des isoformes HIF $\alpha$ , induit une diminution de l'expression de Sox2 et Oct4 dans des NSC et leur différenciation en oligodendrocytes (Moreno-Manzano et al., 2010).

#### 5- Autophagie : avantage tumoral ou cible thérapeutique ?

Les cellules sont capables de s'adapter aux stress en catabolisant leurs structures endommagées ou non nécessaires, afin de maintenir leur homéostasie, par le processus d'autophagie. L'autophagie est activée en réponse à différents stress durant la progression tumorale, comme la privation en nutriments, un stress du RE ou encore l'hypoxie (BNIP3, une protéine à BH3-seul, régulateur positif de l'autophagie est un gène cible de HIF). L'activation de l'autophagie entraîne la formation de vésicules à doubles membranes, les autophagosomes, qui séquestrent les substrats cytosoliques à dégrader. Ces autophagosomes sont ensuite fusionnés à des lysosomes pour activer leur dégradation (Dikic et al., 2010), pour revue (Glick et al., 2010).

De nombreuses publications mettent en évidence le rôle de l'autophagie dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et le fait que des déficiences dans ce mécanisme sont impliquées dans de multiples pathologies, y compris les cancers (Levine and Kroemer, 2008).

Dans le développement tumoral, l'autophagie a un rôle controversé. Dans les stades d'initiation tumorale, elle peut être considérée comme un mécanisme suppresseur de tumeur. En effet, elle peut être activée par des suppresseurs de tumeurs comme PTEN et réprimée par des oncogènes tels que PI3K ou Akt. En outre, la surexpression de Beclin1, une protéine régulant positivement l'autophagie, diminue la prolifération des cellules cancéreuses in vitro et diminue la tumorogénicité in vivo. De même, il a été montré que des souris avec une seule copie de ce gène développaient fréquemment des tumeurs spontanées (Chen and Debnath, 2010). Enfin, Bcl-2, en plus de son rôle d'inhibiteur de l'apoptose, peut interagir avec Beclin1 et inhiber l'autophagie. En plus de Beclin1, des altérations sur d'autres gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation de l'autophagie (ex : atg5) ont été retrouvées dans de nombreux cancers. Plusieurs hypothèses existent pour expliquer le lien entre autophagie et tumorogénèse. La première a été particulièrement étudiée par le groupe de White et suggère que des défauts dans l'autophagie peuvent accroître les dommages à l'ADN dans des cellules survivant à un stress nutritif. En effet, en réponse à un stress métabolique, les cellules incapables d'autophagie ont un défaut de renouvellement de leurs protéines, des dommages mitochondriaux et une quantité élevée de ROS, ce qui pourrait favoriser le développement tumoral (White and DiPaola, 2009). Une autre hypothèse serait que l'autophagie, en limitant la nécrose liée à un stress métabolique, pourrait favoriser la croissance tumorale en empêchant l'infiltration des lymphocytes sur le site de la tumeur primaire (Chen and Debnath, 2010).

Au contraire, au cours de la progression tumorale, l'autophagie est impliquée dans la survie tumorale. En effet, comme les cellules tumorales ont des besoins importants en nutriments et en oxygène, ces cellules passent régulièrement par des périodes de stress métabolique et d'hypoxie. C'est pourquoi un niveau minimal d'autophagie est indispensable à la survie dans les tumeurs établies (Chen and Debnath, 2010).

Le rôle de l'autophagie dans la progression tumorale est donc ambigü. D'un coté, l'autophagie permet aux cellules cancéreuses de supporter les stress hypoxiques, métaboliques ou liés à la thérapie. Même en cas de stress prolongé, ce mécanisme permettrait de générer des cellules cancéreuses en dormance qui seraient capables de reprendre une croissance tumorale quand les conditions redeviennent favorables. D'un autre coté, l'autophagie joue un rôle important dans la limitation des dommages en réponse à des stress et peut limiter la tumorogénèse. Sur des tumeurs établies, le blocage de l'autophagie, notamment via l'inhibition de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), qui intègre les signaux des facteurs de croissance et la quantité de nutriments présents afin de coordonner la croissance cellulaire et la prolifération, combiné avec un stress du métabolisme, pourrait permettre de limiter la croissance tumorale (White and DiPaola, 2009).

#### C. Stress métabolique

La survie d'un organisme pluricellulaire implique des systèmes de contrôle empêchant la prolifération cellulaire aberrante quand la quantité de nutriments disponibles excède les besoins de la cellule. En effet, les cellules ne prélèvent pas de nutriments dans l'environnement sans stimulation par des facteurs de croissance. Les cellules cancéreuses dépassent cette dépendance en acquérant des mutations génétiques qui altèrent le fonctionnement des récepteurs aux facteurs de croissance.

#### 1- Description de l'effet Warburg

En 1924, en cherchant à extrapoler les observations de Louis Pasteur sur la fermentation du glucose en éthanol, Otto Warburg mit en évidence que les cellules cancéreuses « fermentaient » le glucose en lactate même quand la quantité d'oxygène était suffisante pour permettre les phosphorylations oxydatives au niveau des mitochondries (Warburg, 1956). Ces observations peuvent sembler paradoxales car le catabolisme complet du glucose via les phosphorylations oxydatives maximise la quantité d'adénosine triphosphate (ATP) produite, ce qui semble essentiel à des cellules présentant un taux de prolifération aussi élevé que des cellules tumorales (Figure17).



Figure17 : Phosphorylation oxydative, glycolyse anaérobie et effet Warburg. En présence d'oxygène, les cellules saines métabolisent le glucose en pyruvate via la glycolyse, puis le pyruvate est dégradé en  $CO_2$  au niveau des mitochondries par phosphorylations oxydatives. En absence d'oxygène, le pyruvate est transformé en lactate (glycolyse anaérobique). Warburg a observé que les cellules cancéreuses transforment majoritairement le glucose en lactate, même en présence d'oxygène (glycolyse aérobique). D'après Vander Heiden et al., 2009.

Warburg émit l'hypothèse que les cellules cancéreuses réalisaient peu de phosphorylations oxydatives car elles présentaient un défaut au niveau de leurs mitochondries. Cependant, des travaux plus récents mettent en évidence que même si des mutations mitochondriales peuvent être retrouvées dans certains cancers, leur rôle dans la tumorogénèse reste mal connu (Ding et al., 2010) et elles ne permettent pas d'expliquer

correctement l'utilisation préférentielle de la glycolyse. D'autres explications telles que la diminution de substrats pour la chaîne respiratoire (surexpression de la PDK par HIF), de la biomasse mitochondriale ou encore les phénomènes hypoxiques liés à la croissance tumorale peuvent également expliquer la baisse des phosphorylations oxydatives dans les cellules cancéreuses (Moreno-Sanchez et al., 2007). De même, le glucose pourrait réguler négativement les phosphorylations oxydatives, un phénomène connu sous le nom d'effet Crabtree (Jezek et al., 2010). Enfin, les phosphorylations oxydatives génèrent des ROS, qui peuvent entraîner, en plus d'une augmentation de la prolifération cellulaire et de la migration des cellules cancéreuses, un dysfonctionnement mitochondrial (Gogvadze et al., 2010).

#### 2- Avantages de l'effet Warburg



Un des avantages majeurs de l'effet Warburg est que la dégradation du glucose fournit des intermédiaires pour les autres voies biosynthétiques de la cellule (Figure 18).

**Figure 18 : Voies de signalisation métaboliques actives dans les cellules cancéreuses.** *D'après Vander Heiden et al.*, 2009.

En effet, afin de pouvoir se diviser, une cellule doit dupliquer son génome, ses protéines et ses lipides. Pour ce faire, la cellule doit utiliser des nutriments extracellulaires comme le glucose ou la glutamine et les faire entrer dans des voies métaboliques qui les convertissent en précurseurs biosynthétiques (Deberardinis et al., 2008b).

L'effet Warburg implique que les cellules cancéreuses utilisent majoritairement un composé (le glucose), qui est le nutriment le plus abondant dans le compartiment extracellulaire. Même si la quantité d'ATP obtenue par molécule de glucose est faible, si le flux de la glycolyse est suffisamment fort, le pourcentage d'ATP produit par la glycolyse peut dépasser celui produit par les phosphorylations oxydatives (Deberardinis et al., 2008b, Vazquez et al., 2010).

La biosynthèse des nucléotides et des lipides partage trois caractéristiques. La première est qu'elles utilisent toutes deux le glucose comme source de carbone. Elles consomment également les intermédiaires du cycle de Krebs et enfin, elles ont toutes les deux besoin d'utiliser l'énergie contenue dans la forme réduite du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate). C'est pourquoi une partie du glucose va être converti en macromolécules comme l'acétylcoenzyme A (Ac-CoA) nécessaires à la synthèse des lipides, en intermédiaires glycolytiques pour les acides aminés et en riboses pour les nucléotides. Ceci permet d'expliquer le fait que les cellules de gliomes convertissent 90% du glucose et 60% de la glutamine en lactate et alanine (DeBerardinis et al., 2007). Même si la majorité du lactate et de l'alanine est sécrétée hors de la cellule, leurs synthèses entraînent la production de NADPH.

En ce qui concerne la synthèse des lipides, le métabolisme du glucose ainsi que celui de la glutamine est orchestré pour fournir Ac-CoA et NADPH, nécessaires à la synthèse des acides gras. Pour le glucose, il est d'abord converti en Ac-CoA dans la matrice mitochondriale et utilisé pour la synthèse du citrate par le cycle de Krebs. Dans les cellules cancéreuses, les ratios ATP/ADP et NADH/NAD<sup>+</sup> (Nicotinamide adénine dinucléotide) étant élevés, le citrate va donc être majoritairement sécrété dans le cytoplasme où a lieu la synthèse des lipides. Le citrate est reconverti en Ac-CoA, utilisé comme source de carbone pour l'accroissement de la chaîne aryle des lipides (Vander Heiden et al., 2009). La glutamine est aussi importante pour la synthèse des lipides car

elle fournit le carbone, sous forme d'oxalo-acétate, ce qui va permettre de maintenir la production de citrate par la mitochondrie. L'induction d'une diminution de l'activité d'une des enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras est capable d'inhiber la croissance tumorale (Hatzivassiliou et al., 2005). De façon intéressante, il a également été mis en évidence qu'Akt inhibait la  $\beta$ -oxydation (dégradation) des lipides (Deberardinis et al., 2006).

Afin de synthétiser du ribose 5-phosphate (R5P) pour la biosynthèse de nucléotides, les cellules détournent des carbones de la glycolyse (glucose-6P ou fructose-6P) vers le cycle des pentoses phosphates. Le détournement du G6P dans la voie des pentoses phosphates permet non seulement la synthèse de nucléotides, mais également d'augmenter la capacité antioxydante des cellules via la production de NADPH. Après endommagement de l'ADN ou pendant la tumorogénèse, cette voie des pentoses phosphates est importante car elle permet de répliquer et de réparer l'ADN (Tennant et al., 2009). De façon intéressante, les deux premières enzymes de cette voie de signalisation sont retrouvées surexprimées dans les cellules tumorales (Board et al., 1990).

Enfin, il semble que la glutamine soit responsable de la synthèse des acides aminés et de l'incorporation d'azote dans les bases puriques et pyrimidiques lors de la synthèse des nucléotides (DeBerardinis et al., 2007).

3- Régulation de l'effet Warburg

De nombreuses mutations modifient le contrôle du métabolisme tumoral (Vogelstein and Kinzler, 2004). Un régulateur majeur du métabolisme est la kinase phospho-inositol 3 (PI3K), qui régule le niveau de phosphatidylinositol phosphorylé (PIP3). L'activation de PI3K par les facteurs de croissance entraîne, entre autres, l'activation d'Akt et de mTOR. Cette activation est importante aussi bien pour la prolifération cellulaire que pour le métabolisme du glucose. En plus de son rôle dans la redirection des acides aminés libres vers la synthèse protéique via mTOR, cette voie de signalisation régule l'entrée du glucose dans la cellule et son utilisation. En effet, elle rend les cellules dépendantes d'un flux élevé de glucose via l'activation de l'hexokinase ou de la phosphofructokinase (Buzzai et al., 2005).

L'environnement tumoral (HIF, signaux de prolifération de la niche et activation de récepteurs à tyrosine kinase) n'est pas le seul responsable du changement métabolique des cellules cancéreuses, les oncogènes (c-Myc, H-ras, src) peuvent également induire cette modification. En particulier, c-Myc est surexprimé dans 70% des cellules tumorales et régule l'expression de plusieurs gènes du métabolisme comme la LDH (lactate déshydrogénase) ou encore des enzymes impliquées dans le métabolisme des nucléotides et des acides aminés (Jones and Thompson, 2009). De plus, les tumeurs dans lesquelles c-Myc est surexprimé sont particulièrement sensibles à une déplétion en glutamine. En effet, en absence de glutamine, une diminution rapide des intermédiaires du cycle de Krebs est observée, entraînant la mort cellulaire (Vander Heiden et al., 2009).

Enfin, des travaux récents mettent en avant le rôle des enzymes métaboliques dans la tumorogénèse. Ainsi, une analyse récente de GBM montre que 12% des tumeurs présentent une mutation sur le gène codant pour l'isocitrate déshydrogénase 1 (IDH1) (Parsons et al., 2008). De plus, il a également été montré que 70% des gliomes de bas grade présentaient une mutation sur IDH1 ou IDH2 (Yan et al., 2009). De même, des mutations sur la succinate déshydrogénase ont été retrouvées dans les gangliomes et des mutations sur la fumarate hydratase dans les leiomyomes (Thompson, 2009). D'autres protéines impliquées dans le métabolisme glycolytique sont modifiées au cours de la tumorogénèse, notamment la pyruvate kinase.

#### 4- Pyruvate kinase et effet Warburg

La pyruvate kinase est une enzyme-clé de la glycolyse. Elle catalyse, de façon irréversible, la réaction :

phospho-énol-pyruvate (ou PEP) + ADP  $\rightarrow$  pyruvate + ATP Quatre isoformes de la pyruvate kinase sont actuellement connues chez les mammifères. Les isoformes L et R, issues du gène PKLR se retrouvent respectivement dans le foie et les reins (isoforme L) ou dans les globules rouges (isoforme R). Leur ARN<sub>m</sub> varie au niveau des premiers exons, qui sont codés par des promoteurs tissus-spécifiques. Le gène PKM code pour les isoformes PKM1 et PKM2 (Noguchi et al., 1986). Ce gène contient 12 exons et les exons 9 et 10 sont épissés alternativement pour donner les deux isoformes. Cet épissage alternatif a pour conséquence une modification d'activation entre les deux isoformes : la forme M1 est active constitutivement, alors que la forme M2 possède une régulation allostérique. L'isoforme M2 est la forme embryonnaire, qui est progressivement remplacée au cours de la différenciation par la forme M1. Cependant, dans les cellules se divisant activement et notamment dans les cellules tumorales, l'isoforme M2 est ré-exprimée. C'est pourquoi son utilisation en tant que biomarqueur est actuellement à l'étude pour les cancers gastro-intestinaux (Hathurusinghe et al., 2007, Kumar et al., 2007) ainsi que pour les mélanomes (Ugurel et al., 2005).

Le gène codant pour les isoformes M se situe sur le chromosome 15 et est très conservé entre les espèces (Takenaka et al., 1991). Il est sous la régulation transcriptionnelle de ras, HIF-1, SP1 et SP3 (Mazurek et al., 2005). Récemment, l'épissage alternatif de ce gène a été montré comme étant sous la dépendance de ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP) : PTB (hnRNP I), hnRNPA1 et hnRNPA2 (David et al., 2010). En effet, la déplétion simultanée (knock-out) de ces trois protéines entraîne une augmentation de l'ARN<sub>m</sub> de M1PK de 2 à 48% de manière concomitante avec une diminution de celui de PKM2. PTB, hnRNP A1/A2 (Clower et al., 2010). Il a également été mis en évidence que ces trois protéines sont surexprimées dans les glioblastomes et sous la régulation transcriptionnelle de c-Myc (David et al., 2010).

La différence principale entre les deux isoformes M1 et M2 est liée au fait que l'isoforme M2 peut être régulée de façon allostérique. Ainsi, en présence de fructose-1,6biphosphate (FBP), l'isoforme M2 se tétramérise. En outre, comme d'autres enzymes de la glycolyse (enolase, lactate déshydrogénase, glucose-6-phosphatase), elle peut être phosphorylée sur des résidus tyrosine dans les cellules cancéreuses (Christofk et al., 2008b). Ainsi le récepteur au FGF (FGFR1) est capable de phosphoryler PKM2 sur six résidus différents même si la phosphorylation du résidu Tyr<sup>105</sup> semble être la plus importante (Hitosugi et al., 2009). Cette phosphorylation favorise le relargage de FBP et le passage de la forme tétramère à la forme dimère. De même, la L-sérine est capable d'augmenter l'affinité de l'enzyme pour le PEP et de diminuer le seuil de FBP nécessaire à sa tétramérisation. La L-alanine agit de façon opposée à la L-sérine (Mazurek et al., 2005). D'autres acides aminés comme la L-cystéine, la L-valine, ..., ainsi que les acides gras saturés sont également capables d'inhiber l'isoforme M2 de la pyruvate kinase (Mazurek et al., 2005) (Figure 19).



**Figure 19 : Représentation schématique d'un monomère de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase.** Un monomère de PKM2, avec le FBP en jaune, en vert, la séquence d'acides aminés utilisée pour synthétiser notre anticorps (situé sur l'exon spécifique de l'isoforme M2) et en bleu la tyrosine phosphorylée, importante pour la tétramérisation/dimérisation de l'enzyme (PDB 1ZJHA).

Ces propriétés de régulation allostérique font de l'isoforme M2 une enzyme essentielle à la croissance tumorale (Figure 20).

La réexpression de l'isoforme M2 par les cellules cancéreuses est nécessaire à l'effet Warburg, même si elle ne semble pas être un évènement suffisant pour transformer une cellule. Ainsi le remplacement de l'isoforme M2 par la M1 dans des lignées tumorales (MCF7, H1299,...) permet le maintien d'un métabolisme glycolytique et de la prolifération cellulaire, mais uniquement en conditions normoxiques et avec un apport de glucose conséquent. Les cellules exprimant l'isoforme M2 présentent un avantage prononcé en conditions hypoxiques. De plus, *in vivo*, les cellules exprimant l'isoforme M1, injectées en xénogreffe, ont une croissance tumorale très ralentie (Christofk et al., 2008a).



**Figure 20 : Rôle de l'isoforme M2 dans la régulation du métabolisme des cellules cancéreuses.** *HK : hexokinase, PKK : 6-phosphofructo-1-kinase, GAPDH : Glycéraldéhyde-3P-déshydrogénase, LDH : Lactate désydrogénase, PPP : voie de signalisation des pentoses phosphates. D'après Mazurek, 2010.* 

Contrairement à l'isoforme M1 (similaire à 96%) qui n'existe que sous la forme tétramérique (active), l'isoforme M2 se retrouve soit sous forme tétramérique, caractérisée par une forte affinité pour le PEP, soit sous forme dimérique (inactive, faible affinité pour le PEP). Le ratio dimère/tétramère permet donc de déterminer si le glucose va être dégradé en pyruvate puis en lactate avec production d'un ATP (forme tétramérique) ou s'il va être utilisé par des voies de synthèse indépendantes de la glycolyse (forme dimérique) (Figure 21). L'isoforme M2, de par sa régulation fine, semble donc capable de répartir les métabolites du glucose entre procédés anaboliques et cataboliques, afin de répondre aux besoins des cellules cancéreuses, se divisant rapidement (Christofk et al., 2008a).

	РК РК	РК РК РК РК
Affinité pour le PEP Activité enzymatique (concentration physiologique)	faible inactive	élevée élevée
Niveau d'ADP et de GDP	élevé	faible
Niveau d'ATP et de GTP	faible	élevé
ATP/ADP	faible	élevé
GTP/GDP Utilisation du glucose	faible voies de synthèses (nucléotides, a, phospholipidescides aminés)	élevé production d'énergie
(ATP+GTP)/(UTP+CTP)	faible	élevé

## Figure 21 : Propriétés cinétiques et conséquences métaboliques des formes dimériques et tétramériques de l'isoforme PKM2. *D'après Mazurek et al.*, 2005.

De nombreux inhibiteurs sont actuellement à l'étude afin de bloquer la régulation allostérique de l'isoforme M2. Ainsi, Spoden *et al.* ont montré que la fixation d'un peptide (appelé Aptamer 9) bloque l'enzyme dans sa conformation inactive (dimère) et diminue la prolifération cellulaire en présence d'une forte concentration de glucose (Spoden et al., 2009). En outre, une étude récente met en évidence de nouveaux activateurs de cette enzyme : les diarylsulfonamides. Leurs effets sur les cellules cancéreuses restent cependant encore à démontrer (Boxer et al., 2010).

L'isoforme M2 a également peut se transloquer dans le noyau et ainsi induire la mort des cellules, suite à différents stimuli apoptotiques comme les U.V. ou  $H_2O_2$  (Stetak et al., 2007). Enfin, cette isoforme peut interagir avec Oct4 dans le noyau et ainsi augmenter son activité transcriptionnelle (Lee et al., 2008, pour revue: Mazurek, 2010).

5- Molécules ciblant ce métabolisme particulier

Le métabolisme glycolytique des cellules cancéreuses peut être ciblé par différentes molécules (Figure 22).

Le 2-Déoxyglucose (2DG) est connu pour inhiber le métabolisme du glucose. Il est phosphorylé par les hexokinases (HK) afin de générer du 2-Déoxyglucose-phosphate, qui s'accumule dans la cellule et inhibe les HK. Pour une concentration de l'ordre du millimolaire, le 2DG induit une diminution du niveau d'ATP et la mort des cellules, surtout celles ayant des défauts mitochondriaux ou étant dans un environnement hypoxique (Maher et al., 2004). Ce composé est entré dans des programmes d'essais cliniques pour le traitement du cancer, en combinaison avec d'autres agents. Il a été notamment montré que jusqu'à 250 mg/kg, le 2DG est sans danger, et augmente l'effet de la radiothérapie chez des patients atteints de tumeurs cérébrales (Singh et al., 2005). Le 3-Bromopyruvate est également un inhibiteur des HK et il affecte aussi les mitochondries, entraînant une diminution d'ATP et la mort des cellules. Enfin, comme le montre la figure 22, de nombreux inhibiteurs sont actuellement disponibles et ciblent la glycolyse à différents niveaux (Chen et al., 2007).



**Figure 22 : Quelques drogues inhibant le métabolisme glycolytique des cellules cancéreuses.** *En bleu : les enzymes, en rouge : les drogues utilisées pour les cibler. D'après Chen et al., 2007.* 

Un autre agent intéressant est le dichloro-acétate (DCA). Cette molécule est connue pour inhiber la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK). Or cette enzyme, surexprimée en hypoxie (gène cible de HIF), inhibe la pyruvate déshydrogénase (PDH), qui catalyse la transformation de pyruvate en Ac-coA, assurant le flux de substrat vers la mitochondrie (Figure 23). Le DCA est déjà utilisé en clinique pour le traitement des maladies génétiques mitochondriales. C'est un analogue du pyruvate, il entre dans la circulation sanguine rapidement après une prise orale et a une bonne biodistribution. Cette molécule est transportée à travers toutes les membranes (y compris la barrière hématoencéphalique) par des transporteurs de monocarboxylates, qui transportent normalement le lactate, le pyruvate ou les corps cétoniques (Stacpoole et al., 2008).



**Figure 23 : Mode d'action du DCA.** *La PDH catalyse la transformation du pyruvate en Ac-coA. Elle permet donc l'arrivée de « substrats » au niveau de la mitochondrie. Son activité est régulée par phosphorylation par la PDK, surexprimée dans les cellules cancéreuses. Le DCA est une petite molécule inhibitrice de la PDK.* 

De récentes études mettent en évidence le rôle du DCA dans l'induction de mort des cellules cancéreuses. En effet, il a été montré que le DCA est capable de repolariser la membrane mitochondriale des cellules cancéreuses, en poussant le pyruvate vers la mitochondrie et donc en augmentant la fonction mitochondriale (Bonnet et al., 2007). De ce fait, le DCA diminue la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*, sans affecter les tissus

sains (Cao et al., 2008, Wong et al., 2008, Sun et al., 2010). L'augmentation de la respiration mitochondriale serait associée avec une augmentation de la production de ROS. De plus, le DCA diminue la production de lactate intracellulaire et augmente le pH, ce qui pourrait diminuer la capacité de métastase et d'invasion des tumeurs. Dernièrement, il a été montré que le DCA peut être utilisé sur des patients souffrant de GBM (Michelakis et al., 2010). Les auteurs suggèrent que le DCA agit sur ces tumeurs via l'inhibition de l'isoforme II de la PDK, qu'ils retrouvent surexprimée chez ces patients.

#### 6- Métabolisme et apoptose

En plus de son rôle dans la prolifération, le métabolisme altéré des cellules cancéreuses pourrait favoriser une autre caractéristique essentielle de ces cellules: la résistance à l'apoptose.

Un lien possible entre ce changement métabolique et la résistance à l'apoptose est l'association des HK avec les protéines-canal voltage-dépendantes (VDAC), association qui est d'autant plus importante que le métabolisme est centré sur la glycolyse. D'une part, cette interaction facilite la phosphorylation du glucose en utilisant l'ATP généré par la mitochondrie. Cette interaction avec VDAC permet aussi aux HK de bloquer les sites de liaison des protéines pro-apoptotiques (notamment Bak) avec VDAC, interférant donc avec l'induction de l'apoptose (Pastorino et al., 2002, Cheng et al., 2003).

La GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), une enzyme de la glycolyse catalysant la phosphorylation et l'oxydation du glyceraldéhyde-3-phosphate en 1,3-biphosphateglycérate, a été montrée comme ayant un rôle pro-apoptotique. En effet, dans des neurones en culture, une augmentation du niveau d'expression de la GAPDH entraîne sa translocation dans le noyau et la mort des neurones (Ishitani et al., 1996). Le fait que la GAPDH soit surexprimée dans les cellules cancéreuses semble donc paradoxal. Cependant, une étude récente met en évidence que la GAPDH est capable de prévenir la mort caspases-indépendante des cellules, a priori via la stimulation de la glycolyse, l'augmentation de la quantité d'ATP intracellulaire et l'activation de l'autophagie (Colell et al., 2007, pour revue Colell et al., 2009). Enfin, cette protéine

semble aussi impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN, en réponse à des agents cytotoxiques. En effet, elle peut interagir avec APE1 (Apurinic / apyrimidinic endonuclease), une endonucléase et l'activer (Azam et al., 2008).

De surcroît, TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator), une cible de p53, est capable, de par sa similarité avec PKF (Phosphofructokinase), d'entraîner une diminution dans le niveau de fructose-2,6-phosphate (FBP) et donc d'arrêter la glycolyse à cette étape. Le glucose est alors redirigé vers la voie des pentoses phosphates, afin de produire du NADH et des nucléotides. L'augmentation du NADH induit une augmentation du niveau de glutathion (GSH), qui favorise la dégradation des ROS. TIGAR pourrait donc diminuer le niveau de ROS et de ce fait, diminuer la sensibilité des cellules à p53 et autres signaux apoptotiques associés aux ROS. Il semble donc être un acteur important dans le rôle de suppresseur de tumeur de p53 (Bensaad et al., 2006, pour revue Green and Chipuk, 2006). De même, une surexpression de la PKF2 entraîne une diminution de la glycolyse (retro-contrôle négatif de FBP) corrélée avec une augmentation du métabolisme glycolytique a été montré comme inhibant l'activité de p53 et donc son effet suppresseur de tumeur (Zhao et al., 2008b).

Les cellules tumorales présentent une résistance à l'apoptose qui est en partie médiée par leur métabolisme glycolytique. C'est pourquoi, il semble intéressant de cibler ce métabolisme pour essayer de contourner cette résistance. En effet, des études montrent qu'une privation en glucose entraîne la mort des cellules cancéreuses. Des cellules de GBM cultivées en absence de glucose meurent par apoptose, médié par un stress oxydatif (production de ROS) et non pas par une déplétion en ATP, suggérant qu'en absence de glucose, ces cellules seraient capables de changer leur métabolisme et d'utiliser leurs chaînes respiratoires (Jelluma et al., 2006). D'autres montrent que supprimer le glucose peut induire la mort dans des cellules déficientes en Bax et Bak, effecteurs de la perméabilisation mitochondriale, via une voie de signalisation non conventionnelle nécessitant la caspase 8 (Caro-Maldonado et al., 2010).

Enfin, il semblerait que l'invalidation de Oct1 (un facteur de transcription de la famille Oct) entraîne un shift métabolique : une augmentation de l'activité mitochondriale

et de l'oxydation des acides aminés corrélée avec une diminution du métabolisme glycolytique. Ce shift métabolique est associé avec une diminution de la capacité tumorogénique des cellules (Shakya et al., 2009). L'effet Warburg semble donc être nécessaire à la tumorogénèse et être lié à des facteurs de transcription comme ceux de la famille Oct, importants pour le caractère souche des CSC.

Dans les tumeurs cérébrales et en particulier le glioblastome multiforme (GBM), des épisodes de stress hypoxiques sont récurrents, liés à une prolifération importante dans un environnement clos (Heddleston et al., 2010). Ces tumeurs semblent donc être un bon modèle pour l'étude de l'effet Warburg médié, du moins en partie, par l'hypoxie (Semenza, 2010).

De plus, dans ces tumeurs, des cellules souches cancéreuses ont été mises en évidence (Singh et al., 2004). Elles semblent être grandement responsables de la résistance des gliomes aux traitements classiques (chimio et radiothérapie) (Bao et al., 2006, Liu et al., 2006).

Afin d'étudier des relations possibles entre effet Warburg, apoptose et différenciation, le gliome nous a semblé être un modèle idéal.

#### D. Présentation succincte du glioblastome multiforme

Les astrocytomes sont des tumeurs primaires, hétérogènes et invasives du cerveau, dérivant de la glie. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) les classe en quatre grades pronostiques en fonction de critères histologiques :

- grade I : astrocytome pilocytique
- grade II : astrocytome diffus
- grade III : astrocytome anaplasique
- grade IV : glioblastome multiforme

Les grades I et II sont considérés comme bénins alors que les grades III et IV sont malins. Les glioblastomes multiformes (ou GBM) représentent 70% des gliomes malins, avec une incidence annuelle de 5 cas pour 100 000 habitants en France, supérieure chez les hommes de 40% et plus importante parmi la population caucasienne qu'africaine ou asiatique. La survie à 5 ans des patients atteints de GBM est inférieure à 3% et leur âge moyen est de 64 ans (Ohgaki and Kleihues, 2005).

Le seul facteur de risque environnemental clairement mis en évidence à l'heure actuelle est l'exposition aux rayonnements ionisants, notamment chez les enfants ayant reçu un traitement pour des leucémies lymphoblastiques. Aucun facteur génétique n'a été, pour le moment, clairement démontré (Ohgaki and Kleihues, 2005).

Les mutations les plus fréquemment retrouvées sont une amplification/mutation de *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor), une perte de l'hétérozygotie du chromosome 10q et une délétion de *PTEN* (Phosphatase and TENsing homolog) ainsi que de *p16*. Ces mutations sont impliquées dans des voies de prolifération, de progression tumorale et d'inhibition de l'apoptose (Gu et al., 2009).

Les traitements utilisés sont l'exérèse chirurgicale (suivant la localisation de la tumeur), la chimiothérapie (principalement le Témozolomide) et la radiothérapie (rayons gamma, 2 Gy pendant 30 jours). Le problème de la récurrence des tumeurs après ces traitements a conduit à l'hypothèse, maintenant validée, de la présence de cellules souches cancéreuses dans les gliomes. La question de l'origine de ces cellules souches cancéreuses (cellules souches-progéniteurs normaux ayant subi une transformation oncogénique ou cellules cancéreuses se dédifférenciant) reste pour l'instant ouverte (Wen and Kesari, 2008).

# MATERIELS ET METHODES

#### Matériels et Méthodes

#### A- Culture et caractérisation des cellules souches neurales et cancéreuses

#### 1- Conditions de culture

Le milieu de culture, dit défini, est composé de DMEM contenant 1g/L de glucose (Gibco), de pénicilline-streptomycine (100U/mL), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen), de supplément N2 et B27 (Invitrogen), 20 ng/mL de EGF (Peprotech), 25 ng/mL de bFGF (Peprotech) et 2µg/mL d'Héparine (Sigma).

Deux fois par semaine les cellules sont collectées, centrifugées et une dilution au 1/5<sup>ème</sup> est réalisée.

2- Mise en culture de cellules souches neurales (NSCs) issues d'embryons de rat (E14.5)

Des rates Sprague-Dawley gestantes sont endormies au pentothal puis euthanasiées au CO<sub>2</sub>. Le cordon d'embryons (E14.5) est récupéré et placé dans de l'HBSS froid (Sigma), jusqu'à la dissection. Le cerveau de chaque embryon est récupéré, rincé, les méninges sont retirées. Ils sont ensuite incubés dans de la trypsine (0.25%) pendant 15 minutes à 37°C puis avec de la DNaseI (10  $\mu$ g/ml) pendant 10 minutes à 37°C. Les cellules obtenues après décantation et centrifugation sont ensemencées dans des boîtes de pétri en milieu avec sérum pendant une nuit à 37°C. Les cellules n'ayant pas adhérées sont récupérées par centrifugation et cultivées par la suite en milieu défini. 3- Récupération et mise en culture de cellules souches neurales issues de cerveaux de rats adultes (7 semaines)

Les encéphales de rats mâles Sprague-Dawley âgés de 7 semaines sont récupérés sur des animaux euthanasiés au CO<sub>2</sub> et stockés dans de l'HBSS 2% glucose jusqu'à la dissection.

Le cerveau est mis dans une boîte de pétri contenant de l'HBSS 2% glucose frais et il est sectionné au niveau du Bregma à l'aide d'un scalpel, après retrait des bulbes olfactifs. La partie antérieure du cerveau contenant la zone sous-ventriculaire (SVZ) est mise dans une nouvelle boîte de pétri avec de l'HBSS 2% glucose frais. La SVZ, située en bordure des ventricules latéraux, est disséquée à l'aide de pinces sous loupe binoculaire. Les fragments de SVZ sont ensuite dissociés et mis en culture suivant le protocole de Stem Cell Technologies.

Les cellules souches neurales adultes sont par la suite cultivées en milieu défini.

4- Récupération et mise en culture d'astrocytes de rats à P1

Les rats âgés de 1 jour sont décapités et le cortex est micro disséqué sous loupe binoculaire, puis mis en culture comme les NSCs embryonnaires. Les astrocytes sont ensuite cultivés dans des boîtes de pétri, préalablement coatées avec de la poly-ornithine (5µg/mL), avec un milieu spécial composé de DMEM-F12 (Gibco), de sérum de veau fœtal (SVF) 10%, de péniciline-streptomycine (100U/mL), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen), 5 mM d'Hepes (Gibco) et 33 mM de glucose.

5- Mesure de la proportion de cellules souches par dilutions limites

Les cellules sont collectées et comptées. Elles sont diluées à  $2.10^4$  cellules/mL dans 3 mL de milieu défini et 7 dilutions au demi successives sont réalisées.  $100\mu$ L/puits de chaque dilution est déposé dans une ligne de plaque 96 puits à fond plat. La première ligne de la plaque 96 puits contient donc 2000 cellules dans  $100\mu$ L par puits et la dernière ligne 15 cellules dans  $100\mu$ L par puits. La plaque est remise à l'incubateur et au bout de

72h, 100µL/puits de milieu défini est rajouté. Après une semaine d'incubation, les puits ne contenant pas de neurosphères sont comptés pour chaque ligne et reporté sur un graphique avec le nombre de cellules déposées dans chaque puits. Le nombre de cellules requis pour former une neurosphère, qui reflète le nombre de cellules souches dans la population, est ensuite déterminé à partir du point à laquelle la courbe croise la droite y = 0,37. Basé sur une loi de Poisson sur la distribution des cellules,  $F_0 = 0.37$  correspond à la dilution pour laquelle il y a une cellule souche par puits.

#### 6- Vérification de la capacité de différenciation des NSC

Afin de vérifier que les cellules souches embryonnaires et adultes récupérées sont bien capables de se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes, 500 neurosphères sont spottées en plaque 12 puits sur des lamelles de verre coatées avec de la polyornithine (50 µg/mL), dans du milieu avec sérum (milieu complet). Après 12 heures d'incubation à 37°C, le milieu complet est délicatement retiré et remplacé par 1 mL de milieu défini, sans facteur de croissance. Au bout de 7 jours, les neurosphères sont fixées pendant 15 minutes avec du paraformaldéhyde 4%. Du PBS-BSA (5%)-Triton (0,1%) est ensuite ajouté sur les lamelles pendant 45 minutes afin de perméabiliser et de saturer les cellules. Les anticorps primaires (cf tableau) sont rajoutés dans 300  $\mu$ L sur la nuit à 4°C. Après 1 heure d'incubation avec l'anticorps secondaire, les lamelles sont montées dans du milieu contenant du Dapi (Prolong-Gold, Invitrogen). Les lames sont alors regardées au microscope à fluorescence (Olympus, U-CMAD3, Japan) avec un objectif 20X et analysées avec le logiciel (Molecular Devices, Dowington, PA, USA).

Anticorps	Fournisseur	Référence	Méthode	Dilution
Nestin	DSHB	Rat 401	IC/Facs	1/1000
GFAP	BD Pharmingen	556328	IC/Facs	1/1000
Tuj	Sigma	T8660	IC/Facs	1/1000
Rip	DSHB	Rip	IC/Facs	1/1000
#### 7- Immunofluorescence et lecture à l'apotome

Les neurosphères normales et cancéreuses sont dissociées puis spotées sur une lame superfrost. Le surplus de milieu est absorbé par du papier Watman. Quand les cellules ont adhérées, un cercle au Dakopen est réalisé autour des cellules. Celles-ci sont alors marquées comme décrit dans le paragraphe précédent. La lecture des lames se fait à l'apotome (microscope inversé Zeiss Axiovert 200-M, programme AxioVision 4.6).

#### 8- Analyse des marqueurs de cellules souches et de différenciation

Les cellules sont comptées et 200.10<sup>3</sup> cellules par puits sont déposées en plaque 96 puits. Après lavage, les cellules sont fixées en présence de paraformaldéhyde (4%) pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite incubées pendant 15 minutes avec de la saponine (0,5%) afin de les perméabiliser. Les anticorps primaires et secondaires sont laissés 2 heures sur les cellules. Puis les cellules sont resuspendues dans 200  $\mu$ L de PBS-SVF-azide et l'analyse se fait au FACScalibur (BD Bioscience) en utilisant le logiciel Cell Quest Pro. Un minimum de 10 000 évènements est acquis pour chaque condition. Les débris cellulaires sont exclus au cours de l'analyse selon les propriétés FSC/SCC des cellules.

#### **B-** Mesure de la consommation cellulaire d'oxygène par oxygraphie

Cette technique consiste à mesurer les vitesses de consommation d'oxygène de cellules intactes dans différents états métaboliques selon la méthode développée par Hütter *et al.* en 2004. Les cellules utilisent leurs substrats endogènes et ceux contenus dans le milieu de culture pour respirer. La mesure est réalisée à l'aide d'un oxygraphe Oroboros O2k (*Oroboros, Innsbruck, Autriche*) contenant une électrode de «Clark » sensible à l'oxygène. Elle est calibrée dans le milieu défini équilibré à l'air à 37°C. Pour le 100%, la consommation d'oxygène est mesurée sous agitation, cuve ouverte avec du milieu. Lorsque le tracé est bien stable, le 100 % d'oxygène est réglé sur l'appareil. Ensuite, une solution de dithionite de sodium, un agent réducteur qui va peu à peu

consommer l'oxygène contenu dans le milieu, est injectée dans la chambre, donnant ainsi le 0% d'oxygène. La consommation d'oxygène peut être alors déterminée, en injectant 3.10<sup>5</sup> cellules dans la chambre.

- Lorsque la pente correspondant à la respiration basale est régulière, ajouter 2 µl d'oligomycine (inhibiteur du complexe V) 4 mg/ml (4 µg/ml final). On mesure alors une respiration en conditions non phosphorylantes, qui n'est pas couplée à la synthèse d'ATP.
- Ajouter successivement 2 à 4 µl de FCCP (découplant de la chaine respiratoire) 500 µM (titration de 0,25 à 10 µM final) afin de stimuler la chaîne respiratoire au maximum. La respiration ainsi mesurée est contrôlée par le système d'oxydation et reflète donc la capacité maximale de fonctionnement de la chaîne respiratoire dans des conditions découplées.
- Injecter 4 µl d'antimycine A 1 mg/ml (2 µg/ml final). Ce réactif est un inhibiteur du complexe III permettant de mesurer la consommation d'oxygène qui n'est pas due à la chaîne respiratoire mitochondriale.
- A la fin de l'oxygraphie, prélever 4x400µl de suspension dans la chambre de mesure pour le dosage des protéines.

#### C- Extraction de protéines liées à la chromatine pour Western Blot

Les cellules sont récupérées, rincées avec du PBS et placées dans du formaldéhyde 1% pendant 10 min à température ambiante. Après 3 lavages avec du PBS, 1 mL de tampon A (100mM Tris-HCl à pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM KCl, 0,5 mM DTT, 125 mM NaCl, 300 mM sucrose, 1% NP-40) est rajouté (10 minutes, sur glace). Les noyaux sont alors récupérés par centrifugation et resuspendus dans le tampon B (100mM Tris-HCl à pH 7,5, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 60 mM KCl, 0,5 mM DTT, 125 mM NaCl, 300 mM sucrose) et soniqués pendant 10 min. La chromatine est récupérée et resuspendue dans le tampon C (50 mM Tris-HCl à pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS) et agitée toute la nuit à 4°C. Le surnageant est utilisé classiquement en Western Blot par la suite.

### D- Mesure d'interactions par la technique Duolink ou PLA (Proximity Ligation assay) (Olink, Bioscience)

Afin de détecter une interaction entre 2 protéines, les neurosphères cancéreuses sont dissociées puis spotées sur une lame superfrost. Le surplus de milieu est absorbé par du papier Watman. Quand les cellules ont adhérées, un cercle au Dakopen est réalisé autour des cellules. Les cellules sont traitées comme pour une immunocytochimie classique puis incubées avec les 2 anticorps primaires (l'un fait chez la souris et l'autre chez le lapin) sur la nuit. Après lavages, les cellules sont incubées avec des anticorps secondaires couplés à une séquence nucléotidique. Si les protéines d'intérêt sont suffisamment proches, les séquences nucléotidiques vont s'hybrider sur la même sonde et l'amplifier. Le signal sera alors visible sous forme de « points » fluorescents. La lecture des lames se fait à l'apotome (microscope inversé Zeiss Axiovert 200-M, programme AxioVision 4.6).

#### E- Statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées au minimum en triplicat biologique et les graphiques représentent la moyenne +/- s.d. de ces expériences. Les analyses statistiques ont été réalisées sur GraphPad Prism 4 (Anova et t-test).

# RESULTATS

## A- Analyse comparative de cellules souches neurales et cancéreuses de rat : importance de l'effet Warburg

Récemment, les cellules souches cancéreuses ont été mises en évidence dans les tumeurs cérébrales et en particulier dans les GBM (Singh et al., 2004). Ces CSC, triées sur la base du très controversé marqueur CD133, présentent une résistance accrue à l'apoptose induite par radio et chimiothérapie (Bao et al., 2006, Liu et al., 2006). Elles seraient donc responsables de la résurgence des tumeurs chez les patients, après traitements classiques.

L'origine des CSC est, pour lors, fortement discutée. Proviennent-elles de cellules souches neurales transformées ou de cellules différenciées reprogrammées pour réexprimer des marqueurs de cellules souches ?

En outre, ces CSC présentent de nombreuses caractéristiques de NSC, comme la capacité à former des neurosphères en série *in vitro*, ou l'expression de marqueurs souches tels que la nestine. Un des enjeux majeurs de la recherche sur le gliome est donc de trouver des marqueurs ou des voies de signalisation spécifiques des CSC, qui permettraient de rechercher de nouvelles molécules ciblant spécifiquement ces cellules.

Dans le but de comparer des neurosphères normales et cancéreuses, nous avons choisi de travailler chez le rat. Des cellules souches d'embryon de rat (E14.5) ont été récupérées et mises en culture. Pour récupérer des CSC, des tumeurs ENU (ethyl-nitrosurée)-induites, récupérées dans des cerveaux de rat ont été dissociées et mises en culture. Les neurosphères issues de ces deux populations ont été comparées par une technique de protéomique sans a priori : la 2D-DIGE (2 Dimensions-Differential Gel Electrophoresis) et les protéines différentielles ont été identifiées par spectrométrie de masse (MALDI MS/MS).

Même si ces deux types de neurosphères présentent peu de différences, des altérations métaboliques ont été retrouvées dans les CSC, altérations présentent fréquemment dans des cellules ayant subi des épisodes hypoxiques.

Le Dichloroactétate (DCA) est une molécule, utilisée habituellement en clinique pour soigner des troubles mitochondriaux. Elle agit par inhibition de la pyruvate déshydrogénase kinase, ce qui favorise l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs et donc l'arrivée de substrats au niveau de la mitochondrie. Récemment, le groupe de Michelakis a mis en évidence que le DCA était capable de réduire la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*, notamment dans les gliomes (Bonnet et al., 2007, Michelakis et al., 2010). Nous avons donc également voulu vérifier si le DCA était capable d'agir sur les CSC et s'il présentait une toxicité éventuelle pour les NSC.

### Comparative proteomic analysis of rat neural stem cells and brain cancer stem cells identifies an anti-cancer target.

# Lalier L<sup>a,b,c</sup>\*, Morfouace M<sup>a,b</sup>\*, Bonamain V<sup>d</sup>, Bahut M<sup>e</sup>, Guette C<sup>a,f</sup>, Naveilhan P<sup>b,d</sup> and FM Vallette<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>INSERM, UMR 892, équipe labellisée « Ligue contre le Cancer », Nantes F44007 France

<sup>b</sup>Faculté de Médecine, Université de Nantes

<sup>c</sup>CRLCC René Gauducheau, Bld Jacques Monod, 44805 Saint Herblain cedex

<sup>d</sup>INSERM, UMR 643, Nantes F44000 France

<sup>e</sup>PFT, Université d'Angers, 22 rue Roger Amsler, 49100 Angers Cedex

<sup>f</sup>CRLCC Paul Papin, 2 rue Moll, 49000 Angers

\* these authors contributed equally to this work

Corresponding author: FM Vallette, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers UMR 892 INSERM/Université de Nantes, 8, Quai Moncousu BP 70721, 44007 CEDEX 01 Nantes France, Tel: 33-228080324, Fax: 33-228080329, e-mail: francois.vallette@inserm.fr

Keywords: cancer stem cells, glioblastoma,

#### Summary:

It has been postulated that solid tumors originate from a relatively small number of cells called cancer stem cells (CSC). Numerous studies have shown that brain tumor cancer stem cells were highly resistant to cell death and as such might contribute to tumor recurrence by eluding anti-cancer treatments. Like neural stem cells, cancer stem cells form *in vitro* structures called neurospheres. Using a proteomic approach based on two-dimensional DIGE and MALDI-TOF/TOF mass spectrometric identification, we have compared rat neural stem cells (NSC) with rat glioma cells under conditions that favor the growth of Brain Tumor Stem cells (BTSC). A total of 30 proteins were identified to be significantly over-expressed in BTSC compared to NSC (ranging from 1.3- to 8.7-fold) and 20 were down-regulated (ranging from 1.3to 5.1-fold). The major pathway highlighted by this proteomic analysis is glucose metabolism. Inhibition of aerobic glycolysis in vitro altered the survival of BTSC but not that of NSC. Strikingly, decreasing the non-oxidative glucose metabolism in tumor cells depleted the stem cells population and impaired the growth of tumors in vivo. Thus, a global proteomic analysis has revealed that the Warburg effect is essential for the survival of BTSC and has thus shed the light on a therapeutic approach that could target both BTSC and non-BTSC cancer cells.

#### Introduction:

One of the major questions in the cancer field concerns the origin of the heterogeneous cells that compose a tumor: do they arise from particular, degenerated stem cells or do they derive from differentiated cells that are reprogrammed to re-express some progenitor markers? Recent reports have suggested that in many tumor types, including brain tumors, only a small proportion of cells have the potential to recreate the original tumor, including the vast majority of cells that do not expand in vivo (1). Studies have shown that these cells share phenotypic traits with normal stem cells and in particular the capacity to form primary and secondary neurospheres in serum-free medium (2,3). In direct reference to the latter properties, these cells have been named brain tumor stem cells (BTSC)(1-3). The hypothesis that brain tumors originate from cancer stem cells implies that cancer stem cells have the capacity to initiate tumor formation and give rise to a heterogeneous combination of cell types, just like physiological stem cells do in the normal development of organisms (4). One particular hypothesis postulates that these BTSC could derive from neural stem cells that have acquired one or several mutations (5).

The BTSC have been shown to be extremely radio-resistant mainly due to the extremely high DNA repair capacity (6). In addition, these cells are extremely resistant to apoptotic insults (7), unless pretreated with differentiating agents such as BMPs (8). Since these cells are rare, long-lived and apoptosis-refractory, the BTSC now constitute a primary target for the treatment of this otherwise devastating disease (4). However, there are at least two caveats that hamper progress toward therapeutic targeting of these cells. Firstly, the ill characterization, and in particular, the lack of markers to discriminate them from the general cancer cells population and/or a clear functional description of their pro-tumoral properties. Consequently,

the cancer stem cell model is still highly disputed and the existing dogma privileges the existence of "dominant clones" arising within a pre-cancerous population (9, 10).

The field of proteomics has recently developed powerful tools to analyze the differences between closely related tissues and its potentials and limits in cancer have been widely discussed (11). To answer the question of the relationship between neural cells and cancer cells, as well as to find out new therapies targeting BTSC, we have analyzed the differences between neurospheres formed by rat neural stem cells and by rat brain cancer cells. We report here the 2-DE analysis and mass spectrometry characterization of the main differences between these two populations of neurospheres that appear closely related.

We have found several alterations in the metabolic pathway in BTSC, similar to those usually observed under hypoxia, especially a strong addiction of cancer stem cells to aerobic glycolysis known as the Warburg effect (12). Based on these results, we treated cancer stem cells with inhibitors of aerobic glycolysis, which appeared to be essential for the survival of these cells and for the tumor growth *in vivo*. Thus, the proteomic analyses have highlighted a pathway that could be used to target both BTSC and the non-stem cancer cells without affecting normal stem cells.

#### **Experimental procedures:**

#### Materials

Cell culture material was obtained from Gibco (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Unless stated otherwise, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Antibodies used were the following: Oct-4 (sc-5279 Santa Cruz), panactin (MAB1501R, Chemicon), MPK (ab38237, Abcam). Results shown are the mean

values of at least three independent experiments (+/-sd) unless expressively mentioned. The ImageJ software quantified images.

#### Cell culture

Glioma primary cultures (named P7 and M7) were obtained from Sprague-Dawley rats following antenatal ENU-induction as described in Pouliquen et al. (13). Tumors were dissected, minced then plated in DMEM (1 g/l glucose) medium containing 10%fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (complete media). Cells were either maintained in FCS-containing medium as adherent cells or cultured as neurospheres in FCS-free defined medium (DMEM 1g/l glucose, 2mM L-glutamine, N2- and B27-supplement, 2µg/ml heparin, 20 ng/ml EGF and 25 ng/ml bFGF, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). NSCs were obtained from E14 Sprague-Dawley rat embryos. Briefly, embryo brains were rinsed, freed from meninges, incubated with 0.25% trypsin for 15 min at 37°C then with 10  $\mu$ g/ml DNase I for 10 min at 37°C. Cells obtained were plated in dishes in complete medium overnight at 37°C. The non-adherent cells were recuperated and cultured in DMEM (1g/l glucose) medium containing 2 mM L-glutamine, 100U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, N2- and B27-supplement, 20 ng/ml EGF, 25 ng/ml bFGF, and 2  $\mu$ g/ml heparin (defined medium). DCA 1mM was added in the cell culture when indicated.

#### Limiting Dilution Assay

Limiting dilution assay was performed as described in Das *et al.* (14). Briefly, single cell suspensions were diluted to a concentration of  $2\times10^4$  cells/ml, from which serial dilutions were plated in 96-well plates in defined media. Final dilutions ranged from  $2\times10^3$  to 15 cells per well in 100 µL aliquots. Cells were cultured for 7 days, after which the fraction of wells that do not contain neurospheres was calculated and plotted against the number of cells plated per well for each cell plating density. The number of cells required to form one neurosphere, which reflected the proportion of

stem cells in the entire population, was then determined from the point at which the line cross the 0.37 level (based upon a Poisson distribution of cells,  $F_0 = 0.37$  corresponding to a dilution at which there was one stem cell per well).

#### RT and qPCR

Cells were washed twice in PBS, then total RNA was isolated using the RNeasy MiniKit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions with DNAse I treatment. After RNA quantification using the Nano Drop (Nano Drop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1  $\mu$ g RNA was reverse transcribed using Reverse Transcriptase AffinityScript (Agilent-Stratagene, Massy, France) for cDNA synthesis. Quantitative real-time PCR assays were performed and monitored in triplicate using an MX4000 multiplex Quantitative PCR system (Agilent-Stratagene). The PCR reaction contained 40 ng cDNA in a reaction volume of 25  $\mu$ l, 1x Brilliant II SYBR Green Q-PCR master mix, 200 nM reverse and forward primers and 30 nM Sybr Green. Thermo-cycling conditions were 95°C for 10 min followed by 40 cycles at 95°C for 30 sec, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min. Gene expression values were normalized to housekeeping gene (Ubiquitin) and relative expression values were calculated based on the comparative  $\Delta\Delta$ CT-method with adherent cells used as a reference for each cell type.

Nestin:	sense primer: 5'-TCTGCTGGAGGCTGAGAACT-3'	
	antisense primer: 5'-GTATTAGGCAAGGGGGAAGG-3'	
Sox2:	sense primer: 5'-AGAACCCCAAGATGCACAAC-3'	
	antisense primer: 5'-CGGGAAGCGTGTACTTATCC-3'	
Bmi1:	sense primer: 5'-GTGACTCTGGGAGCGACAAG-3'	
	antisense primer: 5'-CGAGGTCTACTGGCAAAGGA-3'	
Musashi:	sense primer: 5'-TCAGCCAAAGGAGGTGATGT-3'	
	antisense primer: 5'-CGGGGAACTGGTAGGTGTAA-3'	
Nanog:	sense primer: 5'-TGCGGACTGTGTTCTCTCAG-3'	

antisense primer: 5'-CATTGGTTTTTCTGCCACCT-3'

- Oct-1: sense primer: 5'-ACTTCAGCCAAACCACCATC-3' antisense primer: 5'-CTACGATTCAAGCCCTCAGC-3'
- Ubiquitin: sense primer: 5'- GAAACTAAGACACCTCCCCATCA-3' antisense primer: 5'-TCGTACCTTTCTCACCACAGTATCTAG-3'
- Glut1:
   sense primer: 5'-CAGGCTCCATTTAGGATTCGCC-3'

   antisense primer: 5'-CTCAGCCTCCGAGGTCCTTCT-3'

   MPK:
   sense primer: 5'- TCCCATTCTCTACCGACCTG-3'

antisense primer: 5'- TTCAGTGTGGCTCCCTTCTT-3'

- M1PK: sense primer: 5'- CCGCCTGCTGTTTGAAGA-3' antisense primer: 5'- GGGTCTGTGGATTGACTGGA-3'
- PKM2: sense primer: 5'- CCAGCGACCCCACAGAAG-3' antisense primer: 5'- TGCCAGACTTGGTGAGCA-3'

#### Tumor xenograft

5x10<sup>3</sup> glioma cells (P7 primary culture) cultured under either complete media or defined media conditions were injected subcutaneously into the flank of male nude mice. Mice were evaluated twice a week over a 3 week period. Tumor volume was measured with a caliper. When indicated, DCA was added in the drinking water and renewed twice a week from the injection day (0.75g/l, corresponding to an average ingestion of 80mg/kg per day (McMurtry, Circulation Research 2004)).

#### 2D-DIGE experiments

Cell pellets were resuspended in lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS) and proteins were further precipitated using the 2D-Clean-Up kit (Amersham Biosciences, Germany). Four biological replicates (50 µg) were used for each condition. Fluorescent CyDye-labelling of proteins for DIGE was performed according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). Isoelectrofocalization was performed on 18-cm pI 3-11 NL Immobiline Dry strip gels (GE Healthcare) and SDS-

PAGE was run using the Ettan DALTsix system (GE Healthcare). CyDye-labeled gels were scanned in an Ettan DIGE Imager (GE Healthcare). Gels images were processed using Progenesis SameSpots software (Nonlinear Dynamics Ltd, UK) for spot detection and statistical analysis. Spots considered for further analyses were chosen according to the following criteria: p>0.05 (one-way Anova test), fold change>1.3, q<0.05 and power>80% (False Discovery Rate approach). Spots were recovered using the Ettan Spot picker (GE Healthcare) and individually treated with the Proteoextract All-in-one Trypsin Digestion kit (Calbiochem) according to manufacturer's instructions. Peptide digests were concentrated on C18-Zip Tips (Millipore) and eluted with 1.5  $\mu$ l  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution (in 50% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid) onto a MALDI-TOF target plate (Opti-TOF 384 well Insert, Applied Biosystems). Peptide spectra acquisition was realized on the 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems). After screening the sample position in MS-positive reflector mode using 1500 laser shots, the fragmentation of automatically-selected precursors was performed at collision energy of 1kV using air as collision gas (pressure of  $2 \times 10^{-6}$  Torr). MS spectra were acquired between m/z 800 and 4000. Up to 12 of the most intense ion signals having a S/N>12 were selected as precursors for MS/MS acquisition. Peaklist generation and protein identification were performed by the ProteinPilotTM Software V 2.0 (Applied Biosystems) using the Paragon algorithm. Each MS/MS spectrum was searched for all species against the Uniprot\_Sprot\_20080123 database. The searches were run using with the fixed modification of iodoacetamide labeled cysteine parameter enabled. Other parameters such as tryptic cleavage specificity, precursor ion mass accuracy and fragment ion mass accuracy are MALDI 4800 built-in functions of ProteinPilot software. The ProteinPilot software calculates a confidence percentage (the unused score), which reflects the probability that the hit is a false positive, meaning that at 95% confidence level, there is a false positive identification chance of about 5%.

#### Canonical pathways analysis

Functional analysis of the differential proteins identified by the 2D-DIGE analysis was performed using the Ingenuity Pathways Knowledge Base. Differential proteins identifiers were uploaded into the Ingenuity Pathways Knowledge Base (15).

#### Protein extraction and immunoblotting

Total proteins were extracted in 1% NP-40, 0.5% sodium-deoxycholate, 0.1% SDS supplemented with protease inhibitor cocktail from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Protein concentration was determined using Bradford assay (Biorad, Hercules, CA, USA). Protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane (Millipore, St. Quentin-Yvelines, France) and revealed with ECL (Roche Diagnostics). Primary antibodies were used after 1:1000 dilution except from the anti-MPK antibody, which was used after 1:1000 dilution. HRP-conjugated secondary antibodies were from Biorad. Quantification was performed with the ImageJ software from at least three independent experiments.

#### LDH activity measurement

Cells were plated at a density of  $10^4$  cells/100 µl in 96-well plates. The cells were lysed by the addition of 10 µL lysis solution incubated at 37°C for 45 min. 50µL supernatant was used to determine the LDH concentration according to the manufacturer's instructions (Promega, France).

#### *Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase (G6PD) activity*

Cells were harvested and washed with PBS, then sonicated for 2 min in 100 µL PBS and centrifugated for 15 min at 13,000 rpm. Protein concentration was assessed using Bradford assay (Biorad, Hercules, CA, USA). G6PD activity was assessed in samples by spectrophotometric measurement of NADP+ reduction using a Roche/Hitachi 917 chemistry analyzer (substrate: 100 mM Tris pH 7.8, 4 mM Mg<sup>2+</sup>, 1 mM NADP+).

MTT assay

Cells were plated in 96 well plates at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells per well and cultured in the presence of 2-deoxyglucose (25 or 35 mM), 3-bromo-pyruvate (20 or 40 mM), or antimycin A (1 or 3 µM) for 24 h. 10 µl 5 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide was added per well and the plate was incubated at 37°C for 3 h. 100 µl of DMSO was added and the plate was read at 570 nm. The linearity between the number of viable cells and MTT assay in the experimental conditions used was verified by cells direct counting after eosine staining exclusion, excluding thus that metabolic differences observed in the different cells affected this assay.

#### **Results:**

## Neurospheres derived from cancer cells share a common morphology and common markers with neural stem cells and contain tumor-initiating cells.

Rat neural stem cells and ENU-induced rat brain tumor cells were obtained and maintained in culture as described in the experimental procedures section. Neural stem cells have been shown to grow as neurospheres in defined medium. The neurospheres obtained are heterogeneous and are composed of stem cells and progenitor cells with various differentiation potencies. Neurospheres isolation is a prerequisite for investigating the differentiation and potential of cell lineages (16). To assess if neurospheres could be obtained from rat brain tumor cells, the cells were cultured in the presence of EGF/bFGF without serum under conditions similar to that used to obtained neurospheres from rat embryonic brain (see experimental procedures). After 4 to 6 days, neurospheres were visible in the medium and proliferated steadily. No major morphological differences were observed between normal rat brain neurospheres and rat brain tumor ones except for an apparent disorganization due to a less controlled proliferation (**Figure 24A**). A similar feature was found in neurospheres derived from the established rat glioma cell line C6 (data

not shown). We used a limiting dilution assay to determine the number of cells necessary to form one neurosphere in the different cell cultures, thereby providing a rough estimation of the proportion of stem cells present (see experimental procedures). As shown in **figure 24B** and as expected, normal neural cells provided the highest proportion of stem cells (i.e. minimal amount of cells required for the formation of a neurosphere), while some differences could be observed among the different tumor cells (NSC= 1/11 cells > M7= 1/22 > P7= 1/26 > C6 (cell line)= 1/35).

Next, we investigated the expression of several stem cells markers in the adherent cell population and in neurospheres. As shown in **figure 24C**, immature cells markers (Bmi1, nanog, oct-1, nestin, sox-2) were over-expressed in neurospheres compared to adherent cells, in NSC as well as in BTSC (\*: p<0.05; \*\*: p<0.01, t-test analysis for neurospheres versus adherent cells comparison). Of note, Sox-2 expression, another neural stem cell marker, was not significantly increased in one of the BTSC. Musashi expression was not detectable in the adherent cells but was largely expressed in BTSC (**Annexe 1**). We also investigated the expression of OCT-4, an embryonic stem cell marker (Pesce and Schöler, StemCells 2001), and we found no differences in the expression of this marker between neurospheres and adherent cells arising from NSC; in contrast, the expression of OCT-4 was markedly increased in BTSC neurospheres compared to adherent cells (**figure 24D**). This result concurs with recent observations that OCT-4 is up-regulated in aggressive gliomas (17, 18).

Next, we verified whether neurospheres arising from brain cancer cells actually contained tumor-initiating cells by injecting 5x10<sup>3</sup> BTSC (i.e. neurospheres) or adherent cells into the flanks of nude mice and monitoring the growth of tumors. As shown in **figure 24E**, significant differences were observed in the growth of these

two populations as BTSC gave rise to large tumors while only one faint tumor volume became measurable with their non-stem cancer cells counterparts within 3 weeks.

Altogether, these results establish that neurospheres obtained from rat gliomas contain cells with stemness characteristics and exhibit properties similar to that described for human brain cancer stem cells, which led us to the proteomic comparison of sane and pathological neurospheres.

## Proteomic comparison of neurospheres formed by rat NSC and BTSC reveal distinct metabolic profiles.

As detailed in experimental procedures, protein extracts obtained from NSC and BTSC neurospheres (50 µg) were subjected to 2D-DIGE analysis (**figure 25A**). Four different matched samples from each neurospheres type were processed for spot detection and statistical analysis. Statistical treatment of the gels focused on 132 differential spots between NSC and BTSC, whatever the origin of the latter, which were picked for further MS/MS analysis. Protein identification was clearly obtained from 50 of these spots, which gave 44 different proteins (**Annexe 2**). We identified significant networks, functions and canonical pathways associated with these differentially expressed proteins using the Ingenuity Pathways Knowledge Base (**Table I**). As shown in **figure 25B**, metabolism, and in particular, glycolysis was the function that was the most significantly affected between BTSC and NSC.

Our results suggest that the main difference between normal and glioma neurospheres is related to the so-called "Warburg effect" (12), thus a cancer phenotype. However, the differential expression of other pathways suggests that a common regulation through hypoxia signaling occurs in BTSC.

## *Validation of the metabolic differences revealed by the 2D-DIGE experiment between NSC and BTSC.*

To examine whether the proteins identified by 2D-DIGE comparison of NSC and BTSC correspond to actual changes, we analyzed the glycolytic behaviour of BTSC. The glycolytic regulator pyruvate kinase M1/M2 is an enzyme essential for tumor growth and metabolism (19) and appeared up-regulated in BTSC in the 2D-DIGE experiment. **Figure 26A** shows that this protein is effectively over-expressed in BTSC compared to NSC. Tumor cells have been shown to express mainly the embryonic M2 isoform of pyruvate kinase (19), we thus analyzed by quantitative RT-PCR the relative expression of the adult (M1PK) and embryonic isoforms (PKM2). As shown in **figure 26B**, only the M2 isoform of pyruvate kinase was up-regulated in BTSC compared to NSC.

These data suggested that glucose metabolism was significantly different between NSC and BTSC. To evaluate this change, we measured the enzymatic activity of lactate dehydrogenase (LDH), which converts pyruvate to lactate, i.e which addresses pyruvate towards a non-oxidative metabolism. As shown in **figure 26C**, LDH activity is much higher in BTSC than in NSC. Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) is a rate-limiting enzyme involved in the first step of the pentose phosphate pathway, which enables the NADPH,H+ pool regeneration, and is correlated to malignancy in glioma (Kimura JNeurooncol 2002). The activity of both enzymes was elevated in BTSC confirming an alteration in the metabolic pathway as revealed by proteomic analyses (**figure 26C**). To strengthen the latter observation, we analyzed the expression of the glucose transporter 1 (GLUT-1), a marker of hypoxia, in BTSC versus NSC, even though it was not identified in the 2D-DIGE experiments. We found that Glut-1 was indeed increased in BTSC by a factor that ranged from 4 to 13 when compared to NSC (**figure 26D**).

These results confirm that the glucose-related pathways are highly deregulated in BTSC.

#### Modulating glycolysis in BTSC affects their viability.

Next, we analyzed the effect of the modulation of glucose metabolism on the survival of NSC and BTSC. We compared the growth of these cells in the presence of

glucose versus galactose supplemented or not with pyruvate as a much lower rate of glycolytic conversion to lactic acid is expected under these conditions. As illustrated in **figure 27A**, NSC could grow not only in the presence of glucose but also galactose, either supplemented or not with pyruvate. On the other hand, BTSC grew only in the presence of glucose-supplemented medium and were not able to use an alternative substrate (**Figure 27A**). These results suggest that bypassing glycolysis by the addition of galactose and/or favoring mitochondrial respiration by supplementing culture medium with pyruvate did not allow for BTSC survival and/or growth. We further investigated the effect of an inhibitor of glycolysis (i.e. 2-deoxyglucose, 2DG) or mitochondrial respiration (antimycin A, AntA) on cell survival/proliferation. We observed opposite effects of these two inhibitors on NSC and BTSC growth: 2-deoxyglucose did not affect the survival of NSC but had a drastic effect on that of BTSC, while antimycin A provoked a massive cell death of NSC but did not affect BTSC (**figure 27B**).

These results confirm that BTSC are fundamentally dependent on a glycolytic, non oxidative metabolism.

### *Pharmacological modulation of the glucose metabolism in BTSC by dichloroacetate alters CSC survival* in vitro and tumor growth in vivo.

Dichloroacetate (DCA) is a small therapeutic molecule used in mitochondrial diseases to reduce lactate production and increase the oxidative degradation of pyruvate. As shown in **figure 28A**, DCA efficiently decreased the LDH enzymatic activity in all the BTSC tested, whereas it revealed unheeded on the weak LDH activity in NSC. Strikingly, DCA treatment drastically reduced the neurospheres-forming population in the glioma primary culture P7 (**figure 28B**) as well as in the C6 cell line (data not shown). Concurrently, neurospheres cultured with DCA became adherent as shown in **figure 28C**. To determine if this *in vitro* effect of DCA on the glioma stem-like cells was transposable to *in vivo* experiments, we injected 5x10<sup>4</sup> P7

cells cultured under stem-permissive conditions into the flank of 10 nude mice. One half of the mice were treated by DCA in the drinking water from the injection day. Tumor growth was measured twice a week. At the end of the experiment, tumor resection was performed and the final volume was measured. As shown by the **figure 28D**, DCA treatment of the mice significantly reduced tumor growth within the time of experiment, demonstrating that DCA was efficient not only *in vitro* but also *in vivo*.

#### Discussion

The classical view of tumorigenesis is based on the observation that cancer cells grow faster than their normal counterparts. Molecular and functional analyses have revealed that mutations that favor proliferation occur in most tumors. Hence, most therapies have been designed to kill rapidly dividing cancer cells. Failure of this approach in numerous cases has led to reconsider this strategy. Over the past years, the cancer stem cell theory has challenged our ideas of the progression of solid tumors and thus the necessity to reshape our current anti-cancer therapeutic strategies (10). This theory, which is well documented in hematological malignancies (22), postulates that the cells that harbor the primitive oncogenic mutations are rare, long-living and slow-dividing and thus, evade most anticancer therapies. These cells are able to give rise to cells with distinct phenotypes if the right stimulus is provided. The term "cancer stem cell (CSC)" has been used because this definition is reminiscent of that of normal stem cells and also because the relationship between a stem cell and a cancer stem cell has been established in hematological cancers. This is of particular importance in gliomagenesis, the most common of the adult brain tumors, as CSC have been involved in tumor resistance to treatment. Brain CSC are indeed highly radio-resistant (6), providing a plausible explanation for the

therapeutic failure (7). One urgent goal is to find therapies which target these CSC and the bulk of the tumor cells to improve anti-cancer treatment efficiency (9).

Because of their "stemness properties", it has been postulated that CSC could arise from pathological stem cells or progenitors (4). This contention has been strengthened by the fact that current markers of BTSC are similar to that of neural stem cells and because, like the normal counterpart, BTSC are able to form neurospheres *in vitro*.

Taking advantage of the latter property, we have performed a proteomic comparison between NSC and BTSC neurospheres from normal rat brain and chemoinduced brain tumors (**Figure 24**). We found that cells derived from these tumors or the established rat glioma cell line C6 exhibited different amounts of neurospheresforming cells, which are highly tumorigenic cells (**Figure 24**). Compared to NSC, the neurospheres formed by BTSC over-expressed the stem cell marker OCT-4, while other stem cell or neural stem cells markers (Bmi1, nanog, oct-1, nestin, sox-2 and Msi1) were overexpressed in both sane and cancerous neurospheres (**Figure 24**). This is in good agreement with the link established between the expression of embryonic stem cell markers and tumor aggressiveness (17). Thus, we confirm the expression of stem-like cells characteristics by the rat glioma neurospheres.

We have then compared the two types of stem cells by a 2D-DIGE and mass spectrometry-based strategy and identified 50 proteins that had an altered expression in normal versus cancer neurospheres (**Figure 25 and Annexe 2**). This analysis revealed that the main differences between NSC and BTSC were associated with the glycolytic pathway (**Figure 26 and Table I**).

The consumption of oxygen and glucose in the brain is at least ten times higher than that of other tissues. Thus, the observation that the glycolytic pathway was over-stimulated in BTSC compared to NSC prompted us to analyze the response of these cells to glucose deprivation and/or to the inhibition of glycolysis. We found

that BTSC ceased to grow and rapidly died upon interference with glucose metabolism (**Figure 27**). In contrast, NSC were able to use alternative substrates or metabolic pathway, namely the oxidative phosphorylation (**figure 27**). Of note, we did not find any major defects in isolated mitochondrial respiration in BTSC (unpublished results), suggesting a regulation upstream of the organelle.

This phenomenon has been long known in rapidly dividing cancer cells as the Warburg effect (12). It should be noted, however, that recent results have shown that mesenchymal stem cells are more glycolytic than primary human fibroblast, suggesting that adult stem cells also do not only rely on mitochondrial respiration (23). Of note, OCT-1 and OCT-4 (the expression of both has been found to be elevated in BTSC, **Figure 24**) have recently been identified as key regulators of the glycolytic pathway (24). This could suggest that stem cells could be easily primed for glycolysis. Besides, among the glycolytic cancer cells population, our results show that cancer stem cells appear as the most addicted to glycolysis.

Our results also suggest that the dependence on glycolysis may occur early during tumorigenesis since it is already present in CSC. Thus, the Warburg effect is likely to be a major event during tumorigenesis, not as a symptom but as one of its primary causes.

In addition, our proteomic approach reveals an alternative target for the elimination of these otherwise apoptosis resistant BTSC, namely the glucose metabolism pathway. Indeed, DCA, a pharmacological modulator of the glucose metabolism, could rapidly deplete the neurospheres-forming population and reduce tumor growth *in vivo* (**figure 28**). Bonnet et al. (Cancer Cell 2007) have shown that DCA induced cell death in some cancer cell lines through the production of ROS, yet we didn't observe this ROS production in our BTSC (unpublished results). We nevertheless establish that the addiction of BTSC to glycolysis can be envisaged as a therapeutic target in glioma, all the more than the inhibition of this pathway would

also act on non-stem-like cancer cells, while preserving non-cancer cells. DCA can thus be efficient, even in cells that do not produce ROS, as an inhibitor of glycolysis. Our work thus highlights a little-used strategy, namely metabolism modulation, which could improve therapy in glioma by eradicating the different tumor cell populations, especially through a specific depletion of the highly resistant BTSC population in the tumor, thereby preventing tumor reappearance.

**Acknowledgments:** This work was supported by grants from INSERM (Insitut National de la Santé et la Recherche Médicale) and a special grant from the "Ligue Nationale contre le Cancer" (programme Equipe Labellisée).

#### **References:**

1. Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn V.E., Hawkins, C., Squire, J. and Dirks, P.B. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-8.

2. Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D. and Dirks, P.B. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.

3. Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschsmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L., and Yu, J.S. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23, 9392–9400.

4. Sanai, N., Alvarez-Buylla, A. and Berger, M.S. (2005) Neural stem cells and the origin of gliomas. *N. Engl. J. Med.* 353, 811-22.

5. Li,Z., Wang, H., Eyler, C.E., Hjelmeland, A.B. and Rich, J.N. (2009) Turning cancer stem cells inside out: an exploration of glioma stem cell signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 284, 16705-9.

6. Bao, S., Wu, Q., McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756-60.

7. Eramo, A., Ricci-Vitiani, L., Zeuner, A., Pallini, R., Lotti, F., Sette, G., Pilozzi, E., Larocca, L.M., Peschle, C., De Maria, R. (2006) Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Diff.* 13, 1238-1241.

8. Piccirillo, S.G., Reynolds, B.A., Zanetti, N., Lamorte, G., Binda, E., Broggi, G., Brem, H., Olivi, A., Dimeco, F. and Vescovi, A.L. (2006) Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444, 761-5.

9. Adams, J.M. and Strasser A. (2008) Is tumor growth sustained by rare cancer stem cell or dominant clones ? *Cancer Res.* 68, 4018-21.

10.\_\_Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R. and Morrison, S.J. (2009) Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138, 822-9.

11. Diamandis, E.P. (2004) Mass Spectrometry as a Diagnostic and a Cancer Biomarker Discovery Tool: Opportunities and Potential Limitations. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 367 - 378.

12. Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. Science. 123,309-14.

13. Pouliquen, D., Olivier, C., Hervouet, E., Pedelaborde, F., Debien, E., Le Cabellec, M.T., Gratas, C., Homma, T., Meflah, K., Vallette, F.M. and Menanteau, J. (2008). Dietary prevention of malignant glioma aggressiveness, implications in oxidant stress and apoptosis. Int. J. Cancer 123, 288-95.

14. Das, A.V., Jackson, J., Zhao, X., Rahnenführer, J. and Ahmad, I. (2004) Identification of c-Kit receptor of adult neural stem cells in the mammalian eye : interaction with Notch signaling. Dev. Biol. 273, 87-105. 15. Bergemalm, D., Forsberg K., Jonsson, P.A., Graffmo, K.S., Brännström, T., Andersen, P.M., Antti, H and Marklund S.L.(2009) Changes in the spinal cord proteome of an Amyotrophic Lateral Sclerosis murine model determined by differential in-gel electrophoresis. *Mol Cell Proteomics* 8, 1306–1317.

16. Suslov, O.N., Kukekov, V.G., Ignatova, T.N., and Steindler, D.A. (2002). Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14506–14511.

17. Ben-Porath, I., Thompson, M.W., Carey, V.J., Ge, G.W., Regev, A. and Weinberg, R.A. (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.* 40, 499-507.

18. Du, Z., Jia, D., Liu S., Wang F., Li, G., Zhang, Y., Cao, X., Ling E.A. and Hao, A. (2009) Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia* 57, 724-733.

19. 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. (2008) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumor growth. *Nature* 452,230-233.

20. Vasseur, S., Afzal, S., Tardivel-Lacombe, J., Park, D.S., Iovanna, J.L. and Mak TW. (2009) DJ1/PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106,1111-6.

21. Lee A.S. (2007) GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications.\_*Cancer Res.* 67, 3496-9.

22. Huntly, B.J. and Gilliland, D.G. (2005) Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer.* 5, 311–321.

23. Funes, J.M., Quintero, M., Henderson, S., Martinez, D., Qureshi, U., Westwood, C., Clements, M.O., Bourboulia, D., Pedley, R.B., Moncada, S. and Boshoff, C. (2007) Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on

oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 6223-6228.

24. Shakya, A., Cooksey, R., Cox, J.E., Wang, V., McClain, D.A. and Tantin, D. (2009) Oct1 loss of function induces a coordinate metabolic shift that opposes tumorigenicity. *Nat Cell Biol.* 11, 320-7.

**Figure 24: Cancer stem cell culture.** A) Morphology of normal neural neurospheres (NSC, left) and glioma neurospheres (GBM CSC, right) grown in defined medium. B) LDA assay illustrating the neurosphere-forming capacity of normal stem cells (NSC) and glioma cancer cells (M7, P7, C6) (see materials and methods section). The graph is representative of at least three independent assays. C) Immature cells markers mRNA expression in normal and cancer cells grown in stem cell permissive conditions, normalized to the corresponding expression in adherent cells. D) Expression of Oct-4 protein in normal (NSC) and cancer (P7) cells grown either as adherent cells or in stem cell permissive conditions. The protein expression normalized to pan-actin is indicated below the blots as the mean value (sd) from three independent experiments. E) Tumorigenic potency of cancer cells (P7) grown either as adherent cells or in stem cell permissive conditions.  $5x10^3$  adherent cells were injected into the right flank of 3 nude mice, the contra-lateral flank receiving  $5x10^3$  cells grown as neurospheres (black marks, dotted line: adherent cells; open marks, plain line: neurospheres).

**Figure 25: 2D-DIGE comparison of normal and cancer neurospheres.** A) Total protein extracts from NSC, C6 and M7 neurospheres were compared by 2D-DIGE analyses. The images shown are characteristic from four experiments. B) Data were submitted to analysis by the Ingenuity Pathways canonical system and pathways with p<0.05 are represented on the graph. Histogram bars stand for p values (-log p) and the curve represents the ratio of proteins differentially expressed in each pathway given by the software

**Figure 26: Validation of 2D-DIGE analyses.** A) Western blot analysis of MPK expression in normal (NSC) and cancer stem cells (C6, P7, M7). The protein expression normalized to pan-actin is indicated below the blots as the mean value

(sd) from three independent experiments. B) RT-PCR analysis with oligonucleotides specific to either M1PK or PKM2 mRNA in glioma neurospheres discriminates between the overexpression of either isoform of MPK. C) Alterations in the metabolism of glioma neurospheres relative to NSC was assessed by the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) enzymatic activity. D) Glut1 mRNA expression was measured in BTSC and normalized to the corresponding expression in NSC.

**Figure 27: Biological significance of the metabolic pathway highlighted in cancer neurospheres.** A) Cell number kinetics was assessed in NSC or glioma neurospheres grown in the presence of the indicated carbohydrate substrates. Cell counting was done every other day and culture medium was renewed at day 4. B) Cell proliferation/viability was assessed using MTT assay on neurospheres grown in the presence of indicated inhibitors for 24 h (2-deoxyglucose or antimycin A).

**Figure 28: Effect of DCA in BTSC** *in vitro* **and** *in vivo*. glioma neurospheres were grown under stem cell permissive conditions w/o DCA 1mM added. A) LDH activity was measured in cell lysates. B) The amount of stem-like cells in the P7 primary culture was determined by LDA every other day. C) P7 cells morphological characteristics were observed in stem-cell permissive conditions w/o DCA 1mM added D) P7 cells were injected subcutaneously to 5 nude mice per group. DCA was added in the drinking water of the treated group and tumor size was measured 37 days post-injection.

Figure 24: Caractérisation des cellules souches cancéreuses utilisées dans cette étude







Ε





Figure 25: Comparaison par 2D-DIGE de neurosphères normales and cancéreuses





**Table 1: Canonical pathways**. Differential proteins identified were uploaded to the Ingenuity Pathways Knowledge Base and subjected to canonical pathways analysis. The top canonical pathways are shown in the table with the corresponding proteins indicated. Proteins indicated in bold are up-regulated in glioma neurospheres.

Ingenuity Canonical Pathways	p value	Proteins
Glycolysis/Gluconeogenesis	7,94E-11	PKM2, PGK1, ENO1, ENO3, GAPDH, LDHA, LDHB, ALDOC
Pyruvate Metabolism	3,47E-05	PKM2, MDH1, LDHA, LDHB
Phenylalanine, Tyrosine and Tryptophan Biosynthesis	1,00E-03	ENO1, ENO3
Actin Cytoskeleton Signaling	2,82E-03	ACTB, GSN, ACTG1, MSN
Pentose Phosphate Pathway	3,55E-03	TKT, ALDOC

### Table I

Figure 26: Validation des analyses de 2D-DIGE



95

C6

🗆 M7

P7

Figure 27: Signification biologique du métabolisme mis en évidence dans les neurosphères cancéreuses





L'analyse comparative des neurosphères neurales et cancéreuses a permis de mettre en évidence, d'une part, que ces deux populations sont proches : elles expriment toutes deux les marqueurs nestine, Oct4, Bmi-1, Musashi, Nanog, Sox2 et Oct1 et elles forment des neurosphères *in vitro*. D'autre part, l'analyse par protéomique ne nous a pas permis de faire ressortir des marqueurs spécifiques des CSC, mais a mis en avant les altérations métaboliques importantes de ces cellules. En effet, elles présentent non seulement un métabolisme majoritairement glycolytique, communément retrouvé chez les cellules cancéreuses et connu sous le nom d'effet Warburg, mais elles surexpriment également la voie de l'UPR (Unfolded Protein Response), couramment associée à des épisodes de stress hypoxique. De plus, l'inhibition de la glycolyse par diverses drogues telles que le 2-déoxyglucose (2DG, inhibiteur des hexokinases) ou le dichloroacétate (DCA, inhibiteur de la pyruvate déshydrogénase kinase) montre un effet privilégié sur les CSC et semble inefficace sur les NSC. Cibler l'effet Warburg, notamment avec des molécules inhibant la glycolyse pourrait donc être un bon moyen d'éliminer les CSC dans les gliomes.

Il a récemment été montré que le DCA pouvait induire la mort des cellules cancéreuses, via la production de ROS et la repolarisation de la membrane mitochondriale et de ce fait, diminuer la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* (Bonnet et al., 2007, Michelakis et al., 2010). Il semble donc intéressant de confirmer cet effet sur les CSC. Au vu des résultats préliminaires montrant une diminution de la capacité des CSC à former des neurosphères après traitement au DCA (figure 28-b) et de la diminution de croissance tumorale dans les souris nudes traitées au DCA (figure 28-c), il serait intéressant de comprendre le mode d'action de cette molécule sur les CSC.

## B- Rôle du DCA, une drogue ciblant le métabolisme, sur l'induction de l'apoptose dans les CSC

Les cellules différenciées génèrent de l'ATP par la glycolyse (2 molécules) mais surtout par les phosphorylations oxydatives au niveau de la mitochondrie (36 molécules).

Paradoxalement, les cellules cancéreuses, ayant une prolifération accrue, utilisent quasiment exclusivement la voie de la glycolyse et éliminent le pyruvate en le transformant en lactate. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet Warburg (Warburg, 1956).

Ce métabolisme semble être intéressant pour les cellules cancéreuses car il leur permet de résister à des épisodes de stress hypoxiques. De plus, la glycolyse générant de nombreux précurseurs métaboliques, la cellule cancéreuse dispose de substrats pour synthétiser lipides, acides aminés et nucléotides, nécessaires à sa prolifération.

Le fait que les cellules souches cancéreuses utilisent également majoritairement la voie de la glycolyse pour subvenir à leur besoin en ATP, suggère que cette voie métabolique pourrait être une cible de choix pour l'éradication des cellules tumorales.

Le dichloroacétate (DCA) est une molécule permettant de forcer l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs et le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. De par ce fait, elle induit la mort des cellules cancéreuses via une repolarisation de la membrane mitochondriale et la production de ROS (Bonnet et al., 2007). Cette même molécule semble avoir également un effet sur les cellules souches cancéreuses (Lalier et al., soumis), même si le mécanisme d'action demeure inconnu.

Nous nous sommes donc intéressés à comprendre le mode d'action du DCA dans les cellules souches tumorales en analysant le métabolisme de ces cellules après traitement pour mettre en évidence un changement éventuel du métabolisme associé avec une production de ROS. Nous avons également étudié différentes protéines apoptotiques qui seraient susceptibles d'être impliquées dans le mécanisme d'action du DCA.
## Mechanisms of Dichloroacetate-induced apoptosis in rat glioma

## stem-like cells

Marie MORFOUACE<sup>1,2</sup>, Lisenn LALIER<sup>1,2,3</sup>, Lisa OLIVER<sup>1,2</sup>, Naig GUEGAN<sup>4,5</sup>, Pascal REYNIER<sup>4,5</sup>, Francois M. VALLETTE <sup>1,2\*</sup>

1. Inserm U892, Département de Recherche en Cancérologie, Université de Nantes, INSERM U892, 8 quai Moncousu, 44035 Nantes Cedex, France.

2. Faculté de Médecine, Université de Nantes, 1 rue Gaston Veil, 44000 Nantes, France.

3. Département de Biologie Oncologique, Centre de Lutte Contre le Cancer René Gauducheau, Bd J. Monod, 44805 Nantes, Saint Herblain Cedex, France.

4. INSERM U694, Angers, France, Faculté de Médecine, Université d'Angers.

5. Département de Biochimie et Génétique, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

\* corresponding author at Inserm U892

**Abstract**: Cancer Stem Cells (CSCs), which have been recently described in gliomas, are thought to be partially responsible for cancer resistance to current therapies and tumor recurrence. Dichloroacetate (DCA), a drug capable of shifting metabolism from glycolysis to glucose oxidation, via the inhibition of pyruvate dehydrogenase (PDH), has been shown to inhibit tumor growth in several types of cancer. We show that DCA is able to shift pyruvate metabolism in rat CSCs but has no effect in rat neural stem cells. Contrary to what was reported for cancer cell lines, DCA by itself cannot force CSC into oxidative phosphorylation, reactive oxygen species (ROS) production and apoptosis. However, DCA associated with etoposide or irradiation induced a Bax-dependent apoptosis in CSCs *in vitro* and decreased their growth *in vivo*. The former phenomenon is related to DCA-induced Foxo3 and p53 expression, leading to the over-expression of BH3-only proteins (Bad, Noxa and Puma), which in turn facilitate Bax-dependent apoptosis. Our results demonstrate that a small drug available for clinical studies is efficient against cancer stem cells in association with an apoptosis inducer.

abbreviation: CSC: cancer stem cell; DCA: dichloroacetate; Eto: etoposide; LDH:

lactate dehydrogenase; NSC: neural stem cell; ROS: reactive oxygen species.

running title: DCA induced apoptosis in cancer stem cells

### Introduction

Mammalian cells mainly through generate ATP mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS). However, cancer cells adopt alternative metabolic pathways and increase their glycolytic activity through a process called the Warburg effect (Vander Heiden et al., 2009). This Warburg effect is necessary for cancer cells to resist to oxidative stress and to adapt to hypoxic conditions. Thus, glycolysis could play an essential role in tumorigenesis during both the immortalization and transformation steps (Kondoh, 2008). Whether the emergence of glycolysis in cancer (i) is an early or late event, (ii) is due to genetically inherited dysfunctions (essentially those affecting mitochondria) or (iii) induced metabolic modifications (mainly due to the hypoxic tumoral environment), this is still unknown and remains controversial (Zanssen & Schon, 2005; Brandon et al., 2006; Zhou et al., 2007). Indeed, the cross-talk between mitochondria and the hypoxic microenvironment in tumors renders the analysis extremely complicated as hypoxia-induced mitochondrial dysfunction could trigger in turn further mutations in the DNA of this organelle, which will further increase hypoxia-induced factors such as HIF 1 or glycolytic enzymes such as pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) (see for example Sun et al., 2009), leading to a chicken or egg causality dilemma. However, as this metabolic transformation confers a selective growth advantage and/or resistance to apoptosis through numerous oncogenic mutations (Sun et al., 2009), it may represent an important therapeutic target to be exploited that has been increasingly recognized as such since Otto Warburg's original discovery (Hsu & Sabatini, 2008, Tennant et al., 2010). Indeed, Bonnet et al. (2007) have shown that dichloroacetate (DCA), a small pharmacological inhibitor of PDK, which promotes a shift in metabolism from glycolysis to OXPHOS in muscle cells (Stacpoole et al., 2003), efficiently kills some cancer cells most likely because these cells are unable to produce ATP through

mitochondria. Recently, the same group has shown that DCA induced apoptosis in Glioblastoma Multiforme (GBM) cells and thus could be beneficial to the patients (Michelakis *et al.*, 2010). Since gliomas are one of the most deadly malignant tumors with virtually no successful treatment (Huse & Holland, 2010), this discovery opens new promising therapeutic avenues. Michelakis et al. (2010) have shown that DCA was also efficient against a small population of tumor cells, called cancer stem cells, which are highly resistant to cell death inducers and thus could be responsible for tumor recurrence (Park & Rich, 2009). This is of importance since the eradication of cancer stem cells represents an important therapeutic goal (Park & Rich, 2009). DCA has been shown to induce apoptosis in GBM cancer stem cells but not in normal cells through a mechanism, which remains elusive (Michelakis et al., 2010). Apoptosis is a very complex process, which is often deregulated in cancer (Yip & Reed, 2008). Metabolism, and in particular oxidative phosphorylation, is essential for Bax and/or Bak activation (Tomiyama et al., 2006), the core pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family (Chipuk et al., 2010). In this report, we have studied the influence of DCA on the apoptotic pathway and in particular the Bax activation pathway. We used a rat model, which allowed the comparison of the effect of this compound on both CSCs and normal NSCs.

## **Results and discussion**

### Effect of DCA on NSCs and CSCs metabolism.

The definition and the isolation of CSCs have been controversial, but a general consensus is that CSCs form neurospheres, which are morphologically similar to neural stem cell under identical culture conditions (Deleyrolle & Reynolds, 2009). To assess the effect of DCA on rat NSCs and CSCs we used neurospheres obtained from primary cultures of rat neural stem cells (NSCs), from a rat glioma cell line (C6<sup>CSC</sup>) or

from a primary rat brain glioma tumor (P7<sup>CSC</sup>). The NSCs were recuperated from normal rat brain and the tumors as described in Pouliquen et al. (2008). The cells were cultured in defined medium described for human CSCs by Yuan et al. (2004) (i.e. DMEM with 1 g/l glucose, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, N2- and B27-supplement 20 ng/ml EGF, 25 ng/ml bFGF, and 2 µg/ml heparin). NSCs and CSCs formed neurospheres in culture with very similar morphology (Annexe 3). Rat brain tumor-derived neurospheres exhibited CSCs as these cells were capable of self-renewal, expressed stemness markers such as nestin and could undergo partial neural differentiation in serum supplemented culture media (Lalier et al., unpublished data). In addition, as shown later, these rat brain tumors-derived neurospheres were capable of forming tumors in animals. These cells were treated with DCA (1 mM). As expected, DCA provoked an increase in the maximal uncoupled respiration rate (i.e. compared to  $O_2$  consumption in the presence of FCCP) in CSCs but not in NSCs (figure 29a). Conversely, the measurement of glucose in the culture media of NSCs and CSCs indicated that DCA decreased the rate of glucose import and/or consumption in CSCs but not in NSCs (figure 29b). DCA has been reported to induce a sharp increase in Reactive Oxygen Species (ROS) in human gliomas (Bonnet et al., 2007). We did not observe any modification in ROS production in rat CSCs (figure 29c); nevertheless, under these conditions, DCA decreased the production of lactate dehydrogenase (LDH) in CSCs but not in NSCs (figure 28a), indicating nonetheless a metabolic shift. On the other hand, DCA did not induce any modification in ROS production or in the production of LDH in NSCs. We conclude that our neurospheres provided an excellent model to analyze and compare the effect of DCA in rat brain NSCs and CSCs.

DCA does not induce apoptosis in NSCs or CSCs but decreases the resistance to apoptosis in CSCs treated with Etoposide or irradiation.

CSCs are known to be resistant to Etoposide- or irradiation-induced apoptosis (Eramo et al., 2006). NSCs and CSCs were treated with increasing concentrations of DCA (0.25 to 1 mM) over 48 hours, after which cell death was monitored. As shown in **figure 30a**, DCA, at high concentrations, affected moderately the cell viability and proliferation of CSCs but not that of NSCs. Next, we treated NSCs and CSCs with Etoposide (50  $\mu$ M over 12 hours) or by  $\gamma$ -irradiation (5 Gy) (**Annexe 4**). None of these treatments affected drastically the survival of neurospheres (figure 30c). However, a pretreatment with DCA (Annexe 4) drastically increased the percentage of cell death after irradiated or etoposide-treatment of CSCs (figure 30c). In contrast, no modification of the number of dead cells was observed for NSCs under similar conditions (figure 30c). Analysis of caspase activity indicated that the nature of CSCs death induced by the co-treatments, was predominantly apoptosis (figure **30b**). Proteins of the Bcl-2 family are essential partners of apoptosis and several drugs have been demonstrated to efficiently inhibit the anti-apoptotic members of this family (Chonghaile & Letai, 2008). ABT-737 is one of these drugs and has demonstrated promising effects in different tumoral cells (Chonghaile & Letai, 2008). Figure 30d shows that ABT-737 alone had little effect on CSCs and NSCs survival but that its combination with DCA intensified cell death in CSCs but not in NSCs. This result suggests that proteins of the Bcl-2 family are involved in DCA-enhanced apoptosis in CSCs.

### DCA induces a Bax-dependent apoptosis.

Bax, a pro-apoptotic protein of the Bcl-2 family, undergoes a change of conformation at the onset of apoptosis, which can be visualized with the anti-conformational antibody 6A7 (Lalier *et al.*, 2007). We found that CSCs co-treated with DCA and etoposide exhibited Bax activation while both drugs did not activate Bax in NSCs

(figure 31a). To further understand how DCA could alter the Bax dependent apoptosis in CSCs, we measured in NSCs and CSCs treated with DCA, the Bax/Bcl-xl ratio as well as the expression of some BH3-only proteins (namely: Bad, Bim-EL, Noxa and Puma), which has been shown to control glucose related cell death (McKenzie *et al.*, 2010; Danial, 2008; Zhao *et al.*, 2008). Figure 31b shows that the expression of Bad, Noxa and Puma were increased in DCA-treated CSCs compared to untreated cells while that of Bim was not affected (data not shown). Of note, as shown in Annexe 5, we did not observe any change in the Bax/Bcl-XI ratio in neural or CSCs treated with DCA. To verify the implication of Bax in the above observed cell death, we inhibited its expression using small hairpin RNA (shRNA). C6<sup>CSC</sup> and P7<sup>CSC</sup> were treated with two shRNA designed to down-regulate Bax expression and a control scrambled shRNA. Both shRNA targeting Bax induced an almost total extinction of its expression (Annexe 6). These cells were treated as previously described with DCA and Etoposide or irradiation and, as illustrated in figure 31c & d, the down-regulation of Bax abolished the induced apoptotic cell death.

Taken together, our results suggest that DCA was able to increase the expression of some BH3-only proteins in CSCs, but this was not sufficient to activate Bax and/or to inhibit the action of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family.

## DCA up-regulates p53 and Foxo3 expression

Foxo3 and p53 are known to be transcription factors for Noxa, Puma, Bim and Bad (Möller *et al.*, 2005; Gilley *et al.*, 2003; Schuler & Green, 2001). To assess if these proteins were implicated in the DCA pathway, we analyzed by quantitative PCR their expression. As shown in **figure 32a**, an increase in the expression of these two transcription factors was observed upon treatment with DCA in CSCs but not in NSCs. For p53, the expression increased 24- (for C6<sup>CSC</sup>) and 10-fold (for P7<sup>CSC</sup>) while

for Foxo3, from the expression increased 4- (for C6<sup>CSC</sup>) and 31-fold (for P7<sup>CSC</sup>). This up-regulation was confirmed by Western blot analysis (**Annexe 7**). The cellular localization of these transcription factors is essential in their pro-apoptotic functions. As shown in **figure 32b**, Foxo3 localization, assessed by immunostaining, was modified in DCA-treated P7<sup>CSC</sup> compared to untreated cells since Foxo3 translocated into the nucleus. On the other hand, no modification in Foxo3 localization was observed in DCA-treated NSCs (44%±3,8 vs 42%±9,5). The percentage of nuclear Foxo3 upon DCA treatment was increased from 33%±3 to 53%±5. **Figure 32c** showed a similar modification of p53 localization in DCA-treated CSCs where the percentage of p53 in the nucleus increased from 27%±4 to 42%±2. These results suggest that DCA induces transcription activity of p53 and Foxo3, thereby facilitating their pro-apoptotic activities.

### Effect of DCA on tumor growth in vivo

To study the effect of DCA *in vivo*,  $5 \times 10^4$  cells P7<sup>CSC</sup> were injected into the flanks of nude mice and the animals were treated or not with DCA (diluted in the drinking water) and/or intra-peritoneal Etoposide injections. Tumor size was measured twice a week for a month. As shown in **figure 32d**, P7<sup>CSC</sup> tumor growth was rapid (0 to 681 mm<sup>3</sup> ± 70.6 in 40 days) in mice treated or not with Etoposide (0 to 653 mm<sup>3</sup> ± 79.1 in 40 days). However, tumor growth decreased in mice treated with DCA (0 to 322 mm<sup>3</sup> ± 54.8) and even more in the mice treated with DCA and Etoposide (0 to 67 mm<sup>3</sup> ± 11.2).

Here we have shown that a small molecule with promising therapeutic results (Michelakis *et al.*, 2010) induced apoptosis, in combination with DNA damaging agents, in cancer stem cells but did not harm cognate normal stem cells. Interestingly, similar results have been shown recently in breast cancer stem cells

with an anti-diabetic drug with hypoglycemic effect (i.e. metformin) (Hirsh *et al.*, 2009). However, in the latter case no molecular mechanisms of action of this drug were reported. Here we show that DCA use molecular pathways that are different to that involved in glucose metabolism-dependent cell death (Zhao *et al.*, 2008) and that it does not modify the metabolism of neural stem cells grown under identical conditions. Taken together, our results provide the rational for the association of drugs that target glucose metabolism and conventional treatments to eradicate cancer stem cells and thus to prevent tumor relapse.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflicts of interest

**Acknowledgements:** We thank Arulraj Nadaradjane for technical assistance, Philippe Hulin from the "Cellular and Tissular Imaging Core Facility (MicroPICell), Université de Nantes" for his aid with all the microscopic analyses. This study was supported by a special program from "Equipe Labellisée la Ligue Contre le Cancer".

## References

Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, *et al.* (2007) A mitochondrial K+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell.* **11**:37-51.

Brandon M, Baldi P, Wallace DC. (2006) Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* **25**:4647-62.

Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* **37**:299-310.

Chonghaile TN, Letai A. (2008) Mimicking the BH3 domain to kill cancer deaths. *Oncogene* **27 S1**: S149-157.

Danial NN. (2008) Bad: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene* **27 S1**: S53-70.

Deleyrolle LP, Reynolds BA. (2009) Identifying and enumerating neural stem cells: application to aging and cancer. *Prog. Brain Res.* **175**: 43-51.

Gilley J, Coffer PJ, Ham J. (2003) FOXO transcription factors directly activate *bim* gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* **162**: 613-22.

Hervouet E, Debien E, Campion L, Charbord J, Menanteau J, Vallette FM, *et al.* (2009) Folate supplementation limits the aggressiveness of glioma via the remethylation of DNA repeats element and genes governing apoptosis and proliferation. *Clin. Cancer Res.* **15**: 3519-29.

Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsichlis PN, Struhl K. (2009) Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res* **69**:7507–11

Hsu PP, Sabatini DM. (2008) Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**:703-7.

Huse JT, Holland EC. (2010) Targeting brain cancer : advances in the molecuar pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer.* **10**:319-31.

Kondoh H. (2008) Cellular life span and the Warburg effect. *Exp Cell Res.* **314**:1923-8.

Lalier L, Cartron PF, Pedelaborde F, Olivier C, Loussouarn D Martin SA, *et al.* (2007) Increase in PGE2 biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene* **26**:4999-5009.

McKenzie MD, Jamieson E, Jansen ES, Scott CL, Huang DC, Bouillet P, Allison J, Kay TW, Strasser A, Thomas HE. (2010) Glucose induces pancreatic islet cell apoptosis that trquires the BH3-only proteins Bim and PUMA and multi-BH domain protein Bax. *Diabetes* **59**:644-52.

Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, *et al.* (2010) Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med.* **2**:31ra34.

Möller C, Alfredsson J, Engström M, Wootz H, Xiang Z, Lennartsson J, Jönsson JI, Nilsson G. (2005) Stem cell factors promotes mast cell survival via inactivation if FOXO3a-mediated transcriptional induction and MEK-regulated phosphorylation of the proapoptotic protein Bim. *Blood* **106**:1330-1336

Park DM, Rich JN. (2009) Biology of glioma cancer stem cells *Mol Cells.* 28:7-12.

Pelicano H, Martin D S, Xu R H, Huang P. (2006) Glycolysis inhibition for anti cancer treatment. *Oncogene* **25**: 4633-4646.

Pouliquen D, Olivier C, Hervouet E, Pedelaborde F, Debien E, Le Cabellec MT, *et al.* (2008) Dietary prevention of malignant glioma aggressiveness, implications in oxidant stress and apoptosis. *Int. J. Cancer* **123**: 288-95.

Schuler M, Green DR. (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* **29**: 684-88.

Singh A, Settleman J. (2010) EMT, cancer stem cell and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* doi:10.1038/onc.2010.215.

Stacpoole PW, Nagaraja NV, Hutson AD. (2003) Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug. *J. Clin. Pharmacol.* **43**:683-91.

Sun W, Zhou S, Chang SS, McFate T, Verma A, Califano JA. (2009) Mitochondrial mutations contribute to HIF1 alpha accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate dehydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* **15**:476-84.

Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E. (2010) Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **10**:267-77.

Tomiyama A, Serizawa S, Tachibana K, Sakurada K, Samelima H, Kuchino Y, *et al.* (2006) Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors Bax and Bak. *J Natl Cancer Inst.* **98**:1462-73.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**:1029-33.

Yip KW, Reed JC. (2008) Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* **27**:6398-6406 Zanssen S, Schon EA. (2005) Mitochondrial DNA mutations in cancer *PLoS Med.* **2**:e401.

Yuan X, Curtin J, Xiong , Liu G, Waschsmann-Hogiu S, Farkas DL, *et al.* (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* **23**: 9332-9400.

Zhao Y, Coloff JL, Ferguson EC, Jacobs SR, Cui K, Rathmell JC. (2008) Glucose metabolism attenuates p53 and PUMA-dependent cell death upon growth factor deprivation. *J. Biol. Chem.* **283**: 36344-36353.

Zhou S, Kachhap S, Sun W, Wu G, Chuang A, Poeta L *et al.* (2007) Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**:7540-7545.

## Legends of figures

**Figure 29**: **DCA** effect on neural and cancer stem cell metabolism. (A) Oxygraph analyses of NSC and P7<sup>CSC</sup> treated or not DCA (1mM, 48 h, Sigma-Aldrich, USA). Respiratory parameters were investigated in intact cells ( $5x10^{6}$  cells) by polarography in 2 ml glass chambers using a two channels, high-resolution Oxygraph respirometer (Oroboros, Austria) as described previously (Loiseau *et al.*, 2007). The respiration rate was normalized to the quantity of protein for each experiment. Data are the mean  $\pm$  sd of 3 independent experiments (\*\*: p<0,01, unpaired two-tailed t-test, GraphPad Prism software). (B) Measure of glucose.  $50x10^{3}$  cells (NSC, C6<sup>CSC</sup> and P7<sup>CSC</sup>) were cultured in defined medium with or without DCA (1 mM, 48 h). Culture media were removed at T0, 10, 24 and 48h and analyzed according to the manufacturer's instructions (Glucose Assay Kit, Invitrogen, France). Data are the mean  $\pm$  sd of 3 experiments. (C) NSC, C6<sup>CSC</sup> and P7<sup>CSC</sup> were cultured in defined medium with or without DCA (1 mM, 48 h) and the production of ROS was assessed using a fluorescent dye (H2DCF-DA), as previously described (Hervouet *et al.*, 2009). Data represent average  $\pm$  sd of 3 experiments.

**Figure 30**: **DCA decreases the resistance to apoptosis in cancer stem cells treated with Etoposide or irradiations**. (A) NSC, C6<sup>CSC</sup> and P7<sup>CSC</sup> were cultured with increasing concentrations of DCA (0.25, 0.5 or 1 mM) for 48 h. Viability was assessed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma). The linearity between the number of viable cells and MTT assay was verified

by direct counting of the cells after eosin staining. Data are the mean  $\pm$  sd of 3 independent experiments. (B) NSC, C6<sup>CSC</sup> and P7<sup>CSC</sup> were treated by DCA (1 mM) and then  $\gamma$ -irradiated (5 Gy) or treated by Etoposide (50  $\mu$ M, Teva Classics, Paris, France) as described in **Annexe 4**. The viability was assessed by MTT as in (A). (C) DEVDase activity was measured in the cell lysates obtained in (B) as previously described (Lalier *et al.*, 2007). (D) NSC, C6<sup>CSC</sup> and P7<sup>CSC</sup> were treated with DCA (1 mM) for 24 h, then ABT-737 (1  $\mu$ M, Euromedex, France) for additional 24 h. The viability was assessed by MTT as in (A). All the graphs represent mean  $\pm$  sd of 3 independent experiments (\*: p<0,05 and \*\*: p<0,01, unpaired two-tailed t-test, GraphPad Prism software).

**Figure 31: DCA induced a Bax-dependant apoptosis.** (A) Bax activation was measured in NSC and in P7<sup>CSC</sup> by flow cytometry after treatment with DCA (1 mM, 48 h)  $\pm$  Etoposide (50  $\mu$ M, 12h, see **Annexe 4**) (Bax 6A7 antibody, #ALX-804-224, Alexis, USA). Data were acquired on a FACScalibur (Becton Dickinson, France) and analyzed with CellQuest software (Becton Dickinson). The experiment shown is representative of 3 independent experiments. (B) Relative Bad, Bim, Puma and Noxa expression levels was determined by immunoblot in NSC, C6<sup>CSC</sup> and P7<sup>CSC</sup> treated or not with DCA (1 mM, 48 h). Antibodies used were following: Bad (#610391, Becton Dickinson), Bim (#AB17003, Millipore), Puma (#AP1317a, Millipore) and Noxa (#AP1316a, Millipore). Protein expression was normalized to actin (#MAB1501R, Millipore). Quantification was performed using ImageJ software of at least 3 independent experiments. (C)(D) C6<sup>CSC</sup> and P7<sup>CSC</sup> were transfected with shRNA targeting Bax (Bax1 and Bax2) or with shRNA scramble in a pSilencer 2.1-U6 vectors (Ambion, Applied Biosystems, France). Cells were selected with puromycin (1  $\mu$ g/ml). Cells were co-treated by DCA  $\pm$  Etoposide (C) or by DCA  $\pm$  irradiation (D) as

described in **Annexe 4**. Cell death and DEVDase activity were measured as described in **figure 30**. All the graphs represent mean  $\pm$  sd of 3 independent experiments (\*: p<0,05 and \*\*: p<0,01, unpaired two-tailed t-test, GraphPad Prism software).

Figure 32: Increase of p53 and Foxo3 expression after DCA treatment. (A) Relative Foxo3 and p53 mRNA expression levels were determined by QRT-PCR in NSC, C6<sup>CSC</sup> and P7<sup>CSC</sup> treated or not with DCA (1 mM, 48 h), using a MX-4000 multiplex Quantitative PCR system (Agilent-Stratagene, France). Gene expression values were normalized to housekeeping gene (Ubiguitin) and relative expression values were calculated based on the corresponding control cultures. Data are the mean ± sd of 3 experiments (\*: p<0,05 and \*\*: p<0,01, unpaired two-tailed t-test, GraphPad Prism software). (B) Immunostaining of Foxo3 (#07-695, Millipore) was performed on NSC and P7<sup>CSC</sup> with or without DCA (1 mM, 48 h). The labeling was assessed on a Zeiss Axiovert 200-M inverted microscope using AxioVision 4.6 program. Colocalization of Foxo3 and Dapi was measured in an average of 100 cells per field by the Metamorph software (v7.6.5.0). The colocalization was determined by quantification of the percentage of labeling A (Foxo3 or p53) in the region B (defined by Dapi). Values are the mean  $\pm$  sd of 3 independent experiments. (C) Immunostaining of p53 (#554167, Becton Dickinson) on P7<sup>CSC</sup> with or without DCA (1 mM, 48 h) as in (B). (D) DCA effect on tumor growth *in vivo*. 5x10<sup>4</sup> P7<sup>CSC</sup> cells were injected subcutaneously to male nude mice (n=10 per arm). Mice were treated with DCA (0.075g/L, drinking water) and/or Etoposide (200 µg/mouse, intraperitoneal injection, 5 days out of 7) during 40 days. Mice were evaluated twice a week and tumor volume was measured with a caliper. The graph represents the mean tumor size in each group  $\pm$  sd. Tumors shown are representative of the tumors obtained in each group, 40 days after injection.



Figure 29: Effet du DCA sur le métabolisme des cellules souches neurales et cancéreuses



Figure 30: Le DCA diminue la résistance à l'apoptose des CSC induite par l'Etoposide ou les irradiations







d





Figure 32: Augmentation de p53 et de Foxo3 après traitement au DCA

Le DCA modifie le métabolisme des cellules souches cancéreuses de rat (diminution de l'activité LDH, augmentation de la respiration mitochondriale sous FCCP, un découplant de la chaîne respiratoire) sans modifier celui des NSC.

Cependant, contrairement à ce qui avait été décrit précédemment (Bonnet et al., 2007), seul, il semble insuffisant pour forcer les phosphorylations oxydatives, induire une production de ROS et déclencher l'apoptose.

Néanmoins, il augmente fortement l'apoptose induite par l'Etoposide ou les irradiations. Cette potentialisation est corrélée avec une surexpression de protéines à domaine BH3-seul tels que Bad, Puma et Noxa ainsi que de p53 et Foxo3. Un des mécanisme d'action possible du DCA pour la potentialisation de la mort cellulaire dans les cellules souches cancéreuses serait donc via l'augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques, qui combinées à un signal de mort (Etoposide, irradiations) permettrait d'activer Bax et de ce fait d'initier l'apoptose.

En plus de ces différents rôles, la modification du métabolisme induite par le DCA pourrait également avoir des conséquences sur d'autres protéines de la glycolyse.

# C- Le dichloroacétate induit la différenciation des cellules souches cancéreuses de tumeurs cérébrales de rat, via une interaction entre l'isoforme M2 de la pyruvate kinase et Oct4

La pyruvate kinase est une enzyme limitante de la glycolyse catalysant la formation de pyruvate et d'ATP à partir de phosphoénol pyruvate et d'ADP. La pyruvate kinase existe sous différentes isoformes et l'isoforme M2, en théorie embryonnaire, est réexprimée par les cellules cancéreuses. Il a été montré que son expression était nécessaire à l'induction de l'effet Warburg et à la croissance tumorale (Christofk et al., 2008a). En effet, cette isoforme possède la particularité de se dimériser ou de se tétramériser en fonction de la quantité de substrats et de son niveau de phosphorylation. La forme dimère, peu active pour la glycolyse, semble être celle prépondérante dans les cellules cancéreuses.

De plus, il a été montré que cette isoforme M2, sous l'influence de certains signaux extérieurs pouvait se relocaliser dans le noyau. Ainsi, après une carence en facteur de croissance suivie d'une stimulation par l'IL-3, la PKM2 devient nucléaire et favorise la prolifération (Hashino et al., 2007). De même, le groupe de Stetak a montré qu'après exposition aux U.V., ou suite à une production de ROS par la cellule, la PKM2 migre dans le noyau, mais semble plutôt entraîner une mort cellulaire indépendante des caspases et des protéines de la famille de Bcl-2 (Stetak et al., 2007).

Enfin, la PKM2 semble également pouvoir se lier avec le facteur de transcription Oct4 (Lee et al., 2007). Dans leur modèle, cette liaison active la capacité transcriptionnelle d'Oct4, ce qui n'est pas sans rappeler qu'une autre enzyme de la glycolyse, la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), a été montré comme faisant partie de la machinerie de transcription eucaryote (Zheng et al., 2003).

## 1- DCA et pyruvate kinase M2

Les NSC de rat ainsi que les P7 (cellules issues de tumeurs de cerveau de rat, ENUinduites) cultivées en milieu défini (appelées par la suite P7<sup>CSC</sup>) possèdent majoritairement l'isoforme M2 de la pyruvate kinase (figure 33).



Figure 33: Expression des isoformes M1 et M2 de pyruvate kinase dans les NSC et les BTSC (PCR quantitative). \*\* signifie p<0,01 (t-test)

L'isoforme M2 de la pyruvate kinase est essentielle pour l'effet Warburg. Or, le DCA modifie le métabolisme des CSC. C'est pourquoi, nous avons voulu étudier l'influence que pourrait avoir cette drogue sur la pyruvate kinase dans nos cellules. Pour celà, des NSC et des P7<sup>CSC</sup> ont été cultivées en milieu défini (i.e. sans sérum) avec ou sans DCA (1 mM), pendant 48h. Le niveau global de PKM2 a été quantifié par Western Blot et n'est pas modifié par un traitement avec du DCA. De même, sa localisation cellulaire ne semble pas modifiée : la PKM2 est majoritairement cytosolique (figure 34).



Figure 34: Localisation cellulaire de la PKM2 dans les P7<sup>CSC</sup> traitées ou non avec du DCA

Nous avons ensuite transfecté des cellules cancéreuses (P7) avec un sh RNA dirigé contre l'isoforme M1 ou M2 de cette enzyme et nous avons regardé l'effet du DCA seul

(1 mM, 48h) ainsi qu'en co-traitement avec de l'Etoposide (50  $\mu$ M, 12h) en milieu défini, après avoir validé par PCR et Western Blot la diminution d'expression de la PKM2 (figure 35).



Figure 35: Validation de la diminution d'expression de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase par PCR classique et Western Blot

La figure 36 montre que l'Etoposide seul n'induit que peu de mort chez les cellules transfectées avec un sh RNA scramble ou dirigé contre l'isoforme M1, mais en induit 23% chez les cellules transfectées avec un sh RNA dirigé contre l'isoforme M2. Cependant, le co-traitement DCA-Etoposide entraîne une mortalité identique à celui Etoposide seul pour les cellules avec un sh RNA anti-PKM2, alors que pour les deux autres types cellulaires, la mortalité augmente fortement (40% pour les cellules avec un sh RNA scramble et 41% pour les cellules avec un sh RNA anti-M1PK). La diminution d'expression de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase semble donc, d'une part, entraîner une modification de la réponse cellulaire à l'Etoposide et d'autre part, être nécessaire à la levée d'inhibition de l'apoptose induite par le DCA.



Figure 36: Viabilité des cellules transfectées avec un sh RNA scramble ou dirigé contre les isoformes M1 et M2 de la pyruvate kinase après traitement à l'Etoposide (50 μM, 12h) ou un co-traitements DCA (1 mM, 48h)-Etoposide, mesurée par MTT. \* signifie p<0,05 (t-test)

De plus, il est connu que la PKM2 est régulée par phosphorylation au niveau du résidu Tyr<sup>105</sup>. Cette phosphorylation entraîne la dimérisation de la pyruvate kinase, forme moins active pour la glycolyse, mais préférentiellement retrouvée dans les cellules cancéreuses. Afin de connaître le niveau de phosphorylation de la PKM2 dans nos cellules et voir une modification éventuelle suite au traitement par le DCA, une immunoprécipitation de la PKM2 dans les NSC ou les P7<sup>CSC</sup> a été réalisée et son niveau de phosphorylation a été déterminé avec un anticorps anti-phosphotyrosine total.



Figure 37: Mesure du niveau de phosphorylation de la PKM2 par immunoprécipitation de PKM2 suivie d'un Western Blot avec un anticorps anti-phosphotyrosine total. \*\* signifie p<0,01 (t-test)

Comme montré dans la figure 37, la PKM2 est 2 fois plus phosphorylée dans les  $P7^{CSC}$  que dans les NSC (ratio de 1,81 versus 0,78). Cependant, suite à un traitement avec du DCA, le niveau de phosphorylation de la PKM2 n'est pas modifié dans les NSC (0,71 versus 0,78) mais est fortement diminué dans les  $P7^{CSC}$  car le ratio passe de 1,81 à 0,75. Le DCA semble donc capable de diminuer le niveau de phosphorylation de la PKM2 dans les CSC.

En plus du niveau de phosphorylation, l'activité enzymatique de la pyruvate kinase a été mesurée en présence ou non de DCA. Cette activité est révélatrice de la quantité de dimères-tétramères présente dans les cellules car la forme tétramère est plus active que la forme dimère, à niveau d'expression constant.



Figure 38: Mesure de l'activité enzymatique de la pyruvate kinase dans des NSC, P7<sup>CSC</sup> ou P7<sup>CSC</sup> transfectées avec un shRNA dirigé contre les isoformes M1 et M2 de la pyruvate kinase, après traitement ou non au DCA (1 mM, 48h). \*\* signifie p<0,01 (Anova et t-test)

Après traitement au DCA, l'activité enzymatique de la pyruvate kinase a été mesurée dans les NSC, les P7<sup>CSC</sup> ainsi que dans les P7<sup>CSC</sup> transfectées avec un sh RNA contre les isoformes M1 et M2 de la pyruvate kinase. Le DCA n'induit pas de modification de l'activité enzymatique dans les NSC (88 U.I. versus 77 U.I.), alors qu'elle est fortement augmentée dans les P7<sup>CSC</sup> (de 2 à 8 U.I.) ainsi que dans les P7 transfectées avec un sh RNA contre la M1PK (de 3 à 14 U.I.), qui réagissent de la même manière que les cellules non transfectées (figure 38). Cependant, dans les P7 transfectées avec un sh RNA contre la PKM2, l'activité enzymatique est totalement inhibée (0,5 U.I. avec ou sans traitement), même en présence de DCA, confirmant non seulement que la PKM2 est bien l'isoforme majoritaire dans les P7<sup>CSC</sup> mais également, l'extinction de cette isoforme dans nos cellules transfectées. Le fait que, d'une part, le DCA induise une diminution de la

phosphorylation de la PKM2 et d'autre part, une augmentation de son activité enzymatique dans les P7<sup>CSC</sup>, sont deux preuves indirectes tendant à suggérer que cette drogue modifierait le ratio dimères-tétramères en faveur de la forme tétramère.

## 2- Le DCA stimule l'interaction de PKM2 avec Oct4

Récemment, PKM2 a été identifiée comme étant un partenaire d'interaction d'Oct 4 dans des cellules de carcinomes embryonnaires. Cette interaction ferait intervenir le domaine POU d'Oct4 et le domaine C-terminal de PKM2 (Lee et al. 2008). Afin de déterminer une interaction éventuelle de ces deux protéines dans les NSC et les CSC, des immunoprécipitations de PKM2 ont été réalisées sur des lysats cellulaires totaux de NSC et de P7<sup>CSC</sup> traitées ou non au DCA (1 mM, 48h). Les Western Blot ont été quantifiés par Image J et les valeurs obtenues ont été normalisées par rapport à la valeur obtenue pour la PKM2.



Figure 39: Mise en évidence d'une interaction entre Oct4 et PKM2 par immunoprécipitation de PKM2, suivie d'un Western Blot avec un anticorps anti-Oct4 dans les NSC et les P7<sup>CSC</sup> traitées ou non au DCA (1 mM, 48h). \*\* signifie p<0,01 (t-test)

Ces immuoprécipitations (figure 39) montrent que dans les NSC, l'interaction PKM2-Oct4 existe et est non significativement augmentée par le DCA (le ratio Oct4/PKM2 passe de 0,6 à 0,7). D'autre part, dans les P7<sup>CSC</sup>, en absence de DCA, cette interaction est quasi-inexistante (ratio de 0,1). Cependant, suite à un traitement au DCA,

Oct4 est immunoprécipité en même temps que PKM2 (ratio de 0,5). Le DCA semble donc renforcer l'interaction entre ces deux protéines.

Cette interaction, visible par immunoprécipitation, a pu être confirmée par la technique de Duolink (Olink Bioscience, figure 40) ou PLA (Proximity Ligation Assay).



Figure 40: Mise en évidence de l'interaction entre PKM2 et Oct4 par la méthode de Duolink dans les cellules P7<sup>CSC</sup> traitées au DCA (1 mM, 48h)

Des expériences de Duolink ont été réalisées sur les P7<sup>CSC</sup> cultivées en milieu défini, en présence ou non de DCA (1 mM, 48h). Les images obtenues par apotome montrent qu'en absence de DCA, peu de points rouges apparaissent. Cependant, dans les cellules cultivées avec du DCA, de nombreux points peuvent être observés et ce pour la plupart des cellules (figure 40). Cette expérience tend donc à confirmer le fait que le DCA favorise l'interaction entre la PKM2 et Oct4. Il faut également noter que le niveau global de Oct4 a été quantifié par Western Blot et n'est pas modifié par un traitement avec du DCA.

## 3- L'interaction d'Oct4 avec PKM2 diminue son potentiel transcriptionnel

Suite à un traitement avec du DCA, Oct4 semble donc en partie séquestré par PKM2. Nous nous sommes alors demandé quel impact sur son rôle de facteur de transcription cette séquestration pouvait avoir. Pour cela, la chromatine de cellules NSC et P7<sup>CSC</sup> traitées ou non avec du DCA (1 mM, 48h) a été extraite, un Western Blot a été réalisé, quantifié par Image J et les valeurs ont été normalisées par rapport à l'histone H3.



Figure 41: Diminution de la quantité de Oct4 lié à la chromatine des cellules P7<sup>CSC</sup>, après traitement au DCA (1 mM, 48h). \*\* signifie p<0,01 (t-test)

Les résultats (figure 41) montrent que la quantité d'Oct4 liée à la chromatine est inchangée dans les NSC suite à un traitement au DCA (le ratio Oct4/Histone H3 passe de 2,3 à 2,2). Cependant, dans les  $P7^{CSC}$ , cette quantité diminue significativement après traitement (le ratio Oct4/Histone H3 passe de 2,3 à 1,6). Dans les CSC, le fait que PKM2 interagisse avec Oct4 entraîne une diminution de ce dernier au niveau de la chromatine. Or, Oct4 favorise la transcription de très nombreux gènes-cibles. Nous nous sommes particulièrement intéressés au niveau d'expression de 4 d'entre eux : *Sox2*, pour son importance dans les cellules souches, *Taldo*, qui code pour l'aldolase et qui donc a un rôle important dans le métabolisme, *Gata6*, également un facteur de transcription ayant un rôle au cours du développement et *Stat3*, pour son rôle dans de nombreuses voies de signalisation, notamment en réponse aux facteurs de croissance tels que l'EGF ou le bFGF.



Figure 42: Expression relative (PCR quantitative) de 4 gènes-cibles de Oct4 dans les NSC et les P7<sup>CSC</sup> suite à un traitement au DCA (1 mM, 48h). \* signifie p<0,05, \*\* signifie p<0,01 (Anova et t-test)

Ces 4 gènes ont été analysés par PCR quantitative et les valeurs ont été rapportées à celle d'un gène de ménage : l'ubiquitine. Les valeurs relatives ont été calculées par la méthode des  $\Delta\Delta$ CT en utilisant comme cellules de référence pour chaque population les cellules non traitées (figure 42). On remarque qu'en présence de DCA le niveau d'expression de ces quatre gènes ne varie pas pour les NSC (ratio autour de 1), alors qu'il est fortement diminué pour les P7<sup>CSC</sup> (ratio respectivement de 0,2, 0,4, 0,5 et 0,4) La diminution de la quantité d'Oct4 lié à la chromatine dans les P7<sup>CSC</sup> semble donc bien corrélée avec une diminution de son activité transcriptionnelle, puisque 4 de ses gènescibles sont moins exprimés. Le niveau protéique a pu être vérifié pour 2 de ces gènes (figure 43).



Figure 43: Niveau d'expression protéique de Stat3 et Sox2 dans les NSC et les P7<sup>CSC</sup> traitées ou non au DCA (1 mM, 48h). \* signifie p<0,05, \*\* signifie p<0,01 (t-test)

Des lysats protéiques totaux de NSC et de P7<sup>CSC</sup> traitées ou non avec du DCA (1mM, 48h) ont été analysés par Western Blot. Les résultats ont été quantifiés par Image J et normalisés par rapport à l'actine. Le niveau protéique de Stat3 et Sox2 est inchangé dans les NSC, après traitement au DCA (ratio autour de 1 pour Stat3 et de 1,1 pour Sox2). Dans les P7<sup>CSC</sup>, le Western Blot confirme la diminution d'expression de ces protéines après traitement au DCA (le ratio passe de 0,7 à 0,4 pour Stat3 et de 1 à 0,5 pour Sox2).

Afin de déterminer si, en absence de DCA, l'interaction entre Oct4 et PKM2, bien que faible, pouvait avoir une incidence sur l'activité transcrptionnelle d'Oct4, le niveau d'expression des 4 gènes cibles d'Oct4 précédemment décrits a été mesuré par PCR dans les cellules P7<sup>CSC</sup>, transfectées avec un sh scramble ou dirigé contre les isoformes M1et M2 de la pyruvate kinase.



Figure 44: Effet des shRNA dirigés contre les isoformes M1 et M2 de la pyruvate kinase sur le niveau d'expression de gènes-cibles d'Oct4 (qPCR)

Dans ces populations cellulaires, le niveau d'expression de *Sox2*, *Gata6*, *Stat3* et *Taldo* n'est pas modifié (figure 44). La diminution d'expression de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase ne modifie pas l'expression des 4 gènes cibles d'Oct4 analysés par qPCR, par rapport à celle mesurée dans les P7<sup>CSC</sup> transfectées avec un sh scramble. L'interaction entre PKM2 et Oct4, faiblement présente dans les P7<sup>CSC</sup> en absence de DCA (détectable par immunoprécipitation et Olink), ne semble donc pas influencer

l'activité transcriptionnelle d'Oct4. Cependant, le renforcement de cette interaction serait une des réponses cellulaires au DCA dans les neurosphères cancéreuses.

Le traitement des P7<sup>CSC</sup> au DCA induisant une diminution de la fonction transcriptionnelle d'Oct4, nous nous sommes alors intéressés aux répercutions possibles au niveau cellulaire.

## 4- DCA et différenciation des cellules souches cancéreuses de rat

Oct4 est un facteur de transcription ayant un rôle essentiel dans le caractère souche des cellules. Moduler son activité transcriptionnelle devrait, logiquement, entraîner une modification dans le caractère souche des cellules.

En effet, en culture, les P7<sup>CSC</sup> qui normalement poussent sous forme de neurosphères en milieu défini, se mettent à adhérer au plastique des flasques au bout de 48 heures de traitement avec le DCA (1 mM) (figure 28c). Ce changement de morphologie suggère qu'en présence de DCA, les P7<sup>CSC</sup> se différencient. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons quantifié le niveau d'expression de différents marqueurs : la nestine, un marqueur de cellules souches neurales, la GFAP, marqueur d'astrocytes, Tuj, marqueur de neurones et Rip, marqueur d'oligodendrocytes.



Figure 45: Expression relative (PCR quantitative) de la nestine dans les NSC, les C6<sup>CSC</sup> et les P7<sup>CSC</sup> suite à un traitement au DCA (1 mM, 48h). \* signifie p<0,05 (t-test)

La nestine a été analysée par PCR quantitative et les valeurs ont été rapportées à celles d'un gène de ménage : l'ubiquitine (figure 45). Les résultats montrent que dans les  $C6^{CSC}$  et les  $P7^{CSC}$  le traitement au DCA induit une diminution importante de l'expression de la nestine (le ratio [DCA/CT] est de 0,5 pour les  $C6^{CSC}$  et de 0,4 pour les  $P7^{CSC}$ , alors

qu'il est de 1 pour les NSC). Afin de confirmer ce résultat obtenu par PCR quantitative, des analyses par cytométrie en flux ont été réalisées sur les NSC et les P7<sup>CSC</sup> traitées ou non avec du DCA (1 mM, 48h).



Figure 46: Analyse par cytométrie en flux de l'évolution des marqueurs nestine, GFAP, Tuj et Rip dans les NSC et les P7<sup>CSC</sup> après un traitement au DCA (1mM, 48h)

Les résultats (figure 46) mettent en évidence que pour les NSC, le DCA ne modifie pas l'expression de ces 4 marqueurs : le pourcentage de cellules positives pour la nestine est d'environ 61%, pour GFAP de 27%, pour Tuj de 33% et pour Rip de 31%. Au contraire, pour les P7<sup>CSC</sup>, l'expression de 3 de ces marqueurs est fortement modifiée par un traitement au DCA. En effet, le pourcentage de cellules positives passe de 60% à 24% pour la nestine, confirmant les résultats obtenus par PCR quantitative. De surcroît, le pourcentage de cellules positives pour les marqueurs de cellules différenciées que sont Tuj et Rip augmente fortement : de 15 à 46% pour Tuj et de 1 à 72% pour Rip. Le marqueur d'astrocyte GFAP ne semble pas être modifié par le traitement au DCA : le pourcentage de cellules positives pour ce marqueur reste autour de 60%.

Le DCA induit un changement morphologique des neurosphères cancéreuses en culture et entraîne également une modification des marqueurs de cellules souches et différenciées, *in vitro*. Afin de valider cet effet différenciant *in vivo*, 50 000 cellules P7<sup>CSC</sup> sont injectées en sous-cutané dans des souris nudes (dans les 2 flancs). Ces souris sont ensuite réparties en 2 groupes (5 souris par groupe) : un groupe contrôle et un groupe recevant du DCA dans l'eau de boisson (0,075g/L). La première différence observée entre ces 2 groupes est que la croissance tumorale est plus faible chez les souris traitées avec du DCA (taille moyenne de la tumeur à 40 jours : 680 mm<sup>3</sup> pour le groupe contrôle versus 320 mm<sup>3</sup> pour le groupe traité).

Afin de mettre en évidence un éventuel effet du DCA sur la différenciation, les souris sont sacrifiées quarante jours après injection, les tumeurs récupérées, fixées dans du paraformaldéhyde (4%), montées dans un bloc de paraffine et coupées. Le niveau d'expression de la nestine, de GFAP et de Tuj est alors regardé par immunohistochimie.



Figure 47: Analyse par immunohistochimie de l'évolution des marqueurs nestine, GFAP et Tuj dans des tumeurs induites par injection de P7<sup>CSC</sup> dans des souris nudes après un traitement au DCA (0,075g/L, 40j)

Ces immunohistochimies (figure 47) mettent en évidence que l'expression de la nestine est plus faible dans les tumeurs issues de souris traitées avec du DCA. De même, l'expression du marqueur Tuj est fortement augmentée dans ces souris. L'expression de la GFAP semble également légèrement augmentée. Ces résultats *in vivo* confirment bien les expériences de cytométrie en flux réalisées sur des cellules en culture. Le DCA semble donc capable d'induire la différenciation des P7<sup>CSC</sup> *in vitro* et *in vivo*, notamment via l'interaction de PKM2 et d'Oct4.

5- La diminution d'expression d'Oct4 entraîne une modification du métabolisme des CSC et de leur réponse au DCA et 2DG

Afin de valider le rôle d'Oct4 comme cible du DCA, les P7<sup>CSC</sup> ont été transfectées avec 4 shRNA contre cette protéine et avec un shRNA contrôle (scramble). Le niveau d'expression d'Oct4 a été mesuré dans ces différentes populations par Western Blot à partir d'extraits protéiques totaux.



Figure 48: Validation de la diminution d'expression d'Oct4 par Western Blot

Les résultats (figure 48) mettent en évidence que le seul shRNA réussissant à éteindre en partie Oct4 est le shRNA numéro 28. Il sera donc utilisé préférentiellement par la suite, ainsi que le shRNA 48, qui lui n'éteint pas du tout cette protéine (contrôle négatif). Afin de valider l'extinction partielle d'Oct4 dans nos cellules, l'expression de ses gènes-cibles a été mesurée par PCR quantitative et les valeurs ont été rapportées à celles d'un gène de ménage : l'ubiquitine. Les valeurs relatives ont été calculées par la méthode des  $\Delta\Delta$ CT en utilisant comme cellules de référence pour chaque population les cellules transfectées avec le shRNA scramble.



Figure 49: Effet des shRNA dirigés contre Oct4 sur le niveau d'expression de gènes-cibles d'Oct4 (QRT-PCR). Le shRNA 28 est en gris et le 48 en blanc. \* signifie p<0,05 (t-test)

La figure 49 montre que même si l'extinction de Oct4 n'est que partielle dans les cellules transfectées avec un shRNA anti-Oct4-28, l'expression de ses gènes-cibles est fortement diminuée pour *Stat3*, *Gata6* et *Sox2*. La quantité d'Oct4 dans une cellule est fortement régulée et même une faible modification semble entraîner une différenciation dans les cellules souches embryonnaires. C'est pourquoi il n'est pas surprenant que même une diminution partielle dans le niveau d'expression d'Oct4 dans nos cellules entraîne une diminution dans l'expression de certains de ces gènes-cibles. Cependant, l'expression de *Taldo* ne varie pas. De même le niveau d'expression de la PKM2 est inchangé dans les cellules transfectées avec un shRNA anti-Oct4-28. Or, le groupe de Tantin a récemment montré l'importance d'un autre membre de la famille Oct (i.e. Oct1) dans le métabolisme glycolytique des cellules cancéreuses (Shakya et al., 2009). Donc malgré le fait que la diminution d'expression d'Oct4 dans nos CSC ne semble pas affecter celle de l'aldolase et de la PKM2, nous nous sommes intéressés au métabolisme de ces cellules. Pour cela, nous avons dosé les activités pyruvate kinase et lactate déshydrogénase.



Figure 50: Dosage enzymatique de la pyruvate kinase et de la lactate déshydrogénase dans les P7<sup>CSC</sup> et les P7 transfectées avec les shRNA 28 et 48. \* signifie p<0,05 (t-test)

En ce qui concerne la pyruvate kinase, on remarque que même si le niveau d'expression de la PKM2 n'est pas modifié dans les cellules transfectées, son activité enzymatique l'est néanmoins (figure 50). En effet, dans les conditions contrôles (en milieu défini), son activité enzymatique est multipliée par 5 par rapport aux P7<sup>CSC</sup> et aux P7 transfectées avec le shRNA 48. De même, la diminution d'Oct4 dans ces cellules entraîne une perte de réponse au DCA. Ainsi, alors que les 2 autres types cellulaires augmentent leur activité enzymatique en présence de DCA, ces cellules gardent une activité constante. Il faut noter également que les P7 transfectées avec le shRNA 48 répondent identiquement aux P7<sup>CSC</sup>.

Pour l'activité LDH, on remarque tout d'abord que les P7 transfectées avec le shRNA 48 ont un profil identique à celui des P7<sup>CSC</sup>: activité LDH de base élevée et diminution de cette activité en présence de DCA ou de 2DG (figure 50). Par contre, les cellules transfectées avec le shRNA 28 ont une activité LDH diminuée de moitié en conditions contrôles par rapport aux 2 autres types cellulaires et cette activité n'est pas modifiée par l'ajout de drogues tels que le DCA ou le 2DG.

Oct4 semble bien avoir un rôle sur le métabolisme des CSC car la diminution de son expression entraîne une modification de l'activité d'enzymes impliquées dans l'effet Warburg.

Au vu de ces résultats, nous nous sommes également demandé quel pouvait être l'effet d'un traitement au 2DG sur ces cellules. Pour cela, du 2DG (25mM, 24h) a été ajouté dans le milieu de culture et la viabilité/prolifération a été mesurée par un test d'exclusion au bleu trypan.



Figure 51: Viabilité des P7<sup>CSC</sup> et P7 transfectées avec le shRNA 28 et 48, traitées avec du 2DG (25mM, 24h). \*\* signifie p<0,01 (t-test)

La figure 51 montre que le 2DG entraîne une diminution du nombre de cellules pour les P7<sup>CSC</sup> ainsi que pour les P7 transfectées avec le shRNA 48 (respectivement 60 et 65% de cellules viables). Au contraire, les P7 transfectées avec le shRNA 28 ne sont que peu sensibles au 2DG (90% de cellules viables), ce qui laisse supposer que leur métabolisme est moins glycolytique. Cependant, des expériences d'oxygraphie devraient être réalisées afin de compléter ces données.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la réponse de ces cellules à l'Etoposide et au co-traitement DCA-Etoposide. Pour cela, les cellules ont été traitées comme précédemment (Cf. Résultats, partie B).



Figure 52: Viabilité des P7<sup>CSC</sup> et P7 transfectées avec le shRNA 28 et 48, traitées avec du DCA (1 mM, 48h), de l'Etoposide (50μM, 12h) ou co-traitées avec Etoposide et DCA. \*\* signifie p<0,01 (t-test)

Les P7 transfectées avec le shRNA 48 réagissent de la même façon que les P7<sup>CSC</sup> (figure 52). L'Etoposide seul modifie faiblement la viabilité, cependant un co-traitement DCA-Etoposide diminue le nombre de cellules vivantes (de 93 à 70%). En revanche, les cellules transfectées avec le shRNA 28 sont sensibles à un traitement à l'Etoposide (75%

de viabilité) et le co-traitement DCA-Etoposide ne modifie pas cette viabilité. La diminution d'expression d'Oct4 dans les P7<sup>CSC</sup> semble donc bien inhiber l'effet du DCA (au niveau métabolique aussi bien qu'au niveau apoptotique), faisant d'Oct4 un médiateur important de l'action de cette drogue.

De plus, les cellules transfectées avec le shRNA 28 forment moins de neurosphères en milieu défini. Des expériences de dilutions limites (identiques à celles décrites dans la partie A des résultats) nous ont permis d'estimer la proportion de cellules souches/progéniteurs dans ces populations. Les P7 transfectées avec un sh scramble contiennent en moyenne une cellule souches/progéniteur pour 40 cellules, alors que les cellules transfectées avec le shRNA 28 n'en contiendraient aucune. De plus, les cellules transfectées avec le shRNA 28 expriment moins le marqueur nestine et surexpriment les marqueurs Tuj, GFAP et Rip, que ces même cellules transfectées avec un shRNA scramble (figure 53).



Figure 53: Analyse par cytométrie en flux des marqueurs nestine, GFAP, Tuj et Rip dans les P7<sup>CSC</sup> transfectées avec un shRNA scramble (bleu) ou le shRNA 28 (vert).

Le fait que les cellules exprimant plus faiblement Oct4 soient d'une part plus différenciées (l'expression du marqueur nestine passe de 46 à 13%, celle de Tuj de 8 à 37%, celle de la GFAP de 20 à 80% et celle de Rip de 13 à 85%) et d'autre part, plus sensibles à l'apoptose induite par l'Etoposide, n'est pas sans rappeler les données du groupe de Piccirillo sur les BMP4 et le fait que l'induction de la différenciation des cellules souches diminue leur résistance à l'apoptose (Piccirillo et al., 2006).

# DISCUSSION
## A- Marqueurs et voies de signalisation identifiés dans les neurosphères cancéreuses de rat

Comme dans de nombreux cancers (leucémie myéloïde aiguë (Lapidot et al., 1994), sein (Clarke et al., 2006), prostate (Patrawala et al., 2006), ...), des cellules souches cancéreuses ont été identifiées dans les gliomes, cellules qui seraient responsables de l'initiation de la tumeur et de la récurrence après les différents traitements. La caractérisation de ces cellules est à l'heure actuelle fortement débattue, car il n'existe pas de marqueurs universellement admis.

Dans les gliomes, la présence de cellules souches a été mise en évidence par différents groupes (Galli et al., 2004, Singh et al., 2004). Elles sont caractérisées par leur capacité à former des neurosphères en milieu défini (capacité d'auto-renouvellement) et par le fait qu'elles peuvent se différencier, le plus souvent de façon aberrante, en différents lignages (capacité de différenciation), récapitulant ainsi les propriétés des cellules souches normales. Ces CSC, comme les NSC, peuvent ainsi se différencier en astrocytes, oligodendrocytes et neurones (Galli et al., 2004, Singh et al., 2004).

Les cellules utilisées au cours de cette étude, issues de tumeurs chimio-induites chez le rat (P7 et M7, injection d'éthyl-nitrosurée dans une femelle gestante) ainsi que la lignée cellulaire C6, sont capables de former des neurosphères en milieu défini. Des expériences de dilutions limites nous ont permis d'estimer la proportion de cellules souches-progéniteurs dans ces cellules (figure 24b). Bien que plus faible que chez les NSC, cette proportion reste non négligeable et comparable à ce qui est couramment retrouvé (Kondo et al., 2004). De plus, lorsqu'on induit la différenciation de ces neurosphères, on obtient des cellules exprimant les marqueurs GFAP (astrocytes), Tuj (neurones) et Rip (oligodendrocytes) (annexe 11). Cependant, cette différenciation est aberrante et incomplète car ces cellules expriment en même temps les marqueurs Tuj, Rip et GFAP et sont morphologiquement différentes des cellules différenciées non cancéreuses.

Une autre caractéristique essentielle à la définition de CSC est leur potentiel tumorogénique élevé. En effet, elles sont capables d'induire des tumeurs en sous-cutané ou dans le cerveau d'animaux immunodéprimés à partir de peu de cellules injectées (Singh et al., 2003, Singh et al., 2004, Bao et al., 2006). Nous avons vérifié cette propriété en injectant  $5.10^3 \text{ P7}^{\text{CSC}}$  dans le flanc de souris nudes, ce qui a entraîné le développement rapide de tumeurs, alors que ces mêmes cellules cultivées en milieu complet (favorisant la différenciation) n'induisent pas ou peu de développement tumoral (figure 24e).

Les cellules souches de gliome ont également été triées sur la base du marqueur CD133 (Singh et al., 2004, Bao et al., 2006). L'avantage de ce marqueur est qu'il est membranaire, il permet donc un tri a priori des CSC. Cependant, ce marqueur est sujet à une controverse importante. En effet, il est surexprimé dans les cellules ayant subi des épisodes hypoxiques, car sous la dépendance de HIF (Matsumoto et al., 2009, Beier et al., 2007). D'autres marqueurs cellulaires, connus comme des marqueurs de cellules souches (ex : Oct4, Sox2, Musashi, Bmi-1 ou Nanog), ou de NSC (ex : la nestine), peuvent être utilisés pour définir les cellules souches cancéreuses de gliomes. Ainsi, l'expression de la nestine a été corrélée avec un fort grade de malignité dans les tumeurs cérébrales (Dahlstrand et al., 1992) et de ce fait avec la présence de CSC. En ce qui concerne Bmi-1, il a été montré que son inhibition entraîne une forte diminution de la prolifération et de l'auto-renouvellement des CSC de gliomes (Godlewski et al., 2008). Oct4 est également exprimé dans les gliomes et sa surexpression augmente l'expression de la nestine, tout en diminuant celle de la GFAP (Du et al., 2009). Il semble donc que son expression, et par voie de conséquence celle de Sox2 et de Nanog, soit essentielle à la survie des CSC.

Afin de caractériser nos neurosphères cancéreuses, nous avons quantifié l'expression des marqueurs dits souches dans les neurosphères et dans ces mêmes cellules cultivées en milieu complet. Nous avons pu mettre en évidence que les neurosphères cancéreuses surexprimaient les marqueurs Oct4, Oct1, Nanog, Sox2, Musashi, Bmi-1 ainsi que la nestine (figure 24c, Annexe1). Cependant, ces marqueurs sont exprimés non seulement dans les CSC mais également dans les NSC, ce qui rend difficile leur utilisation pour cibler les CSC *in situ*. De plus, ces marqueurs ne sont pas membranaires, donc ne permettent pas d'enrichissement en CSC, mais seulement une validation de la proportion de CSC dans une population donnée. D'autres marqueurs membranaires tels que le CD15 (Son et al., 2009), L1CAM (Bao et al., 2008) ou encore A2B5 (Ogden et al., 2008, Tchoghandjian et al., 2010) sont également utilisés pour caractériser les CSC.

Néanmoins, aucun marqueur n'a réellement été validé à l'heure actuelle et les seuls véritables critères reconnus sont ceux de formation de neurosphères en série *in vitro* ou l'induction de tumeurs avec peu de cellules *in vivo*. Il faut enfin remarquer que la proportion de cellules souches retrouvée dans une même lignée cellulaire varie fortement selon la méthode utilisée. En effet, en ce qui concerne la lignée cellulaire C6, 86,5% des cellules expriment le marqueur CD133, 4,21% la nestine et seulement 0,4% des cellules sont isolées dans la fraction « side-population » (SP fraction) (Mabel, 2010).

Dans cette étude, nous avons montré que les cellules issues de tumeurs chimioinduites ainsi que la lignée cellulaire C6 sont capables de former des neurosphères en série en milieu défini, de se différencier en astrocytes, oligodendrocytes et neurones *in vitro* et d'induire la formation de tumeurs dans des animaux immunodéprimés *in vivo*. De plus, ces neurosphères surexpriment des marqueurs souches tels que Oct4, Oct1, Nanog, Musashi, Sox2 ou Bmi-1. Nous en avons donc déduit que ces populations cancéreuses contenaient des cellules souches.

Bien que l'origine des CSC ne soit pas connue (NSC, progéniteur, cellule différenciée ?), ces cellules semblent avoir de nombreux marqueurs et voies de signalisation en commun avec les NSC. L'avantage principal du modèle murin que nous avons choisi d'utiliser réside dans le fait qu'il nous a permis d'établir une comparaison entre neurosphères normales et cancéreuses.

Cette comparaison nous a permis de mettre en évidence une caractéristique essentielle des CSC. Ces dernières, tout comme les cellules cancéreuses non souches, présentent un métabolisme particulier, connu sous le nom d'effet Warburg (Warburg, 1956). En effet, l'analyse protéomique des neurosphères normales et cancéreuses montre que les CSC présentent une surexpression de certaines enzymes de la glycolyse (énolase, PKM2, GAPDH, LDH) ainsi qu'une diminution d'expression d'enzymes impliquées dans le cycle de Krebs (isocitrate déshydrogénase, malate déshydrogénase). Ce métabolisme particulier a été confirmé *in vitro* (figure 27a): les CSC prolifèrent peu en absence de glucose, contrairement aux NSC qui prolifèrent identiquement quel que soit le substrat présent dans le milieu de culture (glucose, galactose ou pyruvate).



Figure 54: Modification du métabolisme cellulaire dans les cellules cancéreuses. Glc, glucose ; HK, hexokinase ; 3-PG, 3-phosphoglycérate ; GF, facteur de croissance ; SREBP, sterol-regulatory element binding protein ; ACL, ATP citrate lysase ; ACC, acetyl-CoA carboxylase ; FAS, fatty acid synthase ; FA, acide gras. D'après Fritz and Fajas, 2010.

Ce changement métabolique (figure 54) a été intensément étudié dans les cellules cancéreuses non souches et plusieurs hypothèses ont été avancées. La première hypothèse, suggérée par Otto Warburg lui-même, est que les cellules cancéreuses présenteraient un défaut au niveau de leurs mitochondries (Warburg, 1956). Cette hypothèse est aujourd'hui nuancée : même si certaines cellules cancéreuses présentent effectivement des défaillances mitochondriales, la majorité d'entre elles ont des mitochondries fonctionnelles (Ding et al., 2010). En ce qui concerne les cellules présentées dans cette étude, l'analyse des complexes mitochondriaux (Western Blot et activité enzymatique) montre qu'ils sont complets et actifs. De plus, en présence d'un découplant de la chaîne respiratoire (FCCP, figure 29a), on remarque que les cellules utilisent de l'oxygène pour maintenir leur potentiel mitochondrial. Même si la présence de mutations mitochondriales n'a pas été étudiée dans ces cellules, il semble que leurs mitochondries soient fonctionnelles, mais inutilisées. Un mauvais fonctionnement de la

chaine respiratoire mitochondriale est une des sources majeures de ROS (Reactive Oxygene Species). Or, ces derniers induisent la stabilisation des facteurs de transcription HIF, responsables de la surexpression de nombreuses enzymes de la glycolyse (Semenza, 2010). De plus, les dommages oxydatifs induits par les ROS sont probablement la source majeure d'instabilité au niveau du génome mitochondrial, entraînant des dysfonctionnements au niveau de la chaîne respiratoire (Gogvadze et al., 2010). Dans nos CSC, la quantité de ROS est plus faible que dans les NSC (figure 29c), les ROS ne semblent donc pas avoir de rôle dans la modification métabolique.

L'hypothèse la plus globalement acceptée est que le microenvironnement tumoral a un rôle prépondérant dans la « sélection » des cellules les mieux adaptées. En effet, lors de la croissance tumorale, les cellules cancéreuses proliférant de façon anarchique, des zones d'hypoxie apparaissent au sein de la tumeur, stabilisant les facteurs de transcription HIF (Hypoxia-Inducible Factor). Ces derniers peuvent être également directement activés par des oncogènes (Kroemer and Pouyssegur, 2008). Ces protéines vont activer la transcription de gènes impliqués dans la glycolyse (enzymes glycolytiques, transporteurs de glucose). Comme ces épisodes de stress hypoxiques sont récurrents au cours de la croissance tumorale, les cellules présentant un métabolisme glycolytique sont avantagées. En ce qui concerne les cellules utilisées dans cette étude, nous avons pu vérifier par Western Blot que HIF était surexprimé dans nos neurosphères cancéreuses, en normoxie (Annexe 8).

Cette surexpression de HIF en conditions normoxiques peut égalment être liée à des mutations sur des gènes régulant négativement ce facteur de transcription. Ainsi, des mutations sur certaines enzymes du cycle de Krebs (fumarate hydroxylase, succinate déshydrogénase) peuvent stabiliser HIF, via une inhibition des prolyl-hydroxylases par accumulation de succinate ou de fumarate (DeBerardinis et al., 2008a). Cependant, les mutations sur ces enzymes n'ont pas été recherchées au cours de ce travail. Récemment, l'isocitrate déshydrogénase (IDH), une autre enzyme du cycle de Krebs, a été montrée comme mutée (Arginine 132) dans au moins 70% des gliomes de bas grades (Yan et al., 2009). Or cette enzyme catalyse la réaction :

isocitrate  $\longrightarrow \alpha$ -cétoglutarate

et ce dernier est un cofacteur nécessaire aux prolyl-hydroxylases. Une des hypothèses avancées est que cette mutation entraînerait une perte d'activité de l'enzyme, une diminution d' $\alpha$ -cétoglutarate, une diminution d'activité des prolyl-hydroxylases et donc une stabilisation de HIF (Thompson, 2009). Dans nos cellules, IDH1 a été séquencé et aucune mutation n'a pu être détectée au niveau du codon codant pour l'arginine 132. La stabilisation de HIF dans les CSC ne semble donc pas être liée à IDH1. De plus, il a été montré dans les carcinomes rénaux que des mutations sur VHL inhibent la dégradation des protéines HIF par le protéasome (Semenza, 2010). Dans nos cellules, VHL n'a pas été séquencé, mais son niveau d'expression a été mesuré par QPCR (Annexe 9). Le niveau d'expression de VHL dans les CSC est entre 2 et 10 fois plus faible que dans les NSC. Cette faible expression pourrait, en partie expliquer la surexpression de HIF.

Enfin, la dernière hypothèse pour expliquer le changement métabolique des cellules cancéreuses concerne les oncogènes/gènes suppresseurs de tumeurs. Ainsi, le facteur de transcription p53 a été récemment impliqué dans le contrôle du métabolisme, via TIGAR, qui active la production d'ATP par les phosphorylations oxydatives (Green and Chipuck, 2006). De plus, p53 induit la transcription de la cytochrome c oxydase, une sous-unité du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (Bensaad et al., 2006). Enfin, la perte de p53 stabilise le facteur de transcription HIF (Kaur et al., 2005). La perte de p53 induit donc une modification du métabolisme des cellules. Dans les CSC utilisées pour cette étude, le séquençage de p53 a mis en évidence qu'il était sauvage. Cependant, son niveau d'expression, mesuré par QPCR est 10 à 20 fois plus faible dans les CSC que dans les NSC. De même, certains oncogènes peuvent également entraîner une modification du métabolisme. Ainsi, la mutation de Ras favorise un métabolisme glycolytique (Hsu and Sabatini, 2008) et c-Myc, un autre oncogène entraîne la transcription de plusieurs gènes impliqués dans ce métabolisme (Gordan et al., 2007). Cependant, ni le niveau d'expression ni des mutations éventuelles de ces oncogènes n'ont été analysés dans nos cellules.

Dans les CSC, la reprogrammation métabolique semble être la conséquence d'événements oncogéniques non métaboliques tels que l'activation constitutive de HIF, la surexpression d'oncogènes tels que c-Myc ou la mutation/diminution de p53 (Figure 55). mTOR semble avoir un rôle important dans ce mécanisme, d'une part parce qu'il a un

rôle central pour la prolifération cellulaire (senseur des signaux des facteurs de croissance, de la disponibilité en nutriments et en oxygène) et d'autre part parce qu'il stimule la transcription coiffe-dépendante de HIF ou de c-Myc (Tennant et al., 2009).



### Figure 55: Bilan des régulations métaboliques retrouvées dans les CSC. Adapté de Kroemer and Pouyssegur, 2008.

La voie de la glycolyse semble donc être une bonne cible thérapeutique pour éliminer à la fois les cellules cancéreuses souches et non souches. En outre, il a récemment été montré l'importance du métabolisme de la glutamine via le cycle de Krebs dans les gliomes (DeBerardinis et al., 2007) : elle permet en effet de reconstituer le stock d' $\alpha$ cétoglutarate au niveau du cycle de Krebs et fournit ainsi de nouveaux intermédiaires réactionnels (ainsi que le NADPH, via la transformation du malate en pyruvate) pour les différentes synthèses nécessaires à la prolifération cellulaire. Inhiber ces métabolismes particuliers serait donc intéressant. En effet, ce changement métabolique apporte un avantage conséquent aux cellules cancéreuses : meilleure adaptation à l'environnement et aux changements de pression d'oxygène récurrents, disponibilité accrue en substrats pour les synthèses lipidiques et nucléotidiques nécessaires à la prolifération anarchique de ces cellules et résistance accrue à l'apoptose. L'inhibition de la glycolyse par une carence en nutriments tuerait préférentiellement les cellules cancéreuses, puisque ces cellules présentent des altérations métaboliques, notamment en ce qui concerne le glucose et la glutamine.

Actuellement, l'effet Warburg est utilisé pour la détection non invasive de tumeurs par tomographie par émission de positrons avec le 2DG (2 déoxyglucose, analogue du glucose) marqué au fluor 18. Le 2DG est également utilisée dans des essais cliniques chez des patients atteints de gliomes (Mohanti et al., 1996, Singh et al., 2005). Ces études ont notamment montré que le 2DG augmente la réponse des tumeurs à la radio et à la chimiothérapie (Simons et al., 2007). Au niveau cellulaire, le 2DG inhibe la prolifération des cellules tumorales in vitro et sur certaines tumeurs, est capable de déclencher l'apoptose (Dwarakanath and Jain, 2009). Sur nos cellules, le 2DG semble diminuer la prolifération des CSC, tout en ne modifiant que faiblement celle des NSC (figure 27b). Cependant, aucune activité caspase n'a pu être mise en évidence après traitement au 2DG. De même, des Western Blot montrent que les protéines pro-apototiques Bax, Bad, Puma et Noxa ne sont pas modifiées par ce traitement. Au niveau métabolique, le 2DG diminue l'activité LDH des CSC sans modifier celle des NSC, mais cette drogue n'a aucun effet sur l'activité pyruvate kinase ou sur la production de ROS dans ces cellules. Le 2DG semble donc bien ralentir la prolifération des CSC, mais ne semble pas capable d'induire l'apoptose, ni de changement métabolique important. Ces données sont en accord avec celles publiées par le groupe de Haas-Kogan sur des lignées de glioblastomes humaines (Jelluma et al., 2006), qui a mis en évidence que l'ajout de 2DG dans le milieu de culture de ces cellules entraîne une diminution du niveau d'ATP et un arrêt du cycle cellulaire, mais pas d'apoptose.

Au contraire, une carence en glucose semble entraîner la mort des cellules cancéreuses. Ainsi, il a été montré que cette carence peut potentialiser l'apoptose induite par les récepteurs de mort, tels que TRAIL (Pradelli et al., 2010), induire un stress oxydatif et une apoptose mitochondriale via une production de ROS (Jelluma et al., 2006) ou induire une apoptose atypique, médiée par la caspase 8 (Caro-Maldonado et al. 2010).

L'ensemble de ces données suggère une dépendance forte au glucose des cellules cancéreuses souches et non souches. De façon intéressante, il a été récemment montré

que des molécules anti-diabétiques, ayant un effet hypoglycémiant, comme la metformine, associées avec des traitements chimiothérapeutiques classiques peut induire la mort des cellules cancéreuses souches et non souches de cancer du sein et bloquer la croissance tumorale (Hirsch et al., 2009).

La pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) est une des enzymes dont la transcription est activée par HIF (Kim et al., 2006). Cette enzyme inhibe par phosphorylation la pyruvate déshydrogénase (PDH), responsable de la catalyse du pyruvate en acétylcoenzyme A (Ac-CoA) et donc de l'arrivée de substrats au niveau de la mitochondrie. Le dichloroacétate (DCA) est une petite molécule capable d'inhiber la PDK et utilisée habituellement en clinique pour traiter certaines maladies mitochondriales (Stacpoole et al., 2008). Le groupe de Michelakis a récemment montré que le DCA était capable de modifier le métabolisme des cellules cancéreuses, de restaurer les phosphorylations oxydatives, d'entraîner la production de ROS et d'induire la mort de ces cellules par apoptose *in vitro* et *in vivo* (Bonnet et al., 2007, Michelakis et al., 2010). Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de cette molécule sur les CSC de gliomes et sur les NSC.

#### **B-** Dichloroacétate et cellules souches cancéreuses

Le changement métabolique mis en évidence dans les CSC leur apporte non seulement un avantage prolifératif du fait de la mise à disposition de substrats pour les synthèses de lipides ou de nucléotides, mais également une résistance à l'apoptose. Les CSC utilisées dans cette étude présentent une résistante importance à l'apoptose induite par l'Etoposide, les irradiations ou l'ABT-737, un inhibiteur des liaisons entre les protéines à domaine BH3 et Bcl-2/xl (figure 30). Or, cette résistance à l'apoptose peut être en partie due au changement métabolique retrouvé dans les cellules cancéreuses.

En effet, il a été montré que les hexokinases (HK) sont capables, notamment suite à un signal via les protéines kinases Akt, de transloquer au niveau de la membrane externe des mitochondries. Elles sont alors capables de bloquer les sites de liaison des protéines pro-apoptotiques Bak à la mitochondrie (Pastorino et al., 2002). Les protéines HK, en

plus de catalyser une étape essentielle de la glycolyse, peuvent donc entraîner une diminution de l'induction de l'apoptose.

D'autre part, une autre enzyme de la glycolyse pourrait avoir un rôle dans la résistance à l'apoptose : la Glycéraldéhyde-3P-déshydrogénase (GAPDH). Elle est surexprimée dans de nombreux cancers (Altenberg and Greulich, 2004) et corrélée avec une mauvaise survie des patients. L'analyse protéomique comparative entre les neurosphères neurales et cancéreuses que nous avons réalisée a mis en évidence sa surexpression dans les CSC. Cette enzyme est capable d'induire l'autophagie dans les cellules cancéreuses et a un rôle dans la réparation de l'ADN après chimiothérapie (Colell, Green and Ricci, 2009). Cependant, la GAPDH a également été montrée comme étant pro-apoptotique, notamment dans les neurones en culture (Ishitani et al., 1996) et son rôle au cours de la tumorogénèse reste encore ambigu.

Comme d'autres drogues ciblant la glycolyse, le DCA semble très prometteur pour inhiber la prolifération tumorale in vivo et in vitro (Bonnet et al., 2007, Michelakis et al., 2010). Le groupe de Michelakis montre que le DCA augmente l'oxydation du glucose au niveau de la mitochondrie (levée d'inhibition de la pyruvate déshydrogénase et arrivée de substrats à la mitochondrie), induisant de ce fait une repolarisation de la membrane mitochondriale des cellules cancéreuses et une production de ROS. Ce groupe met donc en évidence que les mitochondries des cellules cancéreuses qu'ils utilisent sont fonctionnelles mais inutilisées et que le métabolisme glycolytique de ces cellules serait responsable de leur résistance à l'apoptose. Au cours de cette étude, nous avons pu montrer que le DCA n'a pas d'effet sur le métabolisme des NSC (activité LDH, oxygraphie, activité PK (figures 28a, 29, 38)). Cependant, cette molécule modifie sensiblement le métabolisme des CSC : diminution de l'activité LDH (figure 28a), augmentation de l'activité PK (figure 38), mais semble insuffisante pour « forcer » ces cellules à oxyder le pyruvate, puisque même si la quantité de substrats au niveau de la mitochondrie semble augmenter (augmentation de la respiration sous FCCP), la respiration basale ne l'est pas (figure 29a) et la quantité de ROS produite est inchangée (figure 29c).

Dans les CSC, un traitement au DCA est également corrélé avec une augmentation de l'expression de p53, de Foxo3 et de certains de leur gènes-cibles : Puma, Bad et Noxa

(figures 31-32). p53 est connu pour réguler la transcription de nombreuses protéines proapoptotiques telles que les protéines à domaine BH3-seul Puma et Noxa (Nakano and Vousden, 2001). De plus, p53 peut non seulement induire la transcription de Bax, mais également l'activer directement au niveau cytoplasmique (Chipuk et al., 2004). Foxo3, un autre facteur de transcription, considéré également comme un suppresseur de tumeur, régule la transcription de Bim et est capable d'interagir avec p53 en réponse à des stimuli de stress ou de carence nutritive (Fu and Tindall, 2008). Ces deux protéines ont donc un rôle important dans l'induction de l'apoptose et sont souvent dérégulées dans les cellules cancéreuses.

Dans les gliomes, il a été montré que la famille Foxo est inhibée par la voie Akt-PI3K, souvent suractivée dans ces cancers (Fu and Tindall, 2008). Enfin, il a été montré que la radiorésistance des CSC de gliome est corrélée à la surexpression d'une protéine de la famille des Sirtuines, Sirt1 (Bao et al., 2006, Chang et al., 2009). Cette protéine est une histone désacétylase NAD-dépendante (HDAC) et un médiateur essentiel de la longévité en cas de restriction calorique (Chang et al., 2009). Sirt1, qui est majoritairement nucléaire, se lie préférentiellement aux histones H1, H3 et H4 et désacétyle Bax, p53 et la famille de facteurs de transcription Foxo (Chang et al., 2009). Ainsi, elle a un rôle dans l'inhibition de l'apoptose et la tumorogénèse. Les Sirtuines sont dépendantes du NAD et il est possible que la modulation métabolique induite par le DCA soit suffisante pour modifier leur activité.

Bien qu'un traitement au DCA soit corrélé avec la surexpression de p53, Foxo3 et de certaines protéines à domaine BH3-seul, il est insuffisant pour activer directement Bax ou inhiber l'action des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et ainsi induire l'apoptose des CSC. Cependant, la surexpression de ces protéines semble potentialiser les CSC à la mort induite par l'Etoposide, les irradiations ou l'ABT-737.

En plus de son rôle bien connu dans l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire, p53 régule l'homéostasie énergétique dans les cellules, notamment via l'induction de l'autophagie (Jones and Thompson, 2009). De même, Foxo3 régule positivement la transcription de BNIP3, une protéine à domaine BH3-seul, impliquée dans la régulation de l'autophagie. Or sur les CSC, un traitement à l'Etoposide induit de l'autophagie, alors qu'un traitement DCA ou DCA plus Etoposide n'en induit plus (Annexe 10).

L'autophagie serait donc une autophagie de survie dans ces cellules et le fait de rajouter du DCA semble l'inhiber, bien que cela permette une surexpression de p53 et de Foxo3. L'inhibition de l'autophagie de survie par le DCA pourrait être une autre explication de la potentialisation de l'apoptose induite par un co-traitement DCA-Etoposide ou DCA-irradiations.

Le DCA, comme décrit précédemment, induit une modification du métabolisme des CSC, notamment une augmentation d'activité de la pyruvate kinase. Or, l'isoforme prédominante de cette enzyme dans les CSC est l'isoforme M2. Cette isoforme M2 est nécessaire à l'effet Warburg de par sa régulation allostérique (Christofk et al., 2008a). En effet, quand le niveau de fructose-1,6 bi-phosphate (FBP, intermédiaire de la glycolyse) est élevé, elle est capable de se tétramériser afin d'activer la transformation du phosphoénol-pyruvate (PEP) en pyruvate. Cependant, cette enzyme peut être également phosphorylée sur le résidu Tyr<sup>105</sup>, par des protéines à activité tyrosine kinase, notamment le récepteur au FGF (FGFR1) (Hitosugi et al., 2009). Cette phosphorylation entraîne sa dimérisation. La PKM2 est alors moins affine pour son substrat, permettant aux métabolites du glucose d'entrer dans des processus cataboliques et anaboliques nécessaires à la prolifération accrue des cellules tumorales, comme la voie de pentoses phosphates. La pyruvate kinase M2 peut également se lier avec le facteur de transcription Oct4 (Lee et al., 2008). Dans leur modèle, cette interaction se fait via le POU-domaine d'Oct4 (son domaine de liaison à l'ADN) et la région C-terminale de PKM2 et augmente le rôle de facteur de transcription d'Oct4.

Oct4 est normalement présent dans les cellules souches (cellules souches embryonnaires, fœtales et adultes). Cependant, ce facteur de transcription est aussi retrouvé dans les tumeurs, notamment dans les gliomes et son expression est augmentée proportionnellement au grade de la tumeur (Du et al., 2009). Récemment, il a été montré que Oct4 est sous la dépendance du facteur de transcription HIF-2 $\alpha$  (Covello et al., 2006), qui est stabilisé même en hypoxie faible (5% d'oxygène) et présent majoritairement dans les CSC, alors que HIF-1 $\alpha$  est présent dans les cellules cancéreuses souches et non souches et stabilisé par une hypoxie plus forte (<1% d'oxygène). HIF-2 $\alpha$ , en plus de d'augmenter la transcription d'Oct4 dans les CSC est capable de reprogrammer des

cellules cancéreuses en CSC via l'induction de l'expression de Nanog, c-Myc et Oct4 (Heddleston et al., 2009).

Les niches et en particulier la niche hypoxique semblent donc très importantes pour la survie des CSC, notamment dans le gliome. De nombreux groupes ont montré qu'une restriction en oxygène induit l'expression de marqueurs de cellules souches dans les gliomes (Covello et al., 2006, Matsumoto et al., 2009) ainsi qu'un changement métabolique (Kim et al., 2006, Semenza et al., 2010).

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que le DCA est capable de moduler l'activité de la PKM2, mais également de stimuler son interaction avec Oct4 (figures 39-40). Cependant, contrairement à ce qui avait été décrit précédemment (Lee et al., 2008), dans notre modèle, cette interaction diminue l'activité transcriptionnelle d'Oct4 (figure 42). Les CSC perdent leur capacité à former des neurosphères en milieu défini, l'expression de marqueurs de cellules souches tels que la nestine diminue alors que celle de marqueurs de cellules différenciés (GFAP, Tuj et Rip) augmente in vitro et in vivo (figures 45-46-47). Le DCA, en renforçant l'interaction entre Oct4 et PKM2 semble diminuer la proportion de cellules souches dans les populations cellulaires étudiées. Sox2 est un facteur de transcription également impliqué dans le maintien du caractère souche dans les cellules souches non cancéreuses, le plus souvent en association avec Oct4. Sox2 a été retrouvé dans des échantillons de gliome avec une proportion variable (de 6 à 80% des cellules seraient positives pour Sox2). Or Sox2 est nécessaire à la prolifération des cellules de gliome, aussi bien in vitro que in vivo (Gangemi et al., 2009). Sox2, Oct4 et Nanog étant partenaires pour maintenir un état indifférencié dans les cellules souches non cancéreuses, il n'est pas surprenant que ces trois protéines aient un rôle également dans le maintien de celui des CSC. L'effet du DCA sur Sox2 et Nanog n'a pas été mesuré, mais il serait intéressant de vérifier si la diminution du rôle de facteur de transcription d'Oct4 a un effet sur le niveau d'expression de Sox2 et Nanog.

De surcroît, le DCA modifie le niveau protéique de p53 et de Foxo3. Or ces protéines, en plus de leur rôle dans l'apoptose et l'autophagie, sont également capables d'agir sur la différenciation des cellules. PTEN et p53 sont impliquées dans l'autorenouvellement et la différenciation des CSC de gliomes. En effet, ces deux gènes sont souvent mutés ou dérégulés dans les gliomes et le groupe de Depinto a mis en évidence que l'inactivation de p53 et de PTEN favorise un état indifférencié associé avec une augmentation du potentiel d'auto-renouvellement et entraîne également une augmentation du niveau protéique de c-Myc (Zheng et al., 2008). Le niveau protéique de c-Myc a d'ailleurs été corrélé positivement avec le grade des gliomes. De plus, cette protéine est exprimée spécifiquement par les CSC et son expression est nécessaire pour la prolifération, la croissance et la survie de ces cellules. En effet, la perte de c-Myc dans les CSC inhibe la formation de tumeurs après injection des cellules dans des animaux immunodéprimés (Wang et al., 2008). Cependant, dans nos cellules souches neurales et cancéreuses, un traitement au DCA ne modifie pas le niveau d'expression protéique de c-Myc, analysé par Western Blot. En ce qui concerne la famille Foxo, son rôle dans la différenciation des CSC de gliome n'a pas été mis en évidence, mais elle contrôle la différenciation des pré-adipocytes, des myoblastes, des cellules  $\beta$  du pancréas et des thymocytes (Accili and Arden, 2004).

Les CSC de gliomes étant résistantes à l'apoptose induite par la chimio ou la radiothérapie, essayer de les différencier afin de lever cette résistance semble être une solution intéressante. Ainsi, le groupe de Kondo a montré que les CSC de gliome avaient perdu le facteur de transcription Sox11, un autre membre de la famille des SRY-related HMG box et que surexprimer Sox11 dans ces cellules induit une différenciation neuronale. Cette différenciation est associée à une diminution de la tumorogénèse et à une augmentation de la sensibilité des cellules aux molécules anti-cancéreuses comme l'Etoposide ou le Taxol (Hide et al., 2009). De même, il a été montré que les cellules de gliomes expriment les BMP (Bone Morphogenic Proteins) et leurs récepteurs (Piccirillo and Vescovi, 2006). Traiter ces cellules avec du BMP4 abroge leur capacité à former des tumeurs après transplantations en série dans des animaux immunodéprimés, via l'induction de leur différenciation en cellules ressemblant à des astrocytes.

Enfin, une nouvelle approche pour cibler les CSC pourrait être via les mi-RNA. En effet, les miR-124, miR-137 et miR-451 sont dérégulés dans les gliomes et en particulier dans les CSC (Cheng et al., 2010). La surexpression de ces mi-RNA inhibe la prolifération des CSC et induit leur différenciation. De même, il a récemment été montré dans les gliomes une corrélation négative entre l'isoforme M2 de la pyruvate kinase et le mi-RNA miR-326 (Kefas et al., 2010). Cependant, intégrer et stabiliser ces mi-RNA dans les cellules souches et non souches de gliome *in vivo* reste le problème majeur de cette thérapie.

Bien que l'isolation et la caractérisation des CSC de gliome soient controversées, ces CSC représentent une sous-population de cellules cancéreuses ayant de très fortes capacités d'invasion, d'angiogénèse et de résistance aux traitements anti-cancéreux. C'est pourquoi il est nécessaire de mettre en place de nouveaux traitements les ciblant plus particulièrement. Dans cette étude, nous avons mis en évidence que les cellules souches cancéreuses de gliome, à l'instar des cellules cancéreuses, présentaient un métabolisme glycolytique important. Le DCA est capable de modifier partiellement ce métabolisme et de potentialiser les CSC à la mort induite par l'Etoposide ou les irradiations. De même, un traitement au DCA dans les cellules souches cancéreuses est corrélé avecune surexpression de protéines à BH3-seul, ainsi que de p53 et de Foxo3. Enfin, nous avons montré que cette drogue induisait la différenciation des cellules souches cancéreuses, qui perdaient leur capacité à former des neurosphères *in vitro*, par le biais de l'interaction entre PKM2 et Oct4 (figure 56).

Cibler les facteurs de transcription impliqués dans le caractère souche des CSC est une idée intéressante. Cependant, ces facteurs de transcription sont également exprimés dans les cellules souches somatiques et notamment les NSC et sont essentiels pour les maintenir à l'état indifférencié. Le DCA semble néanmoins prometteur car il cible le métabolisme particulier des cellules cancéreuses et via ce métabolisme, induirait la différenciation des CSC. Cette molécule pourrait donc être intéressante en tant qu'adjuvant aux traitements classiques chez les patients atteints de gliome.



Figure 56: Schéma-bilan de l'action du DCA sur les cellules cancéreuses souches et non souches. Au niveau métabolique, le DCA active la PKM2, augmente la quantité de substrats disponibles au niveau de la mitochondrie et diminue la formation de lactate. Cependant, ce traitement semble insuffisant pour induire les phosphorylations oxydatives et une production de ROS. De plus, un traitement au DCA est corrélé avec une surexpression de p53 et de Foxo3, ainsi que de protéines à domaine BH3-seul : Bad, Puma et Noxa. Néanmoins, le DCA seul, est incapable d'induire l'apoptose des CSC, mais sensibilise ces cellules à l'apoptose induite par l'Etoposide ou les irradiations. Enfin, le DCA semble modifier le caractère souche des CSC en induisant leur différenciation via l'intéraction entre PKM2 et Oct4, facteur de transcription essentiel au maintien du caractère souche des cellules ES notamment.

## ANNEXES

Annexe 1: musashi 1 expression (Msi1) was assessed by qPCR as described in the experimental procedures section and normalized to ubiquitin. No expression was detected in adherent cells, whereas Msi1 was largely expressed in P7 and C6 neurospheres.



		<b>F</b>					
	accession number (UniProf)	MW (Da)	pi	number of peptides (MS/MS)	sequence coverage (%)	protein confidence index (%)	expression ratio CSC/NSC
Annexin A1 (=annexin l=lipocortin)	P07150	39147,1	6,97	10	19	99,19	1,6
Pyruvate kinase isozyme M1JM2	P11980	58294,1	6,63	26	47	100,00	4,7
Gelsolin precursor=brevin=actin depolymerizing factorADF (mouse)	P13020	86287,2	5,83	14	16	100,00	5,0
Moesin	035763	67867,9	6,16	35	41	100,00	4,7
Ezrin	P31977	69461,7	5,83	18	22	100,00	4,7
78 kda glucose-regulated prot	P6761	72473,5	5,07	34	54	100,00	1,5
Creatine kinase B-type	P07335	42983,4	5,39	12	36	100,00	0,5
Pyruvate kinase isozyme M1/M2	P11980	58294,1	6,63	14	19	100,00	2,8
L-caldesmon	Q62736	60661,8	6,34	16	20	100,00	2,4
Threonyl-IRNA synthase	Q5XHY5	81436,8	6,50	19	24	100,00	2,1
Far upstream element binding protein 2(FUSE BP 2)	Q99PF5	74465,6	6,38	16	20	100,00	2,1
hnRNPK	P61980	61229,6	5,39	10	22	100,00	2,0
D-3 phosphoglycerate deshydrogenase	O08651	57255,5	6,28	14	26	100,00	2,0
Lamin A	P48679	74563,9	6,54	18	21	100,00	1,9
WD repeat protein 1	Q5RKI0	66824,1	6,15	11	14	100,00	1,9
Alpha enolase	P04764	47440,4	6,16	10	60	100,00	1,8
Beta enclase	P15429	47326,4	7,08	11	26	100,00	0,5
Vimentin	P31000	53757,1	5,06	26	61	100,00	0,6
Cytokeraön 10	Q6IFW6	56698,6	5,10	11	17	100,00	0,6
50 kDa heat shock prot	P63039	61088,4	5,91	29	49	100,00	0,7
Cytokeratin 15	Q6IFV3	49011,2	4,80	7	14	100.00	1,5
Fructose-biphosphate aldolase C	P09117	39658,3	6,67	7	18	99.26	8,7
OFAP	P47819	49983.6	5,35	7	15	97,70	0.5
Protein disulfide isomerase A3	P11598	57043,9	5,88	16	30	100,00	1,5
Protein disulfide isometase &3	P11598	57043.9	5.88	22	40	100.00	1.5
Same M. mariesper colore hand TVD= 0.046	P29467	46602.3	RAR	10	26	100,00	2.7
Transistinase	P50107	RR341.0	7.23	21	20	100,00	2.5
0420H	P04797	36090.3	8.14	10	24	100,00	0.7
DAPPON	P04707	36090.3	8.14	17	36	100,00	1.8
Maasin	036762	67607.7	6.17	10	37	100.00	0.6
Dusaine desembate	OWNTTE	51016.1	5.56	10	24	100.00	2.6
Actin Q / Actin B	P63259/ P60711	41661,857	5,317	3	12	100,00	0,6
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein DO	093354	38191.9	7.61	2	26	100.00	1.0
Phosobouliterate kinase 1	P16617	44407.3	8.02	4	25	100.00	1.9
Actin G / Actin B	P632597 P60711	41661,65/ 41605,54	5,31 / 5,29	7	31	100,00	0,4
Olycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase (GAPDH)	P04797	35696,8	8,18	8	47	100,00	1,9
Isocitrate déshydrogénase subunit alpha	099N45	36682,2	5,72	2	12	100,00	0,4
L-lactate déshydrogénase chane B	P42123	36481,2	5,70	7	39	100,00	0,5
Malate déshydrogénase	098989	36351,9	6,16	7	42	100,00	ù,7
L-lactate déshydrogénase chaine A	P04642	36319,3	8,47	9	37	100,00	2,2
Proteasome subunit alpha type 4	P21670	29497,0	7,58	3	14	100,00	0,8
Nucleotide binding protein 2	Q68FS1	28926,3	5,79	2	12	100,00	0,7
VDAC1	O922L0	30624,3	8,63	3	23	100,00	0,2
Proteasome subunit alpha type 2	P17220	25795,4	7,12	7	- 44	100,00	0,7
TPR-repeat containing protein	060144	111258,0	5,97	2	12	96,10	0,7
DJ1=Park7	088767	19974,2	6,32	2	46	100,00	1,3
Glutathione Stransferase P	P04906	23307,7	7,30	6	39	100,00	3,3
UMP-CMP kinase	Q4HM73	22169,3	5,86	8	80	100,00	0,5
Stathmin	P13668	17157,3	5,77	6	64	100,00	0,2
Peroviredoxin 5	0912083	17034,7	6,73	3	24	100,00	4,8
	and the second sec		and the second second				

#### Annexe 2: identification of the 2D-DIGE differential spots.

Annexe 3: Origin of the primary cultures. Glioma primary cultures (P7) were obtained from Sprague-Dawley rats following antenatal ENU-induction as described in Pouliquen *et al.* (2008). Tumors were dissected and cultured in defined medium (DMEM (1 g/l glucose) medium containing 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, N2- and B27-supplement, 20 ng/ml EGF, 25 ng/ml bFGF, and 2  $\mu$ g/ml heparin). NSCs were obtained from 7 week-old Sprague-Dawley rat. Cells were treated according to the manufacturer's instructions (Stem Cell technologies, France) and plated at the density of 10<sup>5</sup> cells in T-25 cm<sup>2</sup> flasks in defined medium.



Annexe 4: Procedure of treatment of neural and cancer stem cells. The cells were plated in defined medium, with or without DCA (1 mM, 48h). Etoposide (50  $\mu$ M) was added for the last 12h. Irradiation was performed 24h after DCA treatment and the cells were collected at the end of the 48h.



Annexe 5: Bax/Bcl-xl ratio in neural and cancer stem cells. Immunoblot analysis monitoring Bax (2772, Cell Signaling) and Bcl-xl (610212, Pharmingen) protein levels in NSC, C6<sup>CSC</sup> and P7<sup>CSC</sup> cultures treated or not with DCA (1 mM, 48 h). Total protein extract were analysed and normalized to actin (MAB1501R, Chemicon). Quantification was performed with the ImageJ software.



Annexe 6: shRNA experiments.  $C6^{CSC}$  and  $P7^{CSC}$  cells were transfected by a plasmid encoding for a shRNA sequence targeting Bax. The sequence was selected using the programme siRNA target finder from Ambion (Applied Biosystems, France). The plasmid (pSilencer<sup>TM</sup>2.1-U6puro, Ambion) confers a resistance to puromycin, thus infected cells were selected with puromycin (1 µg/ml). The sequences of the oligonucleotides used for the cloning of the shRNA sequences (shBax1 and shBax2) are indicated in the table below. Cells transfected with a plasmid encoding for a non-targeting "sh-scramble" sequence are used as control cells.

	Sequence (sense)	Sequence (antisense)			
shBax1	5'- <b>GATCC</b> AGCACCACACCAGTCTGAT <b>TTCAAGAGA</b> ATCAGACTGGTGTGGTGCT <b>TTTTTTGGAAA</b> -3'	5'- <b>AGCTTTTCCAAAAAA</b> AGCACCACACCAGTCTGAT <b>TCTCTTGAA</b> ATCAGACTGGTGTGGTGCT <b>G</b> - 3'			
shBax2	5'- <b>GATCC</b> GATGAGGAAGAGATGGTGC <b>TTCAAGAGA</b> GCACCATCTCTTCCTCATC <b>TTTTTTGGAAA</b> -3'	5'- <b>AGCTTTTCCAAAAAA</b> GATGAGGAAGAGATGGTGC <b>TCTCTTGAA</b> GCACCATCTCTTCCTCATC <b>G</b> - 3'			

The efficiency of the shRNA-induced down-regulation of Bax was assessed by Western blot. The immunoblot shown is representative of 3 independent experiments.



Annexe 7: Increase of Foxo3 and p53 protein expression after DCA treatment. Immunoblot analysis of Foxo3 (07-695, Millipore, Molsheim, France) and p53 (554167, Becton Dickinson) protein levels in NSC,  $C6^{CSC}$  and  $P7^{CSC}$  cells treated or not with DCA (1 mM, 48 h).



Annexe 8: Niveau d'expression protéique de HIF1 $\alpha$  dans les NSC et les P7<sup>CSC</sup> rapporté au niveau d'expression de l'actine.







Annexe 10: Mesure d'autophagie sur les P7<sup>CSC</sup> par test MDH après traitement au DCA, à l'Etoposide, ou au DCA+Etoposide.



Annexe 11: Immunocytochime pour GFAP, Tuj et Rip sur les P7<sup>CSC</sup>, après différenciation d'une semaine sur lamelle de verre



GFAP

Tuj

Rip

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

#### **A-**

Accili, D., and Arden, K. C. (2004). FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. Cell *117*, 421-426.

Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 3983-3988.

Altenberg, B., and Greulich, K. O. (2004). Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. Genomics *84*, 1014-1020.

Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? Science 135, 1127-1128.

Altman, J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. Anat Rec 145, 573-591.

Alvarez-Buylla, A., and Lim, D. A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron *41*, 683-686.

Ambrosetti, D. C., Basilico, C., and Dailey, L. (1997). Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. Mol Cell Biol *17*, 6321-6329.

Ambrosetti, D. C., Scholer, H. R., Dailey, L., and Basilico, C. (2000). Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. J Biol Chem 275, 23387-23397.

Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G. Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell *118*, 149-161.

Avery, S., Inniss, K., and Moore, H. (2006). The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. Stem Cells Dev 15, 729-740.

Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev *17*, 126-140.

Azam, S., Jouvet, N., Jilani, A., Vongsamphanh, R., Yang, X., Yang, S., and Ramotar, D. (2008). Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase plays a direct role in reactivating oxidized forms of the DNA repair enzyme APE1. J Biol Chem 283, 30632-30641.

#### B-

Bao, S., Wu, Q., Li, Z., Sathornsumetee, S., Wang, H., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2008). Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. Cancer Res *68*, 6043-6048.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., and Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature 444, 756-760.

Barabe, F., Kennedy, J. A., Hope, K. J., and Dick, J. E. (2007). Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. Science *316*, 600-604.

Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., and Beier, C. P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. Cancer Res *67*, 4010-4015.

Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M. A., Vidal, M. N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K. H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. Cell *126*, 107-120.

Bianco, P., and Gehron Robey, P. (2000). Marrow stromal stem cells. J Clin Invest 105, 1663-1668.

Boada, J., Roig, T., Perez, X., Gamez, A., Bartrons, R., Cascante, M., and Bermudez, J. (2000). Cells overexpressing fructose-2,6-bisphosphatase showed enhanced pentose phosphate pathway flux and resistance to oxidative stress. FEBS Lett *480*, 261-264.

Board, M., Humm, S., and Newsholme, E. A. (1990). Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. Biochem J *265*, 503-509.

Bongso, A., and Richards, M. (2004). History and perspective of stem cell research. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol *18*, 827-842.

Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C. T., Lopaschuk, G. D., Puttagunta, L., Harry, G., *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.

Booth, C., and Potten, C. S. (2000). Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. J Clin Invest *105*, 1493-1499.

Bovery, T. (1892). Befruchtung. In Engebnisse des Anatomie une Entwichklungsgeschichte.

Boxer, M. B., Jiang, J. K., Vander Heiden, M. G., Shen, M., Skoumbourdis, A. P., Southall, N., Veith, H., Leister, W., Austin, C. P., Park, H. W., *et al.* (2010). Evaluation of substituted N,N'-diarylsulfonamides as activators of the tumor cell specific M2 isoform of pyruvate kinase. J Med Chem *53*, 1048-1055.

Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell *122*, 947-956.

Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia signalling controls metabolic demand. Curr Opin Cell Biol *19*, 223-229.

Bruggeman, S. W., Hulsman, D., Tanger, E., Buckle, T., Blom, M., Zevenhoven, J., van Tellingen, O., and van Lohuizen, M. (2007). Bmi1 controls tumor development in an Ink4a/Arf-independent manner in a mouse model for glioma. Cancer Cell *12*, 328-341.

Bruggeman, S. W., Valk-Lingbeek, M. E., van der Stoop, P. P., Jacobs, J. J., Kieboom, K., Tanger, E., Hulsman, D., Leung, C., Arsenijevic, Y., Marino, S., and van Lohuizen, M. (2005). Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. Genes Dev *19*, 1438-1443.

Brunelle, J. K., and Letai, A. (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. J Cell Sci *122*, 437-441.

Buzzai, M., Bauer, D. E., Jones, R. G., Deberardinis, R. J., Hatzivassiliou, G., Elstrom, R. L., and Thompson, C. B. (2005). The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. Oncogene *24*, 4165-4173.

#### C-

Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., *et al.* (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. Cancer Cell *11*, 69-82.

Cameron, H. A., and McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. J Comp Neurol *435*, 406-417.

Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., and Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. Neuroscience *56*, 337-344.

Cao, W., Yacoub, S., Shiverick, K. T., Namiki, K., Sakai, Y., Porvasnik, S., Urbanek, C., and Rosser, C. J. (2008). Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. Prostate *68*, 1223-1231.

Carlen, M., Cassidy, R. M., Brismar, H., Smith, G. A., Enquist, L. W., and Frisen, J. (2002). Functional integration of adult-born neurons. Curr Biol *12*, 606-608.

Caro-Maldonado, A., Tait, S. W., Ramirez-Peinado, S., Ricci, J. E., Fabregat, I., Green, D. R., and Munoz-Pinedo, C. (2010). Glucose deprivation induces an atypical form of apoptosis mediated by caspase-8 in Bax-, Bak-deficient cells. Cell Death Differ.

Chamberlain, S. J., Li, X. J., and Lalande, M. (2008). Induced pluripotent stem (iPS) cells as in vitro models of human neurogenetic disorders. Neurogenetics *9*, 227-235.

Chang, C. J., Hsu, C. C., Yung, M. C., Chen, K. Y., Tzao, C., Wu, W. F., Chou, H. Y., Lee, Y. Y., Lu, K. H., Chiou, S. H., and Ma, H. I. (2009). Enhanced radiosensitivity and radiation-induced apoptosis in glioma CD133-positive cells by knockdown of SirT1 expression. Biochem Biophys Res Commun *380*, 236-242.

Chen, H. L., and Panchision, D. M. (2007). Concise review: bone morphogenetic protein pleiotropism in neural stem cells and their derivatives--alternative pathways, convergent signals. Stem Cells *25*, 63-68.

Chen, N., and Debnath, J. (2010). Autophagy and tumorigenesis. FEBS Lett 584, 1427-1435.

Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V. B., Wong, E., Orlov, Y. L., Zhang, W., Jiang, J., *et al.* (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. Cell *133*, 1106-1117.

Chen, Z., Lu, W., Garcia-Prieto, C., and Huang, P. (2007). The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. J Bioenerg Biomembr *39*, 267-274.

Cheng, E. H., Sheiko, T. V., Fisher, J. K., Craigen, W. J., and Korsmeyer, S. J. (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. Science *301*, 513-517.

Cheng, J. X., Liu, B. L., and Zhang, X. (2009). How powerful is CD133 as a cancer stem cell marker in brain tumors? Cancer Treat Rev *35*, 403-408.

Cheng, L., Bao, S., and Rich, J. N. (2010). Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. Biochem Pharmacol *80*, 654-665.

Chenn, A., and Walsh, C. A. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. Science 297, 365-369.

Chew, J. L., Loh, Y. H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W. L., Yeap, L. S., Li, P., Ang, Y. S., Lim, B., Robson, P., and Ng, H. H. (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. Mol Cell Biol *25*, 6031-6046.

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.

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.

Clark, E. A., Golub, T. R., Lander, E. S., and Hynes, R. O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. Nature *406*, 532-535.

Clarke, D. L. (2003). Neural stem cells. Bone Marrow Transplant 32 Suppl 1, S13-17.

Clarke, L., and van der Kooy, D. (2009). Low oxygen enhances primitive and definitive neural stem cell colony formation by inhibiting distinct cell death pathways. Stem Cells *27*, 1879-1886.

Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L., and Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res *66*, 9339-9344.

Clarke, M. F., and Fuller, M. (2006). Stem cells and cancer: two faces of eve. Cell 124, 1111-1115.

Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I., and Ruiz i Altaba, A. (2007). HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. Curr Biol *17*, 165-172.

Clower, C. V., Chatterjee, D., Wang, Z., Cantley, L. C., Vander Heiden, M. G., and Krainer, A. R. (2010). The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 1894-1899.

Colell, A., Green, D. R., and Ricci, J. E. (2009). Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. Cell Death Differ *16*, 1573-1581.

Colell, A., Ricci, J. E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N. J., Li, C. W., *et al.* (2007). GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. Cell *129*, 983-997.

Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Locatelli, F., Papadimitriou, D., Salani, S., Del Bo, R., Ghezzi, S., Strazzer, S., *et al.* (2007). Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. Exp Neurol *205*, 547-562.

Cotsarelis, G., Sun, T. T., and Lavker, R. M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. Cell *61*, 1329-1337.

Covello, K. L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J. D., Arsham, A. M., Hu, C. J., Labosky, P. A., Simon, M. C., and Keith, B. (2006). HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. Genes Dev 20, 557-570.

#### D-

Dahlstrand, J., Collins, V. P., and Lendahl, U. (1992). Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. Cancer Res 52, 5334-5341.

David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., and Manley, J. L. (2010). HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. Nature *463*, 364-368.

DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C. B. (2008a). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab 7, 11-20.

Deberardinis, R. J., Lum, J. J., and Thompson, C. B. (2006). Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent modulation of carnitine palmitoyltransferase 1A expression regulates lipid metabolism during hematopoietic cell growth. J Biol Chem *281*, 37372-37380.

DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C. B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 19345-19350.

Deberardinis, R. J., Sayed, N., Ditsworth, D., and Thompson, C. B. (2008b). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. Curr Opin Genet Dev *18*, 54-61.

Denko, N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. Nat Rev Cancer 8, 705-713.

Diehn, M., Cho, R. W., Lobo, N. A., Kalisky, T., Dorie, M. J., Kulp, A. N., Qian, D., Lam, J. S., Ailles, L. E., Wong, M., *et al.* (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. Nature *458*, 780-783.

Dikic, I., Johansen, T., and Kirkin, V. (2010). Selective autophagy in cancer development and therapy. Cancer Res 70, 3431-3434.

Ding, Z., Ji, J., Chen, G., Fang, H., Yan, S., Shen, L., Wei, J., Yang, K., Lu, J., and Bai, Y. (2010). Analysis of mitochondrial DNA mutations in D-loop region in thyroid lesions. Biochim Biophys Acta *1800*, 271-274.

Doetsch, F. (2003). A niche for adult neural stem cells. Curr Opin Genet Dev 13, 543-550.

Doetsch, F., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 14895-14900.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell *97*, 703-716.

Du, Z., Jia, D., Liu, S., Wang, F., Li, G., Zhang, Y., Cao, X., Ling, E. A., and Hao, A. (2009). Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. Glia *57*, 724-733.

Dwarakanath, B., and Jain, V. (2009). Targeting glucose metabolism with 2-deoxy-D-glucose for improving cancer therapy. Future Oncol *5*, 581-585.

#### **E-**

Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. Cell Death Differ *15*, 504-514.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med *4*, 1313-1317.

Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292, 154-156.

#### F-

Filip, S., Mokry, J., English, D., and Vojacek, J. (2005). Stem cell plasticity and issues of stem cell therapy. Folia Biol (Praha) *51*, 180-187.

Fortier, L. A., Nixon, A. J., Williams, J., and Cable, C. S. (1998). Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Am J Vet Res *59*, 1182-1187.

Frederiksen, K., and McKay, R. D. (1988). Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. J Neurosci 8, 1144-1151.

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., and Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet *3*, 393-403.

Fritz, V., and Fajas, L. (2010). Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells. Oncogene *29*, 4369-4377.

Fu, Z., and Tindall, D. J. (2008). FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. Oncogene 27, 2312-2319.

Fuchs, E. J., and Whartenby, K. A. (2004). Hematopoietic stem cell transplant as a platform for tumor immunotherapy. Curr Opin Mol Ther *6*, 48-53.

Fulda, S., and Pervaiz, S. (2010). Apoptosis signaling in cancer stem cells. Int J Biochem Cell Biol *42*, 31-38.

Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. Science 287, 1433-1438.

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res *64*, 7011-7021.

#### G-

Gangemi, R. M., Griffero, F., Marubbi, D., Perera, M., Capra, M. C., Malatesta, P., Ravetti, G. L., Zona, G. L., Daga, A., and Corte, G. (2009). SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. Stem Cells 27, 40-48.

Gidekel, S., Pizov, G., Bergman, Y., and Pikarsky, E. (2003). Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. Cancer Cell *4*, 361-370.

Glick, D., Barth, S., and Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. J Pathol 221, 3-12.

Godlewski, J., Nowicki, M. O., Bronisz, A., Williams, S., Otsuki, A., Nuovo, G., Raychaudhury, A., Newton, H. B., Chiocca, E. A., and Lawler, S. (2008). Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. Cancer Res *68*, 9125-9130.

Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2010). The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. Mol Aspects Med *31*, 60-74.

Gordan, J. D., Thompson, C. B., and Simon, M. C. (2007). HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. Cancer Cell *12*, 108-113.

Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? Nat Rev Neurosci 8, 481-488.

Green, D. R., and Chipuk, J. E. (2006). p53 and metabolism: Inside the TIGAR. Cell *126*, 30-32.

Gregg, C., and Weiss, S. (2003). Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells. J Neurosci 23, 11587-11601.

Griguer, C. E., Oliva, C. R., Gobin, E., Marcorelles, P., Benos, D. J., Lancaster, J. R., Jr., and Gillespie, G. Y. (2008). CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. PLoS One *3*, e3655.

Gu, J., Liu, Y., Kyritsis, A. P., and Bondy, M. L. (2009). Molecular epidemiology of primary brain tumors. Neurotherapeutics *6*, 427-435.

Gustafsson, M. V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J. L., Poellinger, L., Lendahl, U., and Bondesson, M. (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. Dev Cell *9*, 617-628.

### H-

Häcker, V. (1892). Archiv. f. mikr. Anat. 39, 556-581.

Haeckel, E. (1868). Natürliche Schöpfungsgeschichte.

Hambardzumyan, D., Becher, O. J., and Holland, E. C. (2008). Cancer stem cells and survival pathways. Cell Cycle 7, 1371-1378.

Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B. W., Beard, C., Wernig, M., Creyghton, M. P., Steine, E. J., Cassady, J. P., Foreman, R., *et al.* (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. Cell *133*, 250-264.

Hathurusinghe, H. R., Goonetilleke, K. S., and Siriwardena, A. K. (2007). Current status of tumor M2 pyruvate kinase (tumor M2-PK) as a biomarker of gastrointestinal malignancy. Ann Surg Oncol *14*, 2714-2720.

Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D. E., Andreadis, C., Shaw, A. N., Dhanak, D., Hingorani, S. R., Tuveson, D. A., and Thompson, C. B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. Cancer Cell *8*, 311-321.

He, S., Nakada, D., and Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. Annu Rev Cell Dev Biol 25, 377-406.

Heddleston, J. M., Li, Z., Lathia, J. D., Bao, S., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2010). Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. Br J Cancer *102*, 789-795.

Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. Cell Cycle *8*, 3274-3284.

Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., Bruns, C. J., and Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. Cell Stem Cell *1*, 313-323.

Hide, T., Takezaki, T., Nakatani, Y., Nakamura, H., Kuratsu, J., and Kondo, T. (2009). Sox11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation. Cancer Res *69*, 7953-7959.

Hill, R. P., Marie-Egyptienne, D. T., and Hedley, D. W. (2009). Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. Semin Radiat Oncol *19*, 106-111.

Hirsch, H. A., Iliopoulos, D., Tsichlis, P. N., and Struhl, K. (2009). Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. Cancer Res *69*, 7507-7511.

Hitoshi, S., Alexson, T., Tropepe, V., Donoviel, D., Elia, A. J., Nye, J. S., Conlon, R. A., Mak, T. W., Bernstein, A., and van der Kooy, D. (2002). Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. Genes Dev *16*, 846-858.

Hitosugi, T., Kang, S., Vander Heiden, M. G., Chung, T. W., Elf, S., Lythgoe, K., Dong, S., Lonial, S., Wang, X., Chen, G. Z., *et al.* (2009). Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. Sci Signal *2*, ra73.

Holland, E. C. (2001). Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. Nat Rev Genet 2, 120-129.

Hsu, P. P., and Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. Cell 134, 703-707.

Hsu, Y. T., Wolter, K. G., and Youle, R. J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 3668-3672.

#### I-

Igney, F. H., and Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer 2, 277-288.

Ishitani, R., Sunaga, K., Hirano, A., Saunders, P., Katsube, N., and Chuang, D. M. (1996). Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in ageinduced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture. J Neurochem *66*, 928-935.

#### J-

Jamieson, C. H., Weissman, I. L., and Passegue, E. (2004). Chronic versus acute myelogenous leukemia: a question of self-renewal. Cancer Cell *6*, 531-533.

Jelluma, N., Yang, X., Stokoe, D., Evan, G. I., Dansen, T. B., and Haas-Kogan, D. A. (2006). Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes. Mol Cancer Res *4*, 319-330.

Jezek, P., Plecita-Hlavata, L., Smolkova, K., and Rossignol, R. (2010). Distinctions and similarities of cell bioenergetics and the role of mitochondria in hypoxia, cancer, and embryonic development. Int J Biochem Cell Biol *42*, 604-622.

Jin, K., Sun, Y., Xie, L., Batteur, S., Mao, X. O., Smelick, C., Logvinova, A., and Greenberg, D. A. (2003). Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. Aging Cell *2*, 175-183.

Jones, R. G., and Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. Genes Dev 23, 537-548.

#### K-

Kalyani, A., Hobson, K., and Rao, M. S. (1997). Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis. Dev Biol *186*, 202-223.

Kanamori, M., Kawaguchi, T., Nigro, J. M., Feuerstein, B. G., Berger, M. S., Miele, L., and Pieper, R. O. (2007). Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme. J Neurosurg *106*, 417-427.

Kang, M. K., Hur, B. I., Ko, M. H., Kim, C. H., Cha, S. H., and Kang, S. K. (2008). Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma. BMC Neurosci *9*, 15.

Kaur, B., Khwaja, F. W., Severson, E. A., Matheny, S. L., Brat, D. J., and Van Meir, E. G. (2005). Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. Neuro Oncol 7, 134-153.

Kefas, B., Comeau, L., Erdle, N., Montgomery, E., Amos, S., and Purow, B. (2010). Pyruvate kinase M2 is a target of the tumor-suppressive microRNA-326 and regulates the survival of glioma cells. Neuro Oncol.

Kelly, P. N., Dakic, A., Adams, J. M., Nutt, S. L., and Strasser, A. (2007). Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. Science *317*, 337.

Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., and Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab *3*, 177-185.

Knoblich, J. A. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. Cell *132*, 583-597. Kondo, T., Setoguchi, T., and Taga, T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 781-786. Kopp, J. L., Ormsbee, B. D., Desler, M., and Rizzino, A. (2008). Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. Stem Cells *26*, 903-911. Kornack, D. R., and Rakic, P. (2001). The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 4752-4757.

Koul, D. (2008). PTEN signaling pathways in glioblastoma. Cancer Biol Ther 7, 1321-1325.

Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. Cancer Cell 13, 472-482.

Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J Neurosci 16, 2027-2033.

Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L. B., O'Brien, T. F., Kusakabe, M., and Steindler, D. A. (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. Exp Neurol *156*, 333-344.

Kumar, Y., Tapuria, N., Kirmani, N., and Davidson, B. R. (2007). Tumour M2-pyruvate kinase: a gastrointestinal cancer marker. Eur J Gastroenterol Hepatol *19*, 265-276.

#### L-

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., and Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature *367*, 645-648.

Lee, J., Go, Y., Kang, I., Han, Y. M., and Kim, J. (2010). Oct-4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells. Biochem J 426, 171-181.

Lee, J., Kim, H. K., Han, Y. M., and Kim, J. (2008). Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription. Int J Biochem Cell Biol *40*, 1043-1054.

Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., Pastorino, S., Purow, B. W., Christopher, N., Zhang, W., *et al.* (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. Cancer Cell *9*, 391-403.

Lee, S. M., Tole, S., Grove, E., and McMahon, A. P. (2000). A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. Development *127*, 457-467.

Lendahl, U., Zimmerman, L. B., and McKay, R. D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell *60*, 585-595.

Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell 132, 27-42.

Li, L., and Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. Annu Rev Cell Dev Biol 21, 605-631.

Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R. E., *et al.* (2009a). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. Cancer Cell *15*, 501-513.

Li, Z., Wang, H., Eyler, C. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2009b). Turning cancer stem cells inside out: an exploration of glioma stem cell signaling pathways. J Biol Chem 284, 16705-16709.

Ligon, K. L., Huillard, E., Mehta, S., Kesari, S., Liu, H., Alberta, J. A., Bachoo, R. M., Kane, M., Louis, D. N., Depinho, R. A., *et al.* (2007). Olig2-regulated lineage-restricted
pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. Neuron 53, 503-517.

Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., Lu, L., Irvin, D., Black, K. L., and Yu, J. S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. Mol Cancer *5*, 67.

Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., *et al.* (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nat Genet *38*, 431-440.

Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 2074-2077.

Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. Science 264, 1145-1148.

#### М-

Mabel, C., Ake, S., Ruth, T.D., Sebastian, Y.J. (2010). Are all Glioma Cells Cancer Stem Cells? Journal of Cancer Science and Thrapy *2*, 100-106.

Maher, J. C., Krishan, A., and Lampidis, T. J. (2004). Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. Cancer Chemother Pharmacol *53*, 116-122.

Maherali, N., and Hochedlinger, K. (2008). Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell *3*, 595-605.

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 78, 7634-7638.

Matsumoto, K., Arao, T., Tanaka, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Tamura, D., Aomatsu, K., Tamura, T., Yamada, Y., *et al.* (2009). mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. Cancer Res *69*, 7160-7164.

Mazurek, S. (2010). Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. Int J Biochem Cell Biol.

Mazurek, S., Boschek, C. B., Hugo, F., and Eigenbrodt, E. (2005). Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. Semin Cancer Biol *15*, 300-308.

McCord, A. M., Jamal, M., Shankavaram, U. T., Lang, F. F., Camphausen, K., and Tofilon, P. J. (2009). Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. Mol Cancer Res *7*, 489-497.

Meissner, A., Wernig, M., and Jaenisch, R. (2007). Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. Nat Biotechnol 25, 1177-1181.

Michelakis, E. D., Sutendra, G., Dromparis, P., Webster, L., Haromy, A., Niven, E., Maguire, C., Gammer, T. L., Mackey, J. R., Fulton, D., *et al.* (2010). Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. Sci Transl Med 2, 31ra34.

Ming, G. L., and Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci 28, 223-250.

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is

required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell 113, 631-642.

Mohanti, B. K., Rath, G. K., Anantha, N., Kannan, V., Das, B. S., Chandramouli, B. A., Banerjee, A. K., Das, S., Jena, A., Ravichandran, R., *et al.* (1996). Improving cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: phase I/II clinical trials on human cerebral gliomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys *35*, 103-111.

Moreno-Manzano, V., Rodriguez-Jimenez, F. J., Acena-Bonilla, J. L., Fustero-Lardies, S., Erceg, S., Dopazo, J., Montaner, D., Stojkovic, M., and Sanchez-Puelles, J. M. (2010). FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. J Biol Chem 285, 1333-1342.

Moreno-Sanchez, R., Rodriguez-Enriquez, S., Marin-Hernandez, A., and Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. FEBS J *274*, 1393-1418.

Morrison, S. J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. Nature 441, 1068-1074.

Morrison, S. J., Shah, N. M., and Anderson, D. J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell 88, 287-298.

Morrison, S. J., and Spradling, A. C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell *132*, 598-611.

Morrison, S. J., and Weissman, I. L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. Immunity 1, 661-673.

Murat, A., Migliavacca, E., Gorlia, T., Lambiv, W. L., Shay, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Regli, L., Wick, W., Kouwenhoven, M. C., *et al.* (2008). Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. J Clin Oncol *26*, 3015-3024.

#### N-

Nakano, K., and Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol Cell 7, 683-694.

Navis, A. C., van den Eijnden, M., Schepens, J. T., Hooft van Huijsduijnen, R., Wesseling, P., and Hendriks, W. J. (2010). Protein tyrosine phosphatases in glioma biology. Acta Neuropathol *119*, 157-175.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell *95*, 379-391.

Niwa, H. (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. Cell Struct Funct 26, 137-148.

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. J Biol Chem *261*, 13807-13812.

## 0-

O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature 445, 106-110.

Ogden, A. T., Waziri, A. E., Lochhead, R. A., Fusco, D., Lopez, K., Ellis, J. A., Kang, J., Assanah, M., McKhann, G. M., Sisti, M. B., *et al.* (2008). Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. Neurosurgery *62*, 505-514; discussion 514-505.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. Acta Neuropathol 109, 93-108.

Oliver, L., Olivier, C., Marhuenda, F. B., Campone, M., and Vallette, F. M. (2009). Hypoxia and the malignant glioma microenvironment: regulation and implications for therapy. Curr Mol Pharmacol 2, 263-284.

Orkin, S. H. (2000). Stem cell alchemy. Nat Med 6, 1212-1213.

Ortiz, L. A., Gambelli, F., McBride, C., Gaupp, D., Baddoo, M., Kaminski, N., and Phinney, D. G. (2003). Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 8407-8411.

## P-

Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sanchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Gitton, Y., Carleton, A., Alvarez-Buylla, A., and Ruiz i Altaba, A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. Development *132*, 335-344.

Palmer, T. D., Takahashi, J., and Gage, F. H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. Mol Cell Neurosci *8*, 389-404.

Pappenheim, A. (1896). Virchows Arch. 145, 587-643.

Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., *et al.* (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. Science *321*, 1807-1812.

Pastorino, J. G., Shulga, N., and Hoek, J. B. (2002). Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. J Biol Chem 277, 7610-7618. Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Li, H., Bhatia, B., Tang, S., Reilly, J. G., Chandra, D., Zhou, J., Claypool, K., *et al.* (2006). Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. Oncogene 25, 1696-1708.

Patru, C., Romao, L., Varlet, P., Coulombel, L., Raponi, E., Cadusseau, J., Renault-Mihara, F., Thirant, C., Leonard, N., Berhneim, A., *et al.* (2010). CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. BMC Cancer *10*, 66.

Pedersen, P. L. (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. J Bioenerg Biomembr *39*, 211-222.

Piccirillo, S. G., Reynolds, B. A., Zanetti, N., Lamorte, G., Binda, E., Broggi, G., Brem, H., Olivi, A., Dimeco, F., and Vescovi, A. L. (2006). Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. Nature 444, 761-765.

Piccirillo, S. G., and Vescovi, A. L. (2006). Bone morphogenetic proteins regulate tumorigenicity in human glioblastoma stem cells. Ernst Schering Found Symp Proc, 59-81.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science *284*, 143-147.

Ploner, C., Kofler, R., and Villunger, A. (2008). Noxa: at the tip of the balance between life and death. Oncogene 27 *Suppl 1*, S84-92.

Pradelli, L. A., Beneteau, M., Chauvin, C., Jacquin, M. A., Marchetti, S., Munoz-Pinedo, C., Auberger, P., Pende, M., and Ricci, J. E. (2010). Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation. Oncogene *29*, 1641-1652.

Purow, B. W., Haque, R. M., Noel, M. W., Su, Q., Burdick, M. J., Lee, J., Sundaresan, T., Pastorino, S., Park, J. K., Mikolaenko, I., *et al.* (2005). Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. Cancer Res *65*, 2353-2363.

Pyrko, P., Schonthal, A. H., Hofman, F. M., Chen, T. C., and Lee, A. S. (2007). The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. Cancer Res *67*, 9809-9816.

#### R-

Rakic, P. (2002). Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. Nat Rev Neurosci *3*, 65-71.

Ramalho-Santos, M., and Willenbring, H. (2007). On the origin of the term "stem cell". Cell Stem Cell 1, 35-38.

Ramon y Cajal, S. (1913). Degeneration and Regeneration of the Nervous System. London: Oxford Univ Press.

Rankin, E. B., and Giaccia, A. J. (2008). The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. Cell Death Differ 15, 678-685.

Renault, V., Piron-Hamelin, G., Forestier, C., DiDonna, S., Decary, S., Hentati, F., Saillant, G., Butler-Browne, G. S., and Mouly, V. (2000). Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. Exp Gerontol *35*, 711-719.

Reynolds, B. A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science 255, 1707-1710.

Rickard, D. J., Kassem, M., Hefferan, T. E., Sarkar, G., Spelsberg, T. C., and Riggs, B. L. (1996). Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. J Bone Miner Res *11*, 312-324.

Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987). The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. Cell *50*, 649-657.

Rochat, A., Kobayashi, K., and Barrandon, Y. (1994). Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. Cell *76*, 1063-1073.

Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H., and Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. J Biol Chem 280, 24731-24737.

Ruiz i Altaba, A., Palma, V., and Dahmane, N. (2002). Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. Nat Rev Neurosci *3*, 24-33.

Rutkowski, D. T., and Hegde, R. S. (2010). Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. J Cell Biol *189*, 783-794.

#### **S-**

Schatton, T., Murphy, G. F., Frank, N. Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L. M., Weishaupt, C., *et al.* (2008). Identification of cells initiating human melanomas. Nature *451*, 345-349.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells 4, 7-25.

Scholer, H. R. (1991). Octamania: the POU factors in murine development. Trends Genet 7, 323-329.

Scholer, H. R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. Nature *344*, 435-439.

Seidel, S., Garvalov, B. K., Wirta, V., von Stechow, L., Schanzer, A., Meletis, K., Wolter, M., Sommerlad, D., Henze, A. T., Nister, M., *et al.* (2010). A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. Brain *133*, 983-995.

Semenza, G. L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. Curr Opin Genet Dev 20, 51-56.

Shakya, A., Cooksey, R., Cox, J. E., Wang, V., McClain, D. A., and Tantin, D. (2009). Oct1 loss of function induces a coordinate metabolic shift that opposes tumorigenicity. Nat Cell Biol *11*, 320-327.

Shen, Q., Goderie, S. K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., and Temple, S. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. Science *304*, 1338-1340.

Shih, A. H., and Holland, E. C. (2006a). Notch signaling enhances nestin expression in gliomas. Neoplasia *8*, 1072-1082.

Shih, A. H., and Holland, E. C. (2006b). Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis. Cancer Lett *232*, 139-147.

Simons, A. L., Ahmad, I. M., Mattson, D. M., Dornfeld, K. J., and Spitz, D. R. (2007). 2-Deoxy-D-glucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. Cancer Res *67*, 3364-3370.

Singh, D., Banerji, A. K., Dwarakanath, B. S., Tripathi, R. P., Gupta, J. P., Mathew, T. L., Ravindranath, T., and Jain, V. (2005). Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxyd-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. Strahlenther Onkol *181*, 507-514. Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res *63*, 5821-5828.

Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., and Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. Nature *432*, 396-401.

Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature *336*, 688-690.

Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R. D., Engh, J., Iwama, T., Kunisada, T., Kassam, A. B., *et al.* (2009). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. Oncogene 28, 3949-3959.

Son, M. J., Woolard, K., Nam, D. H., Lee, J., and Fine, H. A. (2009). SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. Cell Stem Cell *4*, 440-452.

Spoden, G. A., Rostek, U., Lechner, S., Mitterberger, M., Mazurek, S., and Zwerschke, W. (2009). Pyruvate kinase isoenzyme M2 is a glycolytic sensor differentially regulating cell proliferation, cell size and apoptotic cell death dependent on glucose supply. Exp Cell Res *315*, 2765-2774.

Stacpoole, P. W., Kurtz, T. L., Han, Z., and Langaee, T. (2008). Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases. Adv Drug Deliv Rev *60*, 1478-1487.

Stetak, A., Veress, R., Ovadi, J., Csermely, P., Keri, G., and Ullrich, A. (2007). Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death. Cancer Res *67*, 1602-1608.

Suetsugu, A., Nagaki, M., Aoki, H., Motohashi, T., Kunisada, T., and Moriwaki, H. (2006). Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. Biochem Biophys Res Commun *351*, 820-824.

Sun, R. C., Fadia, M., Dahlstrom, J. E., Parish, C. R., Board, P. G., and Blackburn, A. C. (2010). Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. Breast Cancer Res Treat *120*, 253-260.

Sun, X., Liu, M., Wei, Y., Liu, F., Zhi, X., Xu, R., and Krissansen, G. W. (2006). Overexpression of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and antisense HIF-1alpha eradicates gliomas. Cancer Gene Ther *13*, 428-435.

Sung, L. Y., Gao, S., Shen, H., Yu, H., Song, Y., Smith, S. L., Chang, C. C., Inoue, K., Kuo, L., Lian, J., *et al.* (2006). Differentiated cells are more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. Nat Genet *38*, 1323-1328.

Szotek, P. P., Pieretti-Vanmarcke, R., Masiakos, P. T., Dinulescu, D. M., Connolly, D., Foster, R., Dombkowski, D., Preffer, F., Maclaughlin, D. T., and Donahoe, P. K. (2006). Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 11154-11159.

## Т-

Tagscherer, K. E., Fassl, A., Campos, B., Farhadi, M., Kraemer, A., Bock, B. C., Macher-Goeppinger, S., Radlwimmer, B., Wiestler, O. D., Herold-Mende, C., and Roth, W. (2008). Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. Oncogene 27, 6646-6656.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell *131*, 861-872.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell *126*, 663-676.

Takenaka, M., Noguchi, T., Sadahiro, S., Hirai, H., Yamada, K., Matsuda, T., Imai, E., and Tanaka, T. (1991). Isolation and characterization of the human pyruvate kinase M gene. Eur J Biochem *198*, 101-106.

Tan, T. T., and White, E. (2008). Therapeutic targeting of death pathways in cancer: mechanisms for activating cell death in cancer cells. Adv Exp Med Biol *615*, 81-104.

Taylor, M. D., Poppleton, H., Fuller, C., Su, X., Liu, Y., Jensen, P., Magdaleno, S., Dalton, J., Calabrese, C., Board, J., *et al.* (2005). Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. Cancer Cell *8*, 323-335.

Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. Nature 414, 112-117.

Tennant, D. A., Duran, R. V., Boulahbel, H., and Gottlieb, E. (2009). Metabolic transformation in cancer. Carcinogenesis *30*, 1269-1280.

Thompson, C. B. (2009). Metabolic enzymes as oncogenes or tumor suppressors. N Engl J Med *360*, 813-815.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282, 1145-1147.

Till, J. E., and Mc, C. E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res 14, 213-222.

Torella, D., Ellison, G. M., Nadal-Ginard, B., and Indolfi, C. (2005). Cardiac stem and progenitor cell biology for regenerative medicine. Trends Cardiovasc Med *15*, 229-236.

#### U-

Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V., Tsukamoto, A. S., Gage, F. H., and Weissman, I. L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 14720-14725.

Ugurel, S., Bell, N., Sucker, A., Zimpfer, A., Rittgen, W., and Schadendorf, D. (2005). Tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) as a novel plasma tumor marker in melanoma. Int J Cancer *117*, 825-830.

## V-

van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., *et al.* (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. Cell *111*, 241-250.

Van Meir, E. G., Hadjipanayis, C. G., Norden, A. D., Shu, H. K., Wen, P. Y., and Olson, J. J. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. CA Cancer J Clin *60*, 166-193.

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. Vander Heiden, M. G., Li, X. X., Gottleib, E., Hill, R. B., Thompson, C. B., and Colombini, M. (2001). Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. J Biol Chem *276*, 19414-19419.

Vaux, D. L., and Korsmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. Cell 96, 245-254.

Vazquez, A., Liu, J., Zhou, Y., and Oltvai, Z. N. (2010). Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: The Warburg effect revisited. BMC Syst Biol *4*, 58.

Verma, Y. K., Gangenahalli, G. U., Singh, V. K., Gupta, P., Chandra, R., Sharma, R. K., and Raj, H. G. (2006). Cell death regulation by B-cell lymphoma protein. Apoptosis *11*, 459-471.

Vermeulen, L., Sprick, M. R., Kemper, K., Stassi, G., and Medema, J. P. (2008). Cancer stem cells--old concepts, new insights. Cell Death Differ *15*, 947-958.

Visvader, J. E., and Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer *8*, 755-768.

Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. Nat Med *10*, 789-799.

#### W-

Wakitani, S., Saito, T., and Caplan, A. I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. Muscle Nerve *18*, 1417-1426. Wang, J., Sakariassen, P. O., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Boe, S. O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Rosland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., *et al.* (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. Int J Cancer *122*, 761-768.

Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev 15, 2922-2933.

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

Weismann, A. (1885). Die Continuität des Keimplasma als Grundlage einer Theorie der Vererbung.

Weissman, I. L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell *100*, 157-168.

Weissman, I. L., Anderson, D. J., and Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. Annu Rev Cell Dev Biol *17*, 387-403.

Wen, P. Y., and Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. N Engl J Med 359, 492-507.

White, E., and DiPaola, R. S. (2009). The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. Clin Cancer Res 15, 5308-5316.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R. C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C. F., Eshkind, L., Bockamp, E., *et al.* (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. Cell *135*, 1118-1129.

Wodarz, D. (2006). Targeted cancer treatment: resisting arrest. Nat Med *12*, 1125-1126. Wong, J. Y., Huggins, G. S., Debidda, M., Munshi, N. C., and De Vivo, I. (2008). Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. Gynecol Oncol *109*, 394-402.

#### Y-

Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., *et al.* (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. N Engl J Med *360*, 765-773.

Yao, Y., Tang, X., Li, S., Mao, Y., and Zhou, L. (2009). Brain tumor stem cells: view from cell proliferation. Surg Neurol *71*, 274-279.

Yeom, Y. I., Fuhrmann, G., Ovitt, C. E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hubner, K., and Scholer, H. R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. Development *122*, 881-894.

Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. Cell *115*, 281-292.

Yu, F., Kuo, C. T., and Jan, Y. N. (2006). Drosophila neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology. Neuron *51*, 13-20.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007a). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science *318*, 1917-1920.

Yu, J. M., Jun, E. S., Jung, J. S., Suh, S. Y., Han, J. Y., Kim, J. Y., and Kim, K. W. (2007b). Role of Wnt5a in the proliferation of human glioblastoma cells. Cancer Lett 257, 172-181.

### **Z-**

Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B. M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., and Herold-Mende, C. C. (2008). Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. Clin Cancer Res *14*, 123-129.

Zernicka-Goetz, M. (2002). Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse. Development *129*, 815-829.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). Cell 87, 619-628.

Zhang, X. P., Zheng, G., Zou, L., Liu, H. L., Hou, L. H., Zhou, P., Yin, D. D., Zheng, Q. J., Liang, L., Zhang, S. Z., *et al.* (2008). Notch activation promotes cell proliferation and the formation of neural stem cell-like colonies in human glioma cells. Mol Cell Biochem *307*, 101-108.

Zhao, R., Xuan, Y., Li, X., and Xi, R. (2008a). Age-related changes of germline stem cell activity, niche signaling activity and egg production in Drosophila. Aging Cell *7*, 344-354.

Zhao, Y., Coloff, J. L., Ferguson, E. C., Jacobs, S. R., Cui, K., and Rathmell, J. C. (2008b). Glucose metabolism attenuates p53 and Puma-dependent cell death upon growth factor deprivation. J Biol Chem 283, 36344-36353.

Zheng, H., Ying, H., Yan, H., Kimmelman, A. C., Hiller, D. J., Chen, A. J., Perry, S. R., Tonon, G., Chu, G. C., Ding, Z., *et al.* (2008). p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. Nature *455*, 1129-1133.

Zheng, L., Roeder, R. G., and Luo, Y. (2003). S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. Cell *114*, 255-266.

Ziegler, D. S., Kung, A. L., and Kieran, M. W. (2008). Anti-apoptosis mechanisms in malignant gliomas. J Clin Oncol *26*, 493-500.

# Implication du métabolisme dans l'apoptose et la différenciation des cellules souches cancéreuses de gliome murin.

Récemment, la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) a été mise en évidence dans les gliomes. Ces cellules, de par leur résistance à l'apoptose, seraient responsables de la résurgence des tumeurs après radio et chimiothérapie. Le but de cette étude a été de rechercher des marqueurs/voies de signalisation ciblant ces cellules souches issues de gliomes chimio-induits chez le rat, via une comparaison avec des cellules souches neurales (NSC) murines. Une analyse protéomique comparative a montré que le métabolisme des CSC était différent de celui des NSC : les CSC ont un métabolisme essentiellement glycolytique. Le dichloroacétate (DCA) est une molécule ciblant ce métabolisme particulier. Nous avons mis en évidence qu'elle était capable de potentialiser l'apoptose induite par l'Etoposide ou les irradiations dans les CSC, mais pas dans les NSC. Cette potentialisation est corrélée avec une surexpression de p53, Foxo3 et de certains de leurs gènes-cibles : Bad, Puma et Noxa, qui sont des protéines proapoptotiques à domaine BH3-seul. De plus, le DCA induit la différenciation des CSC mais pas celle des NSC, via la modulation de l'interaction entre PKM2 (enzyme de la glycolyse) et Oct4 (facteur de transcription impliqué dans le maintien de l'état indifférencié). Le DCA pourrait donc être un bon adjuvant aux traitements classiques contre les gliomes.

Mots-clés : cellules souches cancéreuses, métabolisme, apoptose, différenciation, DCA.

## Metabolism implication in cancer stem cells apoptosis and differentiation in a rat glioma model.

The so-called cancer stem cells are thought to be involved in some of the basic features of tumors, especially brain tumors .These cells are known to be extremely resistant to apoptosis and may be responsible for the resurgence of tumors after chemo and radio-therapy. We aimed to compare brain cancer stem cells (CSC) versus neural stem cells (NSC) to find some markers/pathways specific of these CSC. We used rat neural stem cells (NSCs) and cancer stem cells (CSCs) in a model of ENU-induced rat brain tumors. A proteomic comparison of these cells demonstrated that a major difference between CSCs and NSCs is due to metabolism: contrary to NSC, CSCs have a glycolytic metabolism. DCA is a drug involved in this particular metabolism. DCA treatment of CSCs led to a decrease in their resistance to apoptosis induced by etoposide and radiation. This decrease is correlated with an increase of p53, Foxo3 and some of their targets: the pro-apoptotic agents Puma, Noxa, and Bad. Moreover, DCA forces CSCs to differentiate, probably by modulating M2PK (glycolysis enzyme) and Oct4 (transcription factor involved in stemness) interaction. To conclude, DCA may improve the efficiency of usual treatments on patients with glioma.

Key words: cancer stem cells, metabolism, apoptosis, differentiation, DCA.