

# Thèse de Doctorat

**Kristell OIZEL**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

**École doctorale :** Biologie Santé

**Discipline :** Biologie Cellulaire, CNU 64, 65

**Spécialité :** Cancérologie

**Unité de recherche :** Inserm UMR 892, CNRS 6299

**Soutenue le** 23 Octobre 2015

## Métabolisme et sensibilité à la mort cellulaire dans le glioblastome multiforme

### JURY

Rapporteurs :	<b>Marie-Pierre JUNIER</b> , DR, Inserm, HDR <b>Jean-Ehrland RICCI</b> , DR, Inserm, HDR
Examineurs :	<b>M-Clotilde ALVES-GUERRA</b> , CR, CNRS <b>Valérie CORONAS</b> , PU, CNRS, HDR <b>Jean-Emmanuel SARRY</b> , CR, Inserm
Directeur de Thèse :	<b>Claire PECQUEUR-HELLMAN</b> , CR, CNRS, HDR
Co-directeur de Thèse :	<b>Lisa OLIVER</b> , IR, CHU

## **Remerciements**

### **A Madame Marie-Pierre Junier et à Monsieur Jean-Ehrland Ricci**

Merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et d'en être les rapporteurs.

### **A Monsieur Jean-Emmanuel Sarry**

Merci d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse.

### **A Mesdames Valérie Coronas et M-Clotilde Alves-Guerra**

Merci d'avoir accepté de suivre mon parcours de thèse pour enfin accepter d'en être les examinatrices.

### **A Madame Claire Pecqueur**

Merci de ne pas m'avoir choisie comme étudiante en thèse. Merci de ta disponibilité dont j'ai pas mal usé voire abusé ! Merci également d'avoir été mon binôme sur certaines manips, je me souviendrai de nos manips de Seahorse à quatre mains. Merci pour tout ce que tu m'as appris, aussi bien au niveau théorique que pratique, je sais maintenant qu'il n'y a pas de pression en avion car il y a la clim et je sais également pipeter 70 $\mu$ L de rien ! Je suis persuadée que cela me servira tout au long de ma carrière. Merci de ton soutien jusqu'au dernier jour de rédaction de cette thèse ! Je suis ravie de t'avoir eu comme directrice, et d'avoir pu allier travail et bonne humeur... Ton chemin de croix se termine enfin... pense tout de même à changer d'adresse mail et de numéro de téléphone, on ne sait jamais !

### **A Madame Lisa Oliver**

Merci de m'avoir acceptée en tant que stagiaire en master 2 et d'avoir aidé Claire à porter cette croix pendant ces trois années, en acceptant de co-diriger ma thèse. Merci pour tes conseils et ta patience que j'ai pu mettre à rude épreuve parfois ! Merci pour toutes tes anecdotes. Merci pour tes choix d'ingénieurs d'étude, je ne sais pas quels sont tes critères de sélection mais garde-les car ces IE sont de sacrés phénomènes !

### **A Monsieur François Vallette**

Merci de m'avoir accueillie au sein de l'équipe 9. Merci pour les conseils de carrière. Merci pour les blagues sur les bretons et surtout sur les indiens !

### **A Monsieur Shankar**

Je sais que ce seront les seules lignes de ma thèse que tu liras alors je vais sortir ma plus belle plume. Je vais commencer par les choses pour lesquelles je ne te remercie pas. Je ne te remercie pas d'avoir été présent durant ces trois années, tu en reparleras avec Claire, mais tu m'as quand même pas mal dérangée et j'aurais certainement fait une thèse d'une meilleure qualité et plusieurs Nature si tu n'avais pas été là ! Je ne te remercie pas de m'avoir fait répéter x fois les mêmes phrases chaque midi à la cantine devant la traditionnelle bavette. Je ne te remercie pas de m'avoir gâché tous mes lundis soirs en m'obligeant à regarder l'amour est dans le pré afin de pouvoir tenir une discussion qui t'intéresse et ainsi stimuler et maintenir certaines de tes facultés mentales. Je ne te remercie pas pour toutes les pauses café durant lesquelles tu m'as enfumée. Je ne te remercie pas de m'avoir obligée à regarder des clips de musique indienne et des extraits de film du Chuck Norris indien. Je ne te remercie pas de m'avoir engraisée à coup de spéculoos. Bon, si je veux que tu m'emmènes un jour en Inde... Merci pour tes expressions maintenant cultes au laboratoire. Merci pour ta démarche chaloupée dans les couloirs. Merci d'avoir affronté des gamines dans le parterre de ta copropriété pour me cueillir des fleurs. Merci de m'avoir trouvé un vieux prétendant indien et un éléphant pour mon futur mariage en Inde. Merci de m'avoir proposé ta cave à un moment où j'étais au bord de la précarité. Merci pour les sessions Sean Paul dans la salle de culture. Merci pour ces presque 4 années, c'était un plaisir de te côtoyer chaque jour au labo (oui j'ai vraiment envie de partir en Inde) !

### **Aux chercheurs de l'équipe**

Merci à **Catherine Gratas** pour les dosages d'acides aminés, je t'ai donné pas mal de boulot avec cela ! Merci d'avoir supporté un fond musical continu (plus ou moins fort, mais c'est à cause de Vincent !) dans le laboratoire, le module va maintenant retrouver de son silence !  
Merci à **PEF**, quoi que tu puisses dire, le métabolisme domine la science et c'est bien lui qui régule les événements épigénétiques !

Merci à **Lisenn**, les meilleurs sont de Saint Briec !

Merci à **Christophe** de s'être éloigné de mon ordinateur lors de la rédaction de ma thèse.

### **Aux membres de l'équipe**

A **Romain**, Merci pour les pourrissages de bureau et de notre cible favorite : Shankar ! Merci pour les zombies et autres « je ne sais quoi killer »... ! Bon courage pour la fin de thèse et la

suite, même si tu as choisi un domaine difficilement accrocheur et pas porteur pour un sous...l'épigénétique !!

A **Vincent**, Merci pour les sessions musicales dans le module qui ont pu passer de Jean Ferrat à Maître Gims sans trop de transitions...Merci pour toutes les poignées de portes que l'on ne s'est pas offertes.

A **Mazène**, Merci de l'intérêt que tu as porté à mon travail et pour tes conseils. Bon courage pour la suite.

A **Judith**, Merci pour tes conseils médicaux, je sais maintenant qu'il peut me pousser un troisième doigt ! Bon courage pour la fin de ton internat et de ta thèse.

A **Didier** et **Marie-Pierre**, Merci d'avoir pris Shankar en garde alternée à l'ICO, faites attention à ne pas vous faire happer par le côté obscur de la force...l'épigénétique !

A **Fanny**, Merci d'avoir ambiancé la salle de culture, Bob et Sean Paul forever ! Je me demande si on ne devrait pas rajouter cela dans le mat et mét car cela doit jouer sur la prolifération des cellules ! Merci d'avoir emmené le soleil dans le labo et cet accent du sud (dont je ne peux plus me passer, les gens ne me croient plus bretonne après ça !), j'entend encore le chant des cigales résonner dans le laboratoire. Merci pour les sessions azote. Merci d'avoir hoché la tête d'un air approbateur toutes les fois où je te parlais de mes résultats. Merci pour les séances karaoké dans le module ! Merci d'avoir partagé tous les potins !

A **Marion**, « So mi go so then !! » Merci d'avoir supporté mes craquages et toutes mes blagues, saches que tu as été une parfaite victime et que malgré tout ce que j'ai pu dire sur ta tasse « c'est vraiment trop mignon » ! Bonne continuation pour ta thèse et pour autre chose mais je ne suis au courant de rien et je n'ai rien dit à personne... !

A **Cynthia**, Merci d'avoir supporté la musique et d'avoir été malgré toi un dommage collatéral pendant les tragiques batailles de boules de papier ! Bonne continuation pour ta thèse.

### **Aux anciens**

A **Emeline**, tu m'as abandonnée avant la fin mais la relève derrière toi a assuré. Merci pour toutes tes phrases, expressions et raisonnements loufoques ! Merci de m'avoir choisie comme troisième main pour les manips de soft agar. Merci de m'avoir appris les couleurs, le bleu banane est ma préférée. Merci de ta folie qui recouvre encore les murs de notre bureau ! Comme tu le disais on en aura eu gros mais qu'est-ce qu'on aura rit !

A **Laetitia**, **Mathilde(s)**, **Quentin**, **Maysaloun**...



### **Aux copains thésards de 3<sup>ème</sup> année**

A **Leslie**, Merci pour toutes ces soirées normandes. Merci pour la soirée avec Josiane Balasko. Merci de m'avoir prêté tes manettes de wii comme micro. Merci de m'avoir emmenée en vacances malgré la météo bretonne qui me poursuit ! Merci pour la théorie des deux verres anti-fatigue !

A **Charlotte**, Merci d'avoir été ma voisine de module. Merci d'avoir été ma voisine d'appart. Merci d'avoir été mon binôme de sport. Merci pour les soirées Just Dance. Merci de m'avoir rappelée au bus plus d'une fois ! Merci de m'avoir soutenue les samedi de rédaction et jours d'inondation !

A **Cassie**, Merci d'avoir lancé la légende « samba !! ». Merci pour les zombies. Merci pour les sessions Francis Cabrel sur les routes de Corse. Merci pour les soirées de chant une banane ou une louche à la main. Merci de m'avoir appris quelques phrases en coréen, le « Kristell pecsou tokaté » va être de rigueur !

A **Maeva**, Je ne te remercie pas de m'avoir perturbée lors de ma rédaction et surtout de nous ridiculiser avec ton futur EMBO...

A **Sophie**, Merci de m'avoir essoufflée en me faisant discuter pendant les footing du dimanche !

A **Jessie**, Merci pour tes avertissements lorsque je laissais entrevoir mes plumes dans les couloirs !

A **Carole**, Merci d'avoir caché mes détournements de fonds en étant ma vice-trésorière à l'ADN. Merci d'avoir assis ton autorité lors des séances à l'école maternelle !

A **Pierre**, Merci d'avoir fait le chapeau à nos soirées ! Miami, San Francisco, L.A !

A **Romain**, tu ne penses quand même pas que je vais te remercier une deuxième fois !

A tous Merci, c'était quand même plus sympa d'avoir réalisé ce parcours tous ensemble. Merci pour les soirées des alcoo- euh des thésards pas très anonymes ! Bon courage pour la fin de votre thèse et pour la suite !

### **Aux copains non-thésards**

Merci de votre soutien à base de « T'es encore étudiante ? ! » « Mais après t'auras un vrai travail ? » « Ah tu ne fais pas le pont ? » « Choisis une ville sympa pour ton post-doc qu'on puisse venir passer des vacances ! » ...

### **Aux parents, aux frangins, à la belle-sœur, à Blandine, à Cassandra, à Léa**

## Table des matières

Abréviations.....	7
Liste des figures et tableaux.....	11
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>1. Le gliome .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. Définition et classification des gliomes .....</b>	<b>14</b>
1.1.1. Classification des gliomes selon l'OMS .....	14
1.1.2. Classification des gliomes selon l'hôpital Sainte-Anne .....	15
1.1.3. Classification transcriptomique des gliomes .....	16
1.1.4. Autres classifications des gliomes .....	24
<b>1.2. Le glioblastome.....</b>	<b>25</b>
1.2.1. Définition .....	25
1.2.2. Classification des glioblastomes .....	26
<b>1.3. Traitement du glioblastome .....</b>	<b>29</b>
1.3.1. Radiothérapie/Témzolomide .....	29
1.3.2. Autres traitements.....	30
<b>2. Les cellules souches cancéreuses.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Définition et origine .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2. Marqueurs des CSCs dans les gliomes.....</b>	<b>34</b>
2.2.1. Marqueurs membranaires.....	34
2.2.2. Marqueurs intracellulaires.....	37
<b>2.3. Niches et hypoxie .....</b>	<b>39</b>
2.3.1. Niche périvasculaire.....	40
2.3.2. Niche hypoxique .....	42
<b>2.4. CSCs et résistance à la mort cellulaire.....</b>	<b>44</b>
2.4.1. CSCs et résistance à l'irradiation.....	44
2.4.2. CSCs et résistance à la chimiothérapie .....	46
<b>3. Recherche de nouvelles thérapies : ciblage du métabolisme .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Métabolisme du glucose .....</b>	<b>48</b>
3.1.1. Hypothèse de la biodisponibilité des substrats .....	50

3.1.2. Hypothèse des intermédiaires de la glycolyse .....	51
3.1.3. Hypothèse du lactate .....	52
3.1.4. Métabolisme glycolytique et résistance à la mort cellulaire .....	54
<b>3.2. Métabolisme de la glutamine .....</b>	<b>57</b>
3.2.1. Précurseur de l'α-ketoglutarate.....	57
3.2.2. Source anaplérotique du TCA.....	60
3.2.3. Donneur d'azote pour la synthèse des nucléotides et acides aminés .....	60
3.2.4. Régulateur de l'homéostasie redox.....	61
<b>3.3. Contrôle des voies métaboliques .....</b>	<b>62</b>
<b>3.4. Métabolisme des CSCs .....</b>	<b>65</b>
<b>3.5. Modulation du métabolisme et sensibilité à la mort cellulaire.....</b>	<b>66</b>
3.5.1. Ciblage du métabolisme du glucose .....	68
3.5.2. Ciblage du métabolisme de la glutamine .....	70
<b>II. OBJECTIFS.....</b>	<b>73</b>
<b>III. RESULTATS.....</b>	<b>76</b>
<b>1. Impact de la mutation IDH et de son oncométabolite le D-2-hydroxyglutarate (D-2HG) sur la sensibilité à la mort cellulaire.....</b>	<b>77</b>
<b>2. Impact de l'inhibition de la glutaminolyse sur la sensibilité à la mort cellulaire.....</b>	<b>79</b>
<b>3. Caractérisation des primocultures de GBM et sensibilité à la mort cellulaire.....</b>	<b>80</b>
<b>IV. DISCUSSION.....</b>	<b>81</b>
<b>V. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>96</b>
<b>VI. ANNEXE.....</b>	<b>124</b>

## Liste des abréviations

### A

AAT : Aspartate Amino Transferase  
ABC : ATP Binding Cassette  
ACL : ATP-Citrate Lyase  
ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase  
ADN : Acides DesoxyriboNucléiques  
AKT : Protein Kinase B  
ALAT : Alanine Amino Transferase  
APE1 : Apurinic:apyrimidinic Protein Endonuclease  
ARF : P14  
ASCT2 : Amino-Acid Transporter 2  
ATP : Adenosine TriPhosphate

### B

BCRP : Breast Cancer Resistance Protein  
BenSer : BenzylSérine  
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique  
BMPs : Bone Morphogenic Proteins  
BPTES : Bis-2-(5-Phenylacetamido-1,3,4-Thiadiazol-2-yl)Ethyl Sulfide

### C

CD : Cluster of Differentiation  
CDK : Cyclin-Dependant Kinase  
CHI3L1 : Chitinase-3-Like 1  
CICD : Caspase-Independant Cell Death  
CIMP : CpG Island Methylator Phenotype  
CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone  
CSCs : Cancer Stem Cells  
CXCR4 : Chemokine receptor type 4

### D

2-DG : 2-DeoxyGlucose  
D-2HG : D-2-HydroxyGlutarate  
DCA : Dichloroacétate

### E

EGCG : Epigallocatechin-3-gallate  
EGF : Epidermal Growth Factor  
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor  
eNOS : endothelial Nitric Oxide synthase  
ESCs : Embryonic Stem Cells

### F

FAS : Fatty Acid Synthase  
FBP : Fructose-1,6-BisPhosphate

FDG : 2-(18F)-Fluoro-2-D-Glucose  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
F6P : Fructose-6-Phosphate

## **G**

GAC : Glutaminase C  
GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase  
GBM : Glioblastome Multiforme  
GDH : Glutamate Dehydrogenase  
GLS : Glutaminase  
GLUT : Glucose Transporter  
GOT : Glutamate Oxaloacétate Transaminase  
GPNA : 1-8-Glutamyl-p-Nitroanilide  
GS : Glutamine Synthase  
GSK3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinase-3  $\beta$   
GTP : Guanosine Triphosphate  
G6P : Glucose-6-Phosphate  
G6PDH : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase

## **H**

HBP : Hexosamine Biosynthesis Pathway  
HIF : Hypoxia-Inducible Factor  
HK : Hexokinase  
HMG : High mobility group

## **I**

IDH : Isocitrate Dehydrogenase  
IL-23 : Interleukine 23  
INK4a : p16  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

## **K**

$\alpha$ KG :  $\alpha$ Ketoglutarate  
kDa : kilo Dalton  
KGA : Kidney-type Glutaminase  
KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma

## **L**

LDH : Lactate Deshydrogenase  
LGA : Liver-type Glutaminase

## **M**

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase  
MCT : Monocarboxylate transporter  
MDM : Murine Double Minute  
MDR : Multi-Drug Resistant  
ME : Malic Enzyme  
MET : Hepatocyte Growth Factor Receptor  
MGMT : O<sup>6</sup>-Méthylguanine-DNA Méthyltransferase  
MMP : Metalloproteinase

MPC : Mitochondrial Pyruvate Carrier  
MSCs : Mesenchymal stem cells

## **N**

NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide  
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate  
NF1 : Neurofibrine 1  
NFkB : Nuclear Factor-Kappa B  
NSCs : Neural Stem Sells

## **O**

OAA : Oxaloacetate  
OMM : Outer Mitochondrial Membrane  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
OXPHOS : Oxidative Phosphorylation

## **P**

3-PG : 3-Phosphoglycerate  
PDAC : Pancreatic Ductal Adenocarcinoma  
PDGF : Platelet Growth Factor  
PDH : Pyruvate Dehydrogenase  
PEP : Phosphoenolpyruvate  
PET : Positron Emission Tomography  
PFK1 : Phospho Fructo Kinase 1  
PFKBP : 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-BisPhosphatases  
pH : potentiel Hydrogène  
PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate  
PI3K : Phosphoinositol 3 Kinase  
PKM2 : Pyruvate Kinase M2  
PPP : Pentose Phosphate Pathway  
PTCH : Patched  
PTEN : Phosphatase Tensin Homolog

## **R**

RB : Retinoblastoma protein  
ROS : Reactive Oxygen Species  
RTK : Récepteurs aux Tyrosines Kinases

## **S**

SDF1 : Stromal-Derived Factor 1  
SHH : Sonic Hedgehog  
SLC1A5 : Solute Carrier Family 1  
SMO : Smoothened  
SNAT : Sodium-coupled Neutral Amino Acid Transporter  
SNC : Système Nerveux Central  
SOX2 : Sex Determining Region Y-Related High Mobility Group Box 2  
SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Protein  
SRY : Sex Determining Region Y  
SSEA1 : Stage-Specific Embryonic Antigen 1  
SVZ : Subventricular Zone

**T**

TCA : Tricarboxylic Acid Cycle

TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$

TMZ : Temozolomide

TNF : Tumor Necrosis Factor

TP53 : Tumor Protein 53

TRAIL : Tumor-Necrosis-Factor-Related Apoptosis Including Ligand

**V**

VDAC : Voltage Dependant Anion Chanel

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VHL : Von Hippel-Lindau

**W**

WNT : Wingless

## Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Principales voies de signalisation altérées dans les gliomes. ....	17
Figure 2 : Principales altérations géniques et chromosomiques retrouvées au cours du développement des gliomes malins.....	18
Figure 3 : Altérations de la voie des récepteurs aux tyrosines kinases dans les gliomes.....	20
Figure 4 : Rôle de l'isocitrate dehydrogenase dans le métabolisme des gliomes(Ohgaki and Kleihues, 2009). ....	22
Figure 5 : Représentation de la progression du GBM dans le temps et l'espace.....	28
Figure 6 : Courbes de Kaplan-Meier estimant la survie des patients atteints de GBM selon le protocole de traitement suivi.....	29
Figure 7 : Protocole de xénotransplantations de CSCs en série chez des souris immunodéficientes.....	32
Figure 8 : Hypothèses de l'origine des tumeurs dans le modèle du GBM. ....	33
Figure 9 : Microenvironnement des CSCs de GBM. ....	40
Figure 10 : Régulation des CSCs de gliome dans la niche périvaculaire. ....	41
Figure 11 : Régulation des CSCs de gliome dans la niche hypoxique. ....	43
Figure 12 : Différences de métabolisme entre les cellules normales et les cellules tumorales.	49
Figure 13 : Utilisation d'un analogue marqué du glucose en imagerie médicale chez les patients atteints de GBM.....	50
Figure 14 : Adaptations métaboliques des cellules cancéreuses.....	51
Figure 15: Métabolisme du lactate par les cellules cancéreuses.....	53
Figure 16 : Courbes de Kaplan-Meier estimant la survie des patients atteints de GBM. ....	57
Figure 17 : Métabolisme de la glutamine dans les cellules cancéreuses. ....	59
Figure 18 : Utilisation d'un analogue marqué de la glutamine en imagerie médicale chez les patients atteints de GBM.....	62
Figure 19 : Régulation des voies métaboliques par les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules cancéreuses.....	63
Figure 20 : Réponses cellulaires au stress énergétique.....	67
Figure 21 : Ciblage du métabolisme des cellules cancéreuses.....	68
Tableau 1 : Classification des gliomes établie par l'OMS. (Louis et al., 2007).....	15



Tableau 2 : Principales caractéristiques cliniques et géniques des différents sous-types de GBM. (Phillips et al., 2006).....	27
Tableau 3 : Marqueurs d'identification des CSCs dans différents types de tumeurs. ....	34

# **INTRODUCTION**

# **I. Introduction**

## **1. Le gliome**

### **1.1. Définition et classification des gliomes**

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les tumeurs cérébrales représentent moins de 2% de l'ensemble des cancers. Parmi elles, les tumeurs neuroépithéliales sont les tumeurs primaires du système nerveux central (SNC) les plus fréquentes. Elles ont pour origine les neurones ou les cellules gliales et sont divisées en dix principaux sous types. Les gliomes en sont la forme la plus fréquente et représentent 30 à 40% de l'ensemble des tumeurs cérébrales. Leur incidence est d'environ 5 cas pour 100 000 habitants. En France, entre 2004 et 2009, il a été recensé plus de 18600 nouveaux cas de gliomes soit plus de 3700 par an (Zouaoui et al., 2012). Les gliomes affectent les cellules de la macroglie composant le tissu de soutien du SNC à savoir les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules épendymaires. Ils peuvent être divisés en différents groupes correspondant au type cellulaire dont ils proviennent. Deux classifications histologiques utilisées pour le diagnostic existent, une définie par l'OMS et l'autre par l'hôpital Sainte-Anne de Paris.

#### **1.1.1. Classification des gliomes selon l'OMS**

La classification établie par l'OMS et actualisée en 2007, divise les gliomes en 4 groupes histologiques selon le type cellulaire prédominant en astrocytomes, oligodendrogliomes, épendymomes ou gliomes mixtes. Ces groupes sont subdivisés en 4 grades selon des critères histologiques comme le degré d'anaplasie et appuyés par quelques données cliniques telles que l'âge de distribution, la localisation cérébrale et l'agressivité de la tumeur (Tableau1) (Louis et al., 2007). Le grade I correspond à des tumeurs bénignes bien délimitées et dont la croissance est lente. Les tumeurs de grade II ont également une prolifération lente mais une tendance à l'infiltration du tissu sain. Le grade III correspond à des tumeurs anaplasiques ayant une croissance rapide et un caractère infiltrant important. Le grade IV regroupe des tumeurs caractérisées par une hétérogénéité cellulaire, une croissance rapide, une nécrose et une infiltration très importante du tissu sain. Les tumeurs de haut grade (III et IV) sont considérées malignes.

	I	II	III	IV
<b>Astrocytic tumours</b>				
Subependymal giant cell astrocytoma	•			
Pilocytic astrocytoma	•			
Piloxyoid astrocytoma		•		
Diffuse astrocytoma		•		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		•		
Anaplastic astrocytoma			•	
Glioblastoma				•
Giant cell glioblastoma				•
Gliosarcoma				•
<b>Oligodendroglial tumours</b>				
Oligodendroglioma		•		
Anaplastic oligodendroglioma			•	
<b>Oligoastrocytic tumours</b>				
Oligoastrocytoma		•		
Anaplastic oligoastrocytoma			•	
<b>Ependymal tumours</b>				
Subependymoma	•			
Myxopapillary ependymoma	•			
Ependymoma		•		
Anaplastic ependymoma			•	

**Tableau 1 : Classification des gliomes établie par l'OMS.** (Louis et al., 2007)

Bien qu'utilisée internationalement, cette classification de l'OMS est basée principalement sur des critères histologiques et reste donc très subjective et de ce fait peu reproductible. De plus, elle ne prend pas en compte l'hétérogénéité tumorale et ne distingue pas les cellules tumorales du parenchyme résiduel infiltré. Une deuxième classification prenant en compte des données cliniques et d'imagerie a été proposée par l'hôpital Sainte-Anne de Paris.

### 1.1.2. Classification des gliomes selon l'hôpital Sainte-Anne

La classification proposée par l'hôpital Sainte-Anne est basée sur l'étude de biopsies stéréotaxiques associée à des données apportées par l'imagerie par scanner ou IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) (Daumas-Duport et al., 1997). Ces travaux ont permis de définir la structure spatiale des gliomes et d'en définir deux groupes distincts. Le groupe des structures solides regroupe les tumeurs possédant un tissu tumoral formé uniquement de cellules tumorales et accompagné d'une microangiogénèse caractérisée par une prise de contraste à l'imagerie. Le groupe des structures infiltrantes présente des cellules tumorales

isolées infiltrant le parenchyme adjacent morphologiquement et fonctionnellement intact et une absence d'angiogénèse et donc de prise de contraste à l'imagerie. Cependant, un œdème est fréquemment retrouvé associé à la tumeur, entraînant l'apparition d'une hypodensité au scanner. Cette classification distingue les gliomes en trois sous-types, les oligodendrogliomes, les oligoastrocytomes et les glioblastomes (Daumas-Duport et al., 1997, 2000). L'hôpital Sainte-Anne a établi deux grades parmi les oligodendrogliomes. Le grade A caractérisé par l'absence d'hyperplasie endothéliale, caractéristique de la microangiogénèse, et une absence de prise de contraste à l'imagerie. La survie médiane des patients atteints d'oligodendrogliomes de grade A est de 11 ans. Le grade B comporte les tumeurs présentant une hyperplasie endothéliale et/ou une prise de contraste à l'imagerie. La survie médiane des patients de ce grade est de 3,5 ans. Enfin le glioblastome est défini par l'hôpital Sainte-Anne comme un gliome de haut grade dépourvu de différenciation oligodendrogliale évidente. Il est caractérisé par une prise de contraste unique en anneau et un œdème en doigt de gant à l'imagerie et par des différences d'un point de vue histologique selon le lieu de prélèvement. En effet, un prélèvement réalisé au niveau de la zone de prise de contraste révélera une prolifération tumorale importante, des atypies nucléaires, des mitoses, de la nécrose et une différenciation astrocytaire hétérogène. Un prélèvement réalisé dans la zone d'œdème révélera la présence de cellules tumorales infiltrantes indifférenciées, à noyaux hyperchromatiques et dépourvus de cytoplasme (Figarella-Branger and Bouvier, 2005).

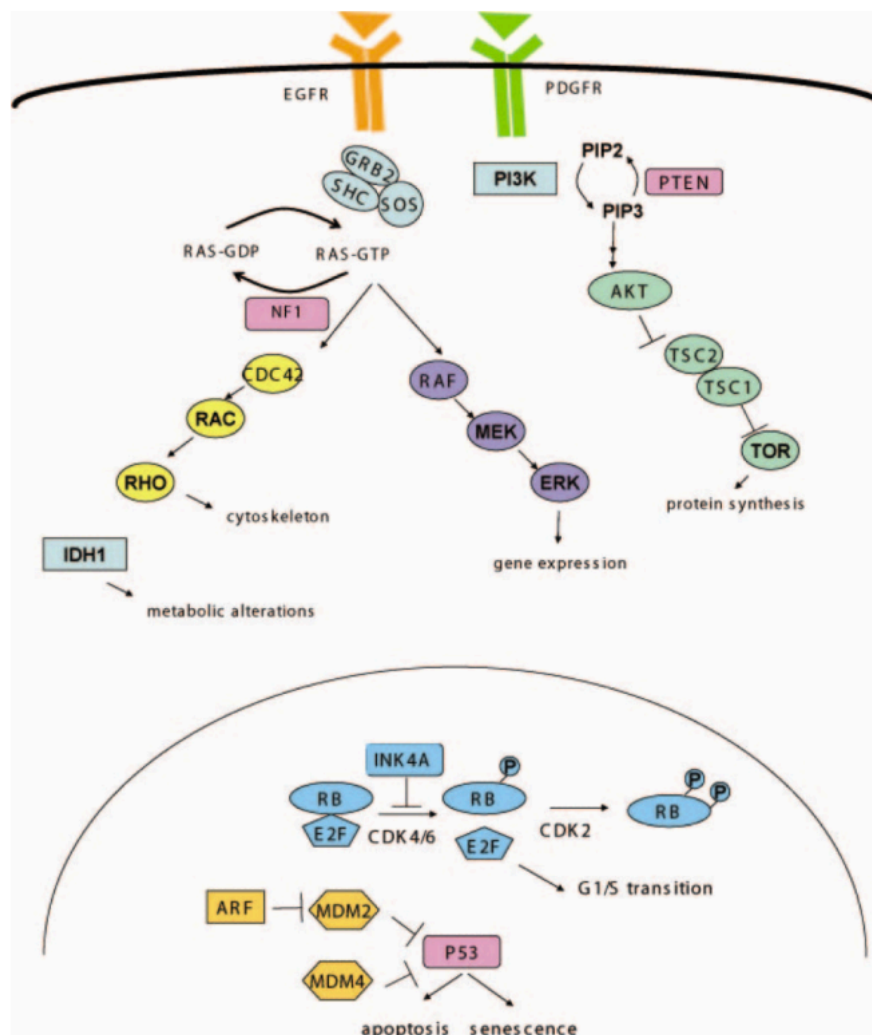
Même si cette classification des gliomes par l'hôpital Sainte-Anne prend en compte plus de critères que celle définie par l'OMS, elle reste encore discutée. Notamment, la distinction des grades A et B des oligodendrogliomes basée sur le processus de microangiogénèse reste difficile. De plus, l'utilisation de seulement deux grades ne reflète pas tous les stades de malignités observés.

Les difficultés rencontrées par les classifications basées sur des critères cliniques, d'imagerie et d'histologie et l'objectif d'harmoniser la classification des gliomes ont incité à l'étude de nouvelles approches de classifications notamment basées sur l'expression génique de ces tumeurs.

### **1.1.3. Classification transcriptomique des gliomes**

Les gliomes sont des tumeurs présentant de nombreuses altérations géniques s'accumulant au cours de la progression tumorale. Globalement, ces altérations concernent la

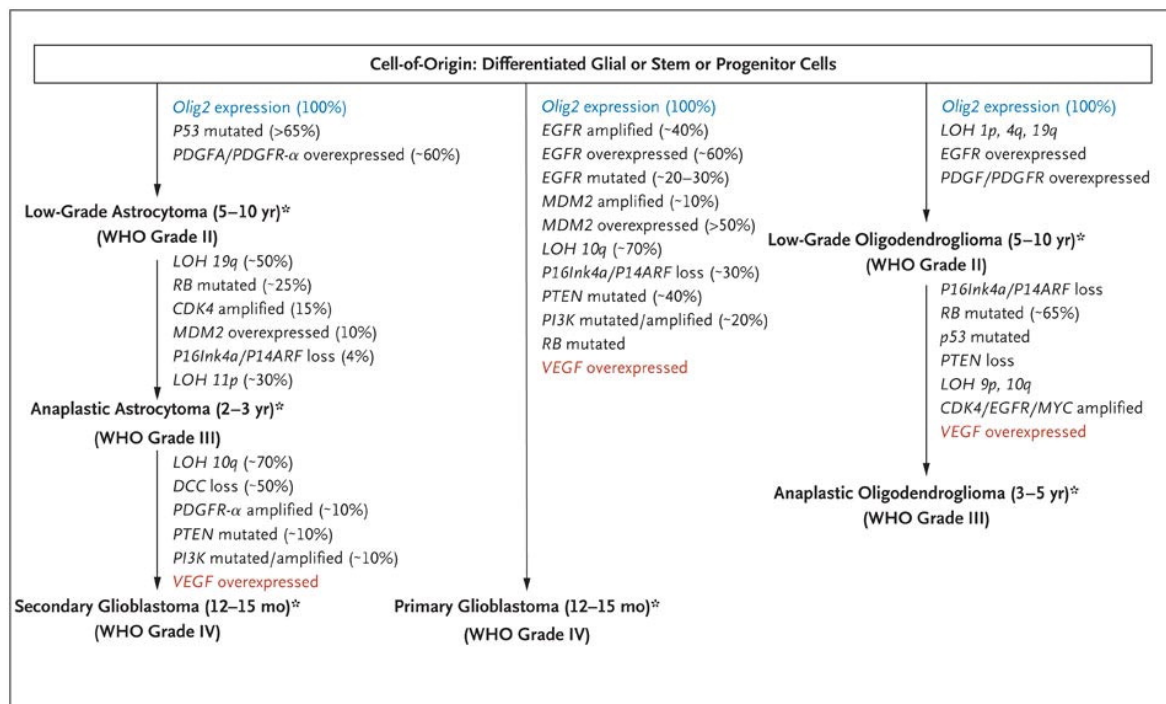
perte d'hétérozygotie de certains loci chromosomiques ainsi que des mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs et des mutations activatrices de voies de signalisation impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaire (Figure 1) (Lim et al., 2011). La mutation ou la perte des gènes suppresseurs de tumeur comme *TP53* et *PTEN* (phosphate and tensin homologue) ou des mutations activatrices des récepteurs aux facteurs de croissance comme l'EGFR (epidermal growth factor receptor) sont par exemple très fréquemment retrouvées dans les gliomes.



**Figure 1 : Principales voies de signalisation altérées dans les gliomes.**

Les facteurs de croissance tels que l'EGF et le PDGF se fixent à leurs récepteurs respectifs, mutés ou surexprimés dans les gliomes, et activent les voies Ras et PI3K/Akt. Ces voies sont régulées par les suppresseurs de tumeurs NF1 et PTEN, fréquemment mutés dans les gliomes. Les protéines p53 et Ink4a sont également affectées. Plus récemment des mutations de gènes impliqués dans le métabolisme ont été découverts tels que *IDH*. (Lim et al., 2011)

Afin de mieux comprendre le processus de gliomagenèse et de permettre une meilleure stratification des patients, beaucoup d'études se sont attachées à étudier ces altérations géniques afin de les corrélérer aux différents types et stades de malignité des gliomes (Figure 2).



**Figure 2 : Principales altérations géniques et chromosomiques retrouvées au cours du développement des gliomes malins.**

L'oligodendrocyte factor 2 (*Olig2*) (en bleu) et le vascular endothelial growth factor (VEGF) (en rouge) sont exprimés dans tous les gliomes de haut grade. Les astérisques indiquent les médianes de survie des patients. DCC : Deleted in Colorectal Carcinoma, EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor, LOH : Loss of Heterozygosity, MDM2 : Murine Double Minute 2, PDGF : Platelet Derived Growth Factor, PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor, PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase, PTEN : Phosphate and Tensin homologue, RB : Retinoblastoma. (Wen and Kesari, 2008)

### 1.1.3.1. Perte d'hétérozygotie 1p/19q

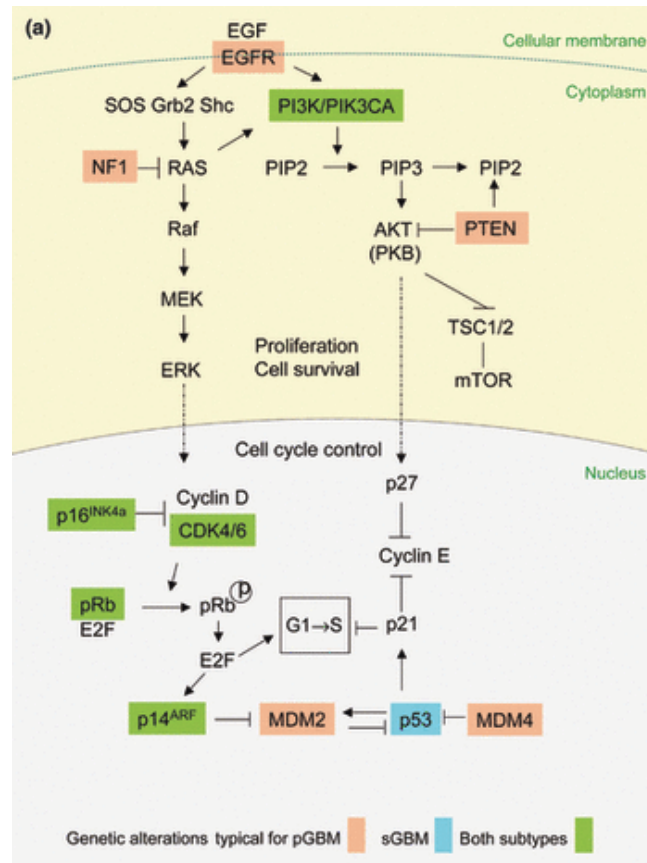
La perte d'hétérozygotie du bras court du chromosome 1 (1p) et du bras long du chromosome 19 (19q) est caractéristique des tumeurs oligodendrogiales. La co-délétion de ces deux bras chromosomiques est présente dans plus de 80% des oligodendrogliomes de grade II et dans 50 à 70% des oligodendrogliomes de grade III (Riemenschneider et al., 2010). Elle représente un événement précoce de la gliomagenèse. Si la perte d'hétérozygotie du chromosome 1p est un facteur prédictif de la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques, sa co-délétion avec le chromosome 19q serait un facteur de bon pronostic de réponse aux

traitements chimiothérapeutiques et/ou radiothérapeutiques et serait associée à un gain de survie des patients traités (Aldape et al., 2007; Cairncross et al., 1998; Weller et al., 2007; Zhao et al., 2014).

#### **1.1.3.2. Altérations de la voie des RTK**

Des mutations activatrices ou des surexpressions des récepteurs aux tyrosines kinases (RTK) sont très fréquemment retrouvées dans les gliomes notamment les récepteurs aux facteurs de croissance tels que l'EGF (epidermal growth factor), le PDGF (platelet-derived growth factor) et le VEGF (vascular endothelial growth factor). La surexpression de l'EGFR est présente dans plus de 50% des GBM et sa mutation la plus fréquente est la délétion du variant III de son domaine extracellulaire, présente dans 20 à 30% des GBM et 50 à 60% des GBM comportant une amplification de l'*EGFR* (Brennan et al., 2013; Heimberger et al., 2005; Louis et al., 2007). L'amplification du *PDGFRA* est retrouvée dans 13% des GBM dont la moitié présente une amplification et/ou mutation de l'*EGFR* (Furnari et al., 2015). Les RTK permettent l'activation des voies de croissance et de prolifération cellulaire via l'activation d'effecteurs tels que Ras et PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase), respectivement régulés par les suppresseurs de tumeurs NF1 (neurofibrin1) et PTEN (phosphatensin homolog) mutés dans les gliomes (Figure 3) (Lim et al., 2011). Le gène codant pour PTEN est localisé sur le bras long du chromosome 10 (10q23) et sa protéine induit la déphosphorylation de PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) empêchant ainsi l'activation de la voie Akt. La perte d'hétérozygotie du chromosome 10q est retrouvée dans environ 70% des GBM et sa mutation dans 25% (Endersby and Baker, 2008).





**Figure 3 : Altérations de la voie des récepteurs aux tyrosines kinases dans les gliomes.**

Les récepteurs aux tyrosines kinases (RTK) sont fréquemment mutés et surexprimés dans les gliomes. Les RTK activent les voies Ras et PI3K/Akt, régulées par NF1 et PTEN, et aboutissent à l'activation de protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. (Ohgaki and Kleihues, 2009)

### 1.1.3.3. Altérations de la voie Rb

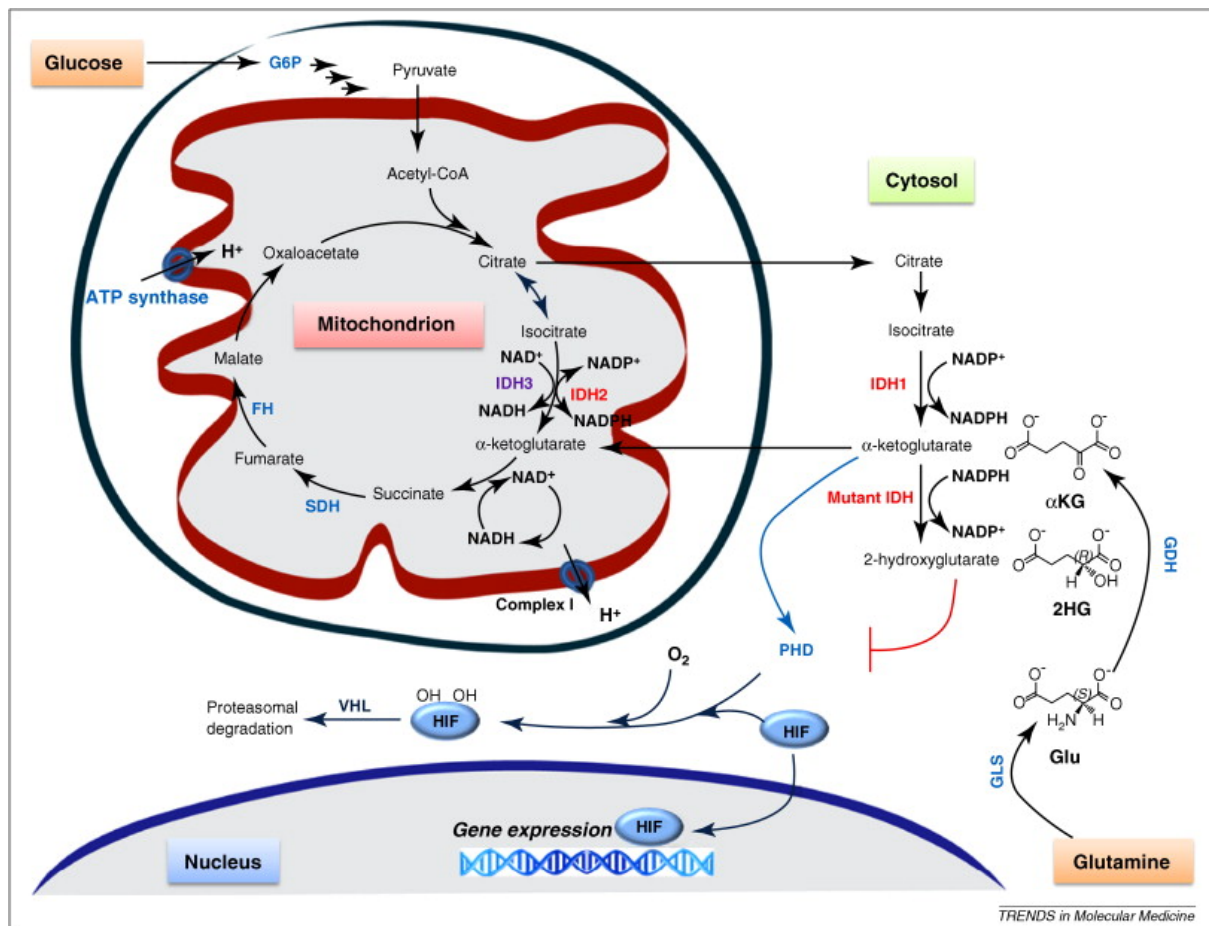
La protéine Rb (Retinoblastoma protein), sous sa forme hypophosphorylée, séquestre le facteur de transcription E2F. L'activation de la cascade MAPK (Mitogen-activated protein kinase) induit l'expression de la cycline D1 et son association avec les Cdk4 et Cdk6 (cyclin-dépendant-kinase) ainsi que la dégradation de p27<sup>Kip1</sup>, protéine inhibant l'interaction Cdk2/Cycline E. La phosphorylation de la protéine Rb par les complexes Cdk va permettre de libérer E2F et la transcription de gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire en phase S (Figure 3). La protéine p16<sup>INK4A</sup> peut se lier aux Cdk4 et Cdk6 et ainsi empêcher sa liaison avec les cycline D1. Le gène *RBI* est muté dans 25% des astrocytomes de haut grade et des amplifications des *CDK* sont également retrouvées, principalement du gène *CDK4* retrouvé dans 15% des gliomes malins. Enfin, des pertes alléliques ou des hyperméthylations du gène *CDKN2A*, codant pour la protéine p16<sup>INK4A</sup> sont très fréquentes dans les gliomes de haut grade (50 à 70%) (Furnari et al., 2007).

#### **1.1.3.4. Altérations de la voie p53**

La protéine p53 joue un rôle crucial dans la régulation du cycle cellulaire, de la mort cellulaire et dans la réponse aux dommages à l'ADN. Elle permet la transcription de gènes comme p21, inhibant Cdk2 et induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S. L'expression de p53 est contrôlée par Mdm2 (Murine double minute 2) qui induit sa dégradation et dont l'expression est induite par p53 elle-même. Cette dégradation peut être inhibée par l'interaction de p14<sup>ARF</sup> avec Mdm2 (Figure 3) (Ohgaki and Kleihues, 2009). Les mutations de *TP53* sont fréquemment retrouvées dans les astrocytomes et les oligoastrocytomes (environ 50% et 40% respectivement) et plus faiblement dans les oligodendrogliomes (10%) (Okamoto et al., 2004). L'amplification de Mdm4, protéine inhibant la transcription de *TP53* et augmentant l'activité ubiquitine-ligase de Mdm2, est retrouvée dans 4% des GBM (Furnari et al., 2007).

#### **1.1.3.5. Mutations d'IDH**

Récemment, des mutations de l'isocitrate dehydrogenase (IDH), enzyme du cycle de Krebs, ont été mises en évidence dans les gliomes de grade II et III ainsi que dans les GBM (Bals et al., 2008; Parsons et al., 2008; Yan et al., 2009a). L'enzyme IDH catalyse la carboxylation oxydative de l'isocitrate en  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG). Il existe cinq gènes codant pour trois isoformes d'IDH différents, IDH1 présente dans le cytosol et dépendante du NADP<sup>+</sup>, IDH2 (dépendante du NADP<sup>+</sup>) et IDH3 (dépendante du NAD<sup>+</sup>) présentes dans la mitochondrie (Figure 4).



**Figure 4 : Rôle de l'isocitrate dehydrogenase dans le métabolisme des gliomes(Ohgaki and Kleihues, 2009).**

Il existe trois isoformes d'IDH ; IDH1 présente dans le cytosol et IDH2 et IDH3 présentes dans la mitochondrie. IDH permet la conversion de l'isocitrate en α-KG. L'α-KG est un substrat essentiel aux PHD impliquées dans la dégradation des complexes HIF. La mutation d'IDH entraîne la conversion de l'α-KG en 2-HG. α-KG : α-ketoglutarate, 2-HG : 2-hydroxyglutarate, HIF : Hypoxia inducible factor, IDH : Isocitrate dehydrogenase, PHD : Prolyl hydroxylase. (Dang et al., 2010)

Les mutations d'IDH sont quasiment toujours monoalléliques et impliquent uniquement les isoformes 1 et 2 d'IDH, ayant pour coenzyme le NADPH (Parsons et al., 2008). Les mutations induisent la substitution d'un acide aminé d'un codon localisé dans le site actif de l'enzyme, respectivement en position R132 pour IDH1 et R140 ou R172 pour IDH2. Ces mutations confèrent à IDH une nouvelle activité consistant en la conversion de l'αKG en D-2-hydroxyglutarate (D-2HG) avec consommation de NADPH (Dang et al., 2009). Des mutations d'IDH ont été retrouvées dans des gliomes de grade II et III sans autre altération génétique classiquement retrouvée de manière précoce au cours de la progression tumorale, suggérant que les mutations IDH apparaissent très tôt dans le développement des

gliomes et que ceux-ci pourraient provenir d'une même cellule d'origine (Ohgaki and Kleihues, 2009; Watanabe et al., 2009; Yan et al., 2009b). La mutation *IDH1* est retrouvée dans 12% des GBM avec une incidence beaucoup plus importante dans les GBM secondaires (plus de 90%) que dans les GBM primaires (moins de 5%) (Parsons et al., 2008). La mutation d'*IDH2* est moins fréquemment retrouvée dans les GBM. Les mutations d'*IDH* seraient associées à un meilleur pronostic des patients atteints de gliome de grade III ou de GBM. Cependant, cette mutation est également retrouvée dans les leucémies myéloïdes aiguës et n'est pas associée au pronostic. L'implication du D-2HG en tant qu'oncométabolite dans le processus de gliomagenèse est toujours actuellement discutée.

L'étude des altérations géniques permet de mieux comprendre les voies impliquées dans la gliomagenèse et un meilleur diagnostic du sous-type de la tumeur. Très récemment, deux études indépendantes ont établi des sous-groupes moléculaires de gliomes ayant une valeur pronostic. Une analyse génomique des gliomes de bas grade a permis de définir 3 sous-types basés sur le statut *IDH*, *TP53* et 1p/19q (Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2015). Ainsi un premier sous-type regroupe les gliomes de bas grade présentant une mutation du gène *IDH* et la codélétion 1p/19q et est associé à un meilleur pronostic vital. Parmi eux, 96% possèdent une mutation activatrice du promoteur de *TERT* induisant l'augmentation de l'activité des télomérases. Un deuxième sous-groupe regroupe les gliomes de bas grade possédant des mutations du gène *IDH* sans codélétion 1p/19q mais présentant des mutations du gène *TP53*. Enfin, le dernier sous-type regroupe les gliomes ne présentant pas de mutation d'*IDH*. Une deuxième étude a quant à elle subdivisé les gliomes en 5 sous-types basés sur la présence ou l'absence de la mutation *IDH*, de la codélétion 1p/19q et de la mutation du promoteur de *TERT* (Eckel-Passow et al., 2015). La mutation exclusive du promoteur de *TERT* est très fréquemment retrouvée dans les GBM et est associée au plus mauvais pronostic vital quelque soit le grade comparé aux autres sous-groupes moléculaires. Bien que l'estimation du pronostic vital des patients repose encore principalement sur des critères histologiques, le profil d'expression génique pourrait être un meilleur facteur prédictif de survie (Freije et al., 2004; Nutt et al., 2003).

#### 1.1.4. Autres classifications des gliomes

Suite à la classification génomique des gliomes, des classifications épigénétiques ont émergé se basant sur la méthylation des gènes et l'expression des miRNA.

##### 1.1.4.1. Classification basée sur la méthylation des gènes

L'expression génique est continuellement régulée par des facteurs épigénétiques jouant sur la structure de la chromatine et la méthylation de l'ADN. En effet, des enzymes de méthylation (HMT) ou de déméthylation (HDM), et d'acétylation (HAT) ou de déacétylation (HDAC) des histones, sont recrutées au niveau de séquences spécifiques de la chromatine et permettent l'activation ou la répression des gènes. De plus, l'ADN subit des méthylations ou déméthylations respectivement contrôlées par les enzymes DNA methyltransferases (DNMT) et déméthylases (TET) au niveau des promoteurs de gènes. Les cellules cancéreuses présentent très fréquemment une hypométhylation globale de l'ADN associée à une hyperméthylation localisée au niveau des îlots CpG (Jones and Baylin, 2007).

L'analyse de la méthylation de l'ADN des gliomes a permis de mettre en évidence un groupe de tumeurs présentant un phénotype d'hyperméthylation des îlots CpG (G-CIMP) (van den Bent et al., 2011; Noushmehr et al., 2010). Les tumeurs présentant ce phénotype sont retrouvées fréquemment dans les gliomes de bas grade et dans les GBM appartenant au sous-type proneural et seraient de meilleur pronostic. Les patients présentant un GBM de sous-type proneural et G-CIMP positif ont une médiane de survie augmentée comparé aux proneuraux G-CIMP négatifs ainsi qu'aux patients des autres sous-types (Noushmehr et al., 2010). L'exemple le plus parlant mettant en évidence le rôle des modifications épigénétiques sur la réponse aux traitements est la méthylation du promoteur du gène *MGMT* (O<sup>6</sup>-méthylguanine-DNA méthyltransferase). Cette hyperméthylation est retrouvée chez environ 45% des patients atteints de GBM et est responsable de l'inhibition de l'expression de l'O<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase, entraînant ainsi une diminution des capacités de réparation des dommages à l'ADN induit par des agents chimiothérapeutiques alkylants tels que le témozolomide (TMZ) (Esteller et al., 2000; Hegi et al., 2008). La méthylation du promoteur de *MGMT* est maintenant utilisée comme marqueur prédictif de la réponse au TMZ en clinique. L'hyperméthylation de promoteurs d'autres gènes suppresseurs de tumeur a été mise en évidence tels que *PTEN*, *TP53*, *RBI* et *CDKN2A* (Amatya et al., 2005; Baeza et al., 2003; Nakamura et al., 2001a, 2001b).

Enfin, plusieurs études mettent en évidence une forte association entre la mutation *IDH* et l'hyperméthylation globale de l'ADN (Christensen et al., 2011; Noushmehr et al., 2010).

Cette association serait due au fait que la mutation *IDH* entraîne une diminution du pool d' $\alpha$ KG nécessaire à l'activité enzymatique des ADN et des histones déméthylases menant à un remodelage de la chromatine et à des modifications épigénétiques au niveau de l'ADN. De plus, le D-2HG peut également inhiber directement l'activité des histones déméthylases (Xu et al., 2011). Enfin, il a été montré que les tumeurs mutées pour *IDH* et ayant un phénotype d'hyperméthylation globale présentent des hypométhylations localisées au niveau de gènes impliqués dans plusieurs voies métaboliques et de biosynthèses (Christensen et al., 2011). D'autres marqueurs épigénétiques comme la modification des histones ont été étudiés dans les gliomes mais restent moins bien caractérisés notamment en terme de valeur pronostique (Liu et al., 2010).

#### **1.1.4.2. Classification basée sur l'expression des miRNA**

Les microRNA (miRNA) sont de petites molécules d'acides ribonucléiques (ARN) non codant, de moyenne 22 nucléotides. Ils permettent de réguler l'expression de gènes de manière post-transcriptionnelle. Ils s'apparient à une séquence complémentaire d'ARN messager du gène cible empêchant ainsi sa traduction ou aboutissant à sa dégradation. Selon les gènes régulés, les miRNA peuvent avoir un rôle pro-oncogène ou suppresseur de tumeur. Plusieurs études ont étudié le rôle des miRNA dans le développement des gliomes. Les travaux de Rao *et al.* ont par exemple mis en évidence une signature de 23 miRNA pouvant discriminer les astrocytomes anaplasiques des GBM (Rao et al., 2010). De plus, différents profils d'expression de miRNA ont été mis en évidence et associés au pronostic de survie dans les gliomes (Barbano et al., 2014; Srinivasan et al., 2011; Wong et al., 2015). Plus récemment, il a été mis en évidence un profil d'expression de miRNA qui serait associé à la progression de la malignité dans les gliomes. Ce profil est basé sur l'expression de 5 miRNA dont deux sont associés à un bon pronostic (miR-767-5p et miR-105) et trois autres associés à un mauvais pronostic dans les gliomes de haut grade (miR-584, miR-296-5p et miR-196a) (Yan et al., 2014b).

## **1.2. Le glioblastome**

### **1.2.1. Définition**

Le glioblastome multiforme, astrocytome de grade IV, est la forme la plus fréquente des gliomes et représente 60 à 70% des gliomes de haut grade (Wen and Kesari, 2008). C'est

également la forme la plus létale avec une survie moyenne des patients de 14,6 mois avec traitement (Maher et al., 2001). Les GBM peuvent être « de novo » (GBM primaires) ou évoluer à partir d'un gliome de bas grade (GBM secondaires). Les GBM primaires représentent la majorité des GBM, ils se développent très rapidement chez des patients de moyenne d'âge 62 ans et sans signe clinique ou histologique précurseur. Les GBM secondaires représentent moins de 10% des GBM et touchent des patients plus jeunes avec une moyenne d'âge au diagnostique de 45 ans (Lim et al., 2011; Ohgaki and Kleihues, 2009). Les GBM primaires et secondaires ne sont pas distinguables d'un point de vue histologique ou de réponse aux traitements conventionnels. Cependant d'un point de vue génique les GBM secondaires se distinguent des primaires par des mutations de *TP53*, de *PDGFR* et d'*IDH*. Les GBM primaires se caractérisant par une mutation ou une surexpression du gène de l'*EGFR*. Globalement, les GBM sont des tumeurs très hétérogènes d'un point de vue inter-tumoral. L'intérêt de classer ces tumeurs selon leur expression génique est donc primordial pour permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant plus particulièrement certains sous-types de tumeur.

### **1.2.2. Classification des glioblastomes**

Une 1<sup>ère</sup> classification moléculaire fondée sur les profils d'expression de 35 gènes et associée aux profils cliniques a permis de mettre en évidence 3 sous-groupes de GBM définis comme proneuraux, prolifératifs et mésenchymateux (Tableau 2) (Phillips et al., 2006).

	Proneural	Proliferative	Mesenchymal
Histological grade	WHO grade III or WHO grade IV with or without necrosis	WHO grade IV with necrosis	WHO grade IV with necrosis
Cellular morphology	Astrocytic or Oligodendroglial	Astrocytic	Astrocytic
Evolution of signature	Arises in 1° tumor, may persist or convert to Mes	Arises in 1° tumor, may persist or convert to Mes	Arises in 1° tumor or by conversion from other subtype
Patient age	Younger (~40 yrs.)	Older (~50 yrs.)	Older (~50 yrs.)
Prognosis	Longer survival	Short survival	Short survival
Histological Markers	Olig2, DLL3, BCAN	PCNA, TOP2A	CHI3L1/YKL40, CD44, VEGF
Tissue similarities	Adult and Fetal Brain	HSC, lymphoblast	Bone, cartilage, smooth musc, endothelium, dendritic cells
Biological process	Neurogenesis	Proliferation	Angiogenesis
Analogous forebrain cell	Neuroblast	Neural Stem Cell and/or Transit Amplifying Cell	Neural Stem Cell
Chromosome gain/loss	None	Gain of 7 & Loss of 10 or 10q	Gain of 7 & Loss of 10
PTEN locus	PTEN intact	PTEN loss	PTEN loss
EGFR locus	EGFR normal	EGFR amplified or normal	EGFR amplified or normal
Signaling	Notch activation	Akt activation	Akt activation

**Tableau 2 : Principales caractéristiques cliniques et géniques des différents sous-types de GBM.** (Phillips et al., 2006)

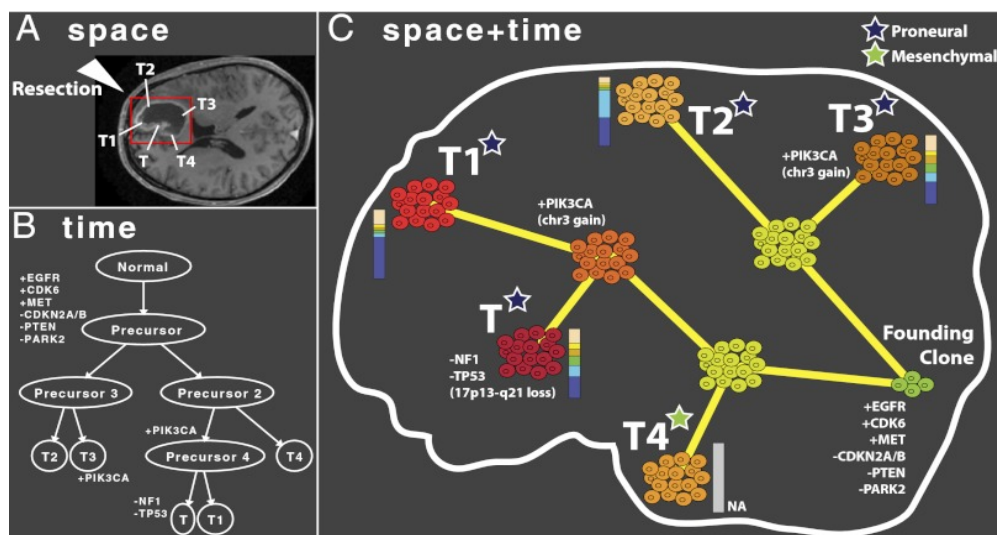
Plus récemment, Verhaak *et coll.* ont étendu cette classification à 4 sous-groupes en se basant sur l'expression de 840 gènes, divisant notamment les GBM prolifératifs en neuraux et classiques (Verhaak et al., 2010). De manière générale, le sous-type classique est caractérisé par une amplification du chromosome 7 associée à la perte du chromosome 10, une amplification ou une mutation activatrice de l'*EGFR*, une délétion du locus *INK4a/ARF*, ainsi qu'une absence de mutation de *TP53*. Le sous-type mésenchymateux regroupe les tumeurs présentant une mutation ou une délétion du gène *NF1*, une mutation de *PTEN*, ainsi qu'une forte expression de *CHI3L1*, du récepteur à l'hépatocyte growth factor (*MET*) et des gènes impliqués dans la voie TNF et NFκB. Les GBM proneuraux sont caractérisés par une fréquence élevée des mutations activatrices de *PDGFR* et des mutations d'*IDH1* et de *TP53*. Enfin, le sous-type neural est caractérisé par la surexpression d'*EGFR* et l'expression de gènes neuronaux.



D'un point de vue clinique, les GBM proneuraux sont de meilleurs pronostics avec une survie des patients plus importante comparée aux autres sous-types. Les capacités cellulaires de prolifération et de survie liées à une activation du cycle cellulaire et à une néovascularisation plus importante, seraient associées au mauvais pronostic des gliomes mésoenchymateux et prolifératifs (Phillips et al., 2006). Cependant, les patients atteints de GBM proneuraux semblent répondre moins bien aux traitements que les deux autres sous-types. Phillips *et al.*, ont également mis en évidence l'acquisition d'un phénotype mésoenchymateux de la tumeur lors de la rechute des patients après traitement.

Même si cette classification inclue à la fois les GBM primaires et secondaires, elle permettra de mieux comprendre les mécanismes de résistance aux thérapies et ainsi de pouvoir développer des traitements spécifiques à chaque sous-type de tumeur.

Toutefois, des données récentes mettent en avant l'hétérogénéité moléculaire intratumorale des GBM d'un point de vue du génome, du transcriptome et du méthylome (Aubry et al., 2015; Meyer et al., 2015; Patel et al., 2014; Sottoriva et al., 2013). Des analyses de fragments issus de différentes zones d'une même tumeur montrent des profils d'expression géniques et transcriptomiques différents qui peuvent être classés dans différents sous-types de GBM (Figure 5) (Aubry et al., 2015; Sottoriva et al., 2013). La figure 5 représente l'évolution phylogénique des différents clones établie à partir de leur expression génique.



**Figure 5 : Représentation de la progression du GBM dans le temps et l'espace.**

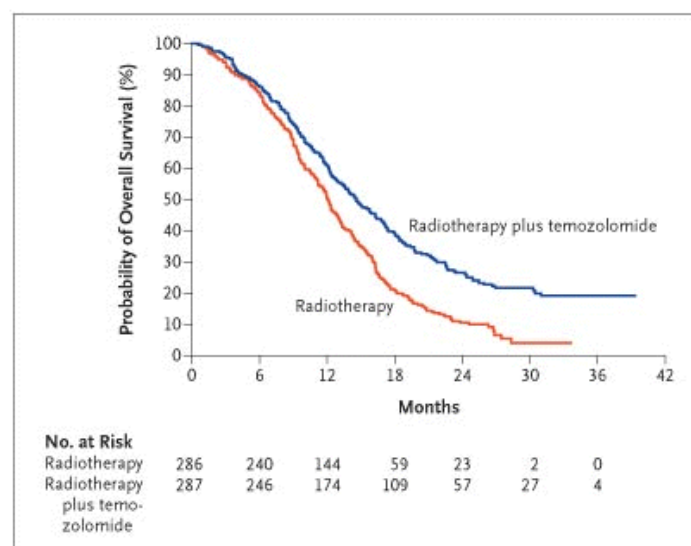
IRM de la tumeur et localisation des prélèvements (A). Étude des altérations génétiques et établissement de leur progression au cours du temps (B). Reconstruction spatiale et temporelle de la progression tumorale (C). Les altérations génétiques révèlent plusieurs clones tumoraux appartenant à différents sous types de GBM. (Sottoriva et al., 2013)

Ce développement de plusieurs clones de cellules cancéreuses au sein d'une même tumeur apporte donc un biais lors de la stratification des patients qui est réalisée sur une seule biopsie. De plus, la présence de ces différents clones complique la prise en charge thérapeutique des patients puisque ces clones auront une réponse différente à un même traitement.

### 1.3. Traitement du glioblastome

#### 1.3.1. Radiothérapie/Témozolomide

Les traitements actuels du glioblastome consistent en la résection chirurgicale de la tumeur, lorsque sa localisation le permet, suivie de radiothérapie et/ou de chimiothérapie. L'efficacité de ces traitements reste très limitée et n'ont que très peu évolué ces dernières années. En effet, le caractère infiltrant de cette tumeur limite l'efficacité de la résection chirurgicale. De plus, les doses de radiothérapie sont restreintes par les effets secondaires occasionnés au cerveau et la chimiothérapie limitée par le passage de la barrière hémato-encéphalique. Cependant, la mise au point d'un protocole de traitement associant radiothérapie et chimiothérapie concomitante puis adjuvante à base de témozolomide (TMZ) a permis un gain de survie des patients à 2 ans passant de 10 à 27% (Figure 6) (Stupp et al., 2005).



**Figure 6 : Courbes de Kaplan-Meier estimant la survie des patients atteints de GBM selon le protocole de traitement suivi.**

Les patients atteints de GBM traités par radiothérapie et témozolomide ont un meilleur pronostic vital par rapport aux patients traités par radiothérapie seule. (Stupp et al., 2005)

Toutefois, le protocole Stupp n'a permis qu'une faible augmentation de la médiane de survie des patients de 12,1 mois avec radiothérapie seule, à 14,6 mois (Stupp et al., 2005). L'efficacité de ce traitement est limitée par la surexpression de l'O<sup>6</sup>-méthylguanine-DNA méthyltransferase (MGMT) chez 30 à 40% des patients, protéine de réparation qui catalyse le transfert du groupement méthyle des O<sup>6</sup>mG à son propre résidu cystéine. Le TMZ est un agent alkylant induisant la méthylation de l'ADN sur la guanine en position O<sup>6</sup> (O<sup>6</sup>mG) entraînant son appariement incorrect avec la thymine lors de la réplication et ainsi un arrêt du cycle et une mort cellulaire. Plusieurs études ont montré que l'hyperméthylation du promoteur de MGMT, aboutissant à la répression de son expression, était un facteur de pronostic favorable chez les patients atteints de GBM et traités au TMZ (Esteller et al., 2000; Hegi et al., 2008). Ces données cliniques reflètent l'hétérogénéité de l'expression génique et épigénétique des GBM et soulignent l'importance de définir différents sous-types moléculaires afin d'adapter le traitement de chaque patient en fonction de ce sous-type.

### **1.3.2. Autres traitements**

D'autres molécules sont actuellement à l'étude, notamment des inhibiteurs de récepteurs aux tyrosines kinases (TKI) ou de leurs ligands. L'erlotinib et le gefitinib sont des petites molécules inhibitrices de l'activité de l'EGFR qui ont montré des résultats prometteurs en études précliniques mais pas d'effet significatif en monothérapie ni en combinaison avec la radiothérapie ou le TMZ (Brown et al., 2008; Franceschi et al., 2007; Peereboom et al., 2010). Ces deux TKI sont des molécules se fixant de manière réversible aux RTK et actuellement une nouvelle génération d'inhibiteurs se fixant de manière irréversible est à l'étude et montrent une efficacité dans les études précliniques (Zahonero et al., 2015). Le Bevacizumab, anticorps dirigé contre le VEGFR, a quant à lui montré une augmentation de la survie des patients en rechute de GBM mais n'a pas montré d'efficacité chez les patients nouvellement diagnostiqués pour le GBM (Cohen et al., 2009; Friedman et al., 2009; Gilbert et al., 2014). Enfin, le Cetuximab est un anticorps monoclonal de l'EGFR ayant une affinité dix fois plus forte pour le domaine extracellulaire que les ligands endogènes. Tout comme les TKI ciblant l'EGFR, les études précliniques et cliniques n'ont montré que peu d'effet.

Les glioblastomes sont des tumeurs hautement agressives et très résistantes aux traitements et la rechute des patients ayant répondu à la thérapie initiale est quasiment

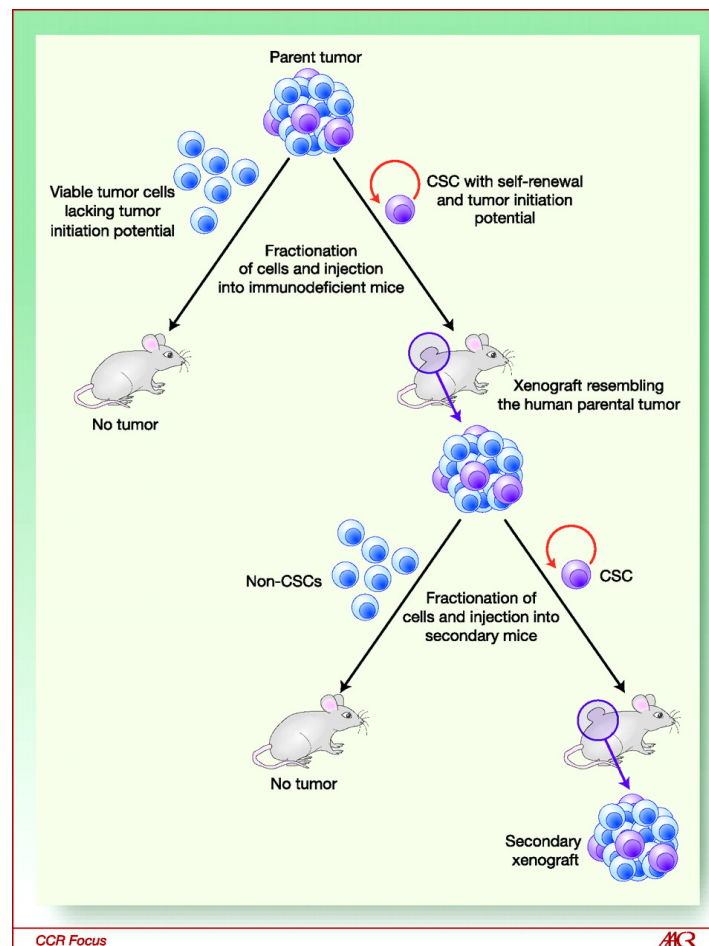
systematique. En plus de l'hétérogénéité intratumorale et des modifications épigénétiques, la capacité des cellules tumorales à infiltrer le parenchyme sain, leur permettant ainsi d'échapper à la résection chirurgicale et à la radiothérapie ciblée, peut expliquer la résistance aux traitements et la récurrence de la tumeur. La majorité des tumeurs se reforme dans les 2 à 3 cm du site tumoral initial avec un phénotype plus résistant et une agressivité plus importante. Ces dernières années ont vu émerger l'hypothèse que les phénomènes de résistance aux traitements et de récurrence des tumeurs seraient dus à la présence, au sein de la tumeur, d'une petite population de cellules cancéreuses ayant des propriétés de cellules souches, appelées cellules souches cancéreuses (CSCs). De plus, les GBM sont des tumeurs très hypoxiques. L'hypoxie permet la maintenance des CSCs et induit l'augmentation de la prolifération tumorale ainsi qu'une plus forte radio- et chimio-résistance.

## **2. Les cellules souches cancéreuses**

### **2.1. Définition et origine**

La résistance aux traitements conventionnels et la récurrence de nombreux cancers ont attiré l'attention vers les mécanismes d'initiation et de maintenance de la masse tumorale. Une première hypothèse, appelé « modèle stochastique », suppose que toutes les cellules cancéreuses possèdent le même potentiel tumorigénique et donc que chacune d'entre elles peut initier une tumeur. Dans ce modèle, les cellules cancéreuses acquerraient des mutations créant une hétérogénéité cellulaire et leur permettant de maintenir la progression tumorale, sous l'influence du microenvironnement. Une deuxième hypothèse, appelée « hypothèse hiérarchique », suppose que seules quelques cellules peuvent initier et maintenir la masse tumorale. Ces cellules auraient des propriétés de cellules souches à savoir qu'elles exprimeraient des marqueurs de cellules souches normales et seraient capables de s'autorenouveler et de se différencier en tous les sous-types cellulaires présents dans la tumeur. L'hétérogénéité tumorale proviendrait de la différenciation de ces cellules souches. Cette seconde hypothèse a été confirmée par l'équipe de Dick dans les années 90 dans un modèle de leucémie myéloïde aigue (Lapidot et al., 1994). Ils ont montré qu'une petite population de cellules présentant des marqueurs de cellules souches hématopoïétiques normales ( $CD38^+$ ,  $CD34^-$ ) étaient capables de reproduire la tumeur initiale, composée de tous les stades de différenciation des cellules leucémiques, dans des souris immunodéprimées.

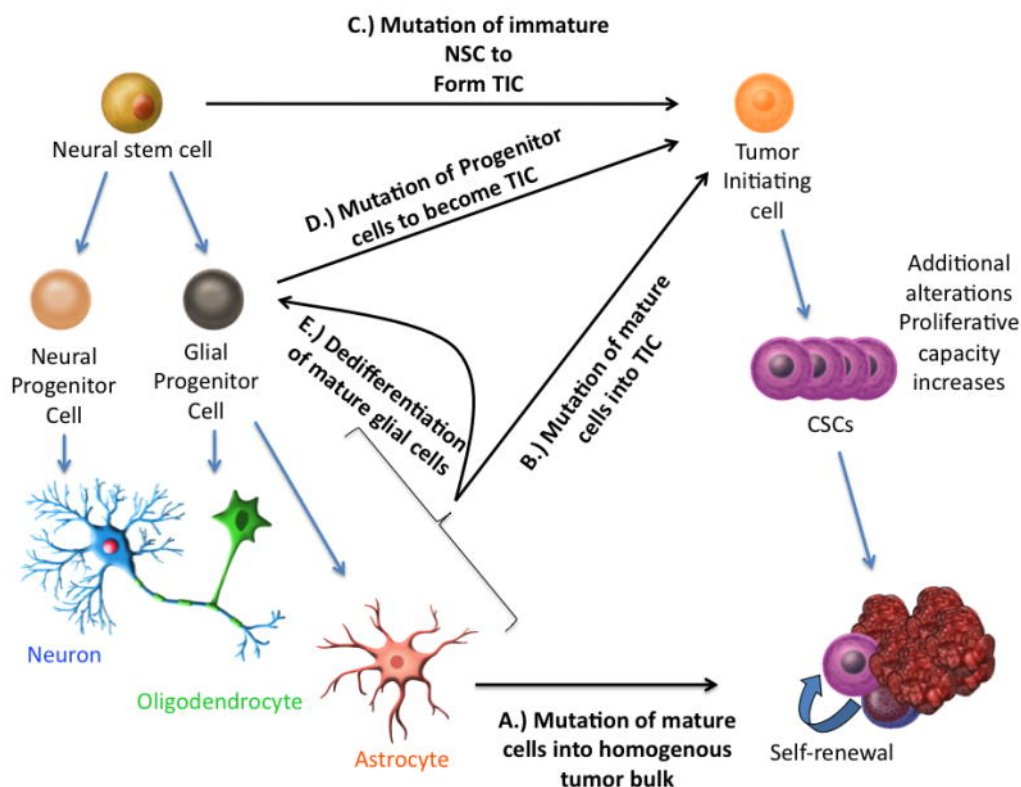
D'autres études ont par la suite confirmé l'existence de ces cellules souches cancéreuses dans différentes tumeurs solides et notamment dans le gliome (Singh et al., 2004). En plus de présenter des marqueurs de cellules souches normales et d'être capables de s'autorenouveler et de se différencier en tous les sous-types cellulaires présents dans la tumeur, ces cellules sont également capables d'initier une tumeur identique à celle dont elles sont issues lorsqu'elles sont injectées dans des souris immunodéprimées, et ce même en petite quantité. Ainsi, le meilleur test fonctionnel pour leur identification est leur capacité à former une tumeur après des xénotransplantations en série chez l'animal, d'autant plus que l'existence de marqueurs spécifiques de ces cellules est discutée (Clarke et al., 2006) (Figure 7). La fréquence de ces CSCs est très variable. Elle représente moins de 1% des cellules tumorales dans les leucémies et jusqu'à 25% dans les tumeurs solides (Visvader and Lindeman, 2008).



**Figure 7 : Protocole de xénotransplantations de CSCs en série chez des souris immunodéficientes.**

Les CSCs (en violet) sont isolées des cellules tumorales (en bleu) et injectées dans des souris immunodéficientes pour tester leur capacité à initier une tumeur. Afin de vérifier si la tumeur formée recrée l'hétérogénéité de la tumeur initiale, les CSCs sont de nouveau isolées et réinjectées dans une seconde souris immunodéficiente. (O'Brien et al., 2010)

Cependant, si à l'heure actuelle la majorité s'accorde sur l'existence des CSCs, leur origine reste discutée. Les CSCs pourraient provenir de cellules souches saines ayant acquis des mutations ou de cellules déjà engagées dans un processus de différenciation comme les cellules progénitrices et dont les mutations leur auraient conféré des propriétés souches aboutissant à leur dédifférenciation (Nduom et al., 2012) (Figure 8).



**Figure 8 : Hypothèses de l'origine des tumeurs dans le modèle du GBM.**

Une première hypothèse est que les cellules tumorales peuvent provenir de cellules gliales matures ayant subi des mutations et capables de former la masse tumorale (A). D'autres hypothèses reposent sur la présence de CSCs. Les cellules gliales subiraient des mutations induisant un phénotype de CSCs (B). Les cellules souches neurales pourraient être à l'origine des CSCs (C). Des mutations des progéniteurs pourraient induire des CSCs (D). Des mutations pourraient induire la dédifférenciation des cellules gliales et leur transformation en CSCs (E). (Nduom et al., 2012)

Ainsi, dans le cadre du gliome, les CSCs pourraient provenir de l'acquisition de mutations par les cellules souches neurales ou par les progéniteurs gliaux. Les CSCs pourraient également être issues de cellules gliales différenciées ayant subi des mutations entraînant leur dédifférenciation vers un phénotype souche.

## 2.2. Marqueurs des CSCs dans les gliomes

Etant donné leur rôle fortement supposé dans l'initiation et la récurrence de la tumeur, l'intérêt de trouver un marqueur permettant d'identifier et d'isoler les CSCs est majeur. Cependant, aujourd'hui, il n'existe pas de marqueur spécifique des CSCs et ceux utilisés sont généralement exprimés par les cellules souches et progéniteurs normaux (Tableau 3).

Tumor Type	Marker(s) Used to Enrich for CSCs
Acute myeloid leukemia	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup>
Breast	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup>
Breast	ALDH1 <sup>+</sup>
Brain	CD133 <sup>+</sup>
Prostate	CD44 <sup>+</sup> α <sub>2</sub> β <sub>1</sub> <sup>high</sup> CD133 <sup>+</sup>
Head and neck	CD44 <sup>+</sup>
Colon	CD133 <sup>+</sup>
Colon	EpCAM <sup>high</sup> CD44 <sup>+</sup>
Colon	ALDH1 <sup>+</sup>
Pancreas	ESA <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-</sup>
Pancreas	CD133 <sup>+</sup>
Mesenchymal	Side population
Lung	CD133 <sup>+</sup>
Liver	CD90 <sup>+</sup>
Melanoma	ABCB5 <sup>+</sup>
Ovarian	CD133 <sup>+</sup>

**Tableau 3 : Marqueurs d'identification des CSCs dans différents types de tumeurs.**  
(O'Brien et al., 2010)

Les marqueurs des CSCs diffèrent en fonction de l'origine cellulaire de la tumeur. Dans les AML, l'isolement des CSCs repose sur le phénotype CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>low</sup> dans le cancer du sein ou bien encore CD90<sup>+</sup> dans le cancer du foie. Dans les gliomes leur identification est principalement basée sur l'expression du marqueur CD133 (ou prominin-1) (Singh et al., 2004).

### 2.2.1. Marqueurs membranaires

#### 2.2.1.1. CD133 (Prominin-1)

Le CD133 (ou prominin-1) est une glycoprotéine transmembranaire identifiée dans un premier temps comme marqueur des cellules souches normales hématopoïétiques (Miraglia et al., 1997) et retrouvée exprimée dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) du cerveau en développement (Corbeil et al., 2000; Sawamoto et al., 2001; Weigmann et al., 1997). Ses fonctions ne sont pas encore définies mais le CD133 aurait un rôle dans l'organisation

structurale de la membrane plasmique (Corbeil et al., 2010). Dans le GBM, les travaux de Singh *et al.* ont montré qu'un faible nombre de cellules CD133<sup>+</sup> était capable d'initier une tumeur de phénotype identique à la tumeur initiale dans des souris immunodéficientes contrairement à des cellules CD133<sup>-</sup> (Singh et al., 2004). Cependant, des données plus récentes montrent que les cellules CD133<sup>-</sup> peuvent également initier des tumeurs *in vivo* (Chen et al., 2010a; Joo et al., 2008). De plus, la perte de l'expression de CD133 n'est pas associée à la perte du caractère souche *in vitro* et des cellules CD133<sup>-</sup> peuvent redonner des cellules CD133<sup>+</sup> *in vivo* (Patru et al., 2010; Wang et al., 2008). L'utilisation de ce marqueur est donc remise en question, d'autant plus que son expression est induite par HIF (Hypoxia inducible factor) et peut-être augmentée par le stress cellulaire (Griguer et al., 2008; Platet et al., 2007). Enfin, si certaines études ont pu mettre en évidence une corrélation entre son expression et des hauts grades de malignité ou un mauvais pronostic vital, d'autres ne lui confèrent pas de fonction pronostique.

D'autres marqueurs sont donc utilisés pour caractériser les CSCs dans les gliomes comme les marqueurs de cellules souches et/ou progéniteurs neuronaux tel que SSEA1 ou bien encore des marqueurs identifiés dans d'autres types tumoraux comme le CD44 ou le CD90.

#### **2.2.1.2. SSEA1 (CD15/Lewis X)**

Les SSEA (stage-specific embryonic antigens) sont des trisaccharides appartenant à la famille des glycanes composant les glycoprotéines ou glycolipides et retrouvées au niveau de la membrane cellulaire mais également au niveau de la matrice extracellulaire. Les fonctions des SSEA ne sont pas totalement élucidées mais ils joueraient un rôle dans l'adhésion et les contacts cellulaires (Hennen and Faissner, 2012). SSEA1 également nommé CD15 (Leucocyte cluster of differentiation 15) ou Lewis X, est normalement exprimé par les cellules souches et les progéniteurs du SNC embryonnaire et chez l'adulte (Capela and Temple, 2002). Son rôle dans la prolifération a été démontré de part ses interactions avec des facteurs de croissance comme le FGF (Fibroblast growth factor) ou bien encore avec la protéine Wnt-1 (Capela and Temple, 2006; Jirmanova et al., 1999). Les travaux de Son *et al.* ont démontré que des cellules de GBM n'exprimant pas CD133 mais positives pour SSEA1 avaient les caractéristiques de CSCs contrairement aux cellules négatives pour SSEA1, à savoir une capacité d'autorenouvellement et de différenciation *in vitro* et de tumorigénicité *in*



*in vivo* (Son et al., 2009). Aucune valeur pronostique de survie n'a été associée à l'expression de SSEA1 dans le GBM (Kim et al., 2011).

#### **2.2.1.3. CD44**

Le CD44 est une protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire. Elle est composée d'un domaine extracellulaire contenant un site de liaison à l'acide hyaluronique, un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine cytosolique. Le CD44 peut être clivé par des protéases appartenant à la famille des MMP (Matrix metalloproteinases) ou ADAM (A disintegrin and metalloproteinase). Il a été mis en évidence une corrélation entre la quantité de CD44 soluble et les capacités métastatiques dans de nombreux cancers dont le GBM (Chetty et al., 2012; Kuo et al., 2009; Najy et al., 2008). De plus, il a été montré que la forme cytosolique soluble peut être transloquée dans le noyau et favoriser la transactivation de gènes par le complexe CPB/p300 comme HIF-2 $\alpha$  (Okamoto, 2001; Pietras et al., 2014). Le CD44 est fortement exprimé dans les GBM de sous type mésenchymal (Phillips et al., 2006) et son expression est associée à un enrichissement en CSCs (Anido et al., 2010; Jijiwa et al., 2011; Pietras et al., 2014). *In vivo*, les cellules de GBM exprimant CD44 forment une tumeur plus agressive (Pietras et al., 2014). Enfin, une corrélation entre l'expression de CD44 et la malignité dans le gliome a été établie par certaines équipes (Buccoliero et al., 2003; Wei et al., 2010; Yoshida et al., 2012) alors que d'autres ne la mettent pas en évidence (Ylagan and Quinn, 1997).

#### **2.2.1.4. CD90 (Thy-1)**

Le CD90, aussi appelé Thy-1, est une protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire. Plusieurs études ont mis en évidence une forte expression de CD90 dans les gliomes et sa coexpression avec le marqueur CD133 (Kang and Kang, 2007; Liu et al., 2006; Pavon et al., 2014). He *et al.* supposent que les CSCs CD133<sup>+</sup> pourraient être une sous-population des cellules CD90<sup>+</sup> puisqu'ils montrent que toutes les cellules CD133<sup>+</sup> coexpriment le marqueur CD90 alors que toutes les cellules CD90<sup>+</sup> n'expriment pas le marqueur CD133 que ce soit *in vitro* ou sur des coupes de tumeurs (He et al., 2012). De plus, ils montrent que les cellules exprimant CD90 ont la même capacité à former des neurosphères *in vitro* qu'elles soient CD133<sup>+</sup> ou CD133<sup>-</sup>, mais une meilleure capacité à former des neurosphères que les cellules CD90<sup>-</sup>. Enfin, ils ont également montré que l'expression de CD90 est corrélée aux gliomes de haut grade. Ces données suggèrent que le CD90 pourrait être un bon marqueur de cellules

souches dans les gliomes de haut grade cependant d'autres études sont nécessaires pour démontrer son rôle en tant que marqueur souche ou de facteur pronostic.

## **2.2.2. Marqueurs intracellulaires**

Pour caractériser les CSCs, des marqueurs de cellules souches et/ou progéniteurs neuronaux intracellulaires telle que la nestine peuvent être utilisés. De plus, de nombreux facteurs de transcription connus pour maintenir la pluripotence et l'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires sont retrouvés exprimés dans de nombreux types de cancers, tels que Oct4, Sox2 et Nanog.

### **2.2.2.1. Nestine**

La nestine est un filament intermédiaire de classe VI impliqué dans l'organisation du cytosquelette. Cette protéine est fortement exprimée lors de l'embryogénèse des cellules souches neuroépithéliales et faiblement dans les cellules matures du SNC où elle laisse place aux marqueurs de différenciation neuronaux et gliaux. Son expression est retrouvée dans les gliomes et augmente avec le grade de la tumeur (Dahlstrand et al., 1992). Elle est également retrouvée associée à des marqueurs d'invasion tels que les cystéines cathepsines B et L, enzymes impliquées dans la dégradation des protéines dans les lysosomes et surexprimées dans les gliomes de haut grade (Strojnik et al., 2007). *In vivo*, il a été montré une ré-expression de la nestine dans des tumeurs dérivées de cellules de GBM négatives pour la nestine. De plus, l'inhibition de l'expression de la nestine par shRNA ralentit la croissance des tumeurs issues de cellules exprimant la nestine (Lu et al., 2011). Si ces travaux suggèrent fortement un rôle de la nestine dans la tumorigénèse, ils ne démontrent pas son rôle en tant que marqueur des CSCs. Enfin, bien que principalement cytoplasmique, il a été mis en évidence une forme membranaire de la nestine dans les cellules de GBM (Jin et al., 2013). Il s'agit d'une forme tronquée de la nestine d'environ 60kDa et possédant un domaine transmembranaire en N-terminal. Les cellules de GBM exprimant cette forme membranaire de la nestine prolifèrent plus rapidement et ont une meilleure capacité à initier des neurosphères *in vitro* (Jin et al., 2013). Si ces résultats restent à confirmer, la forme clivée de la nestine la rendrait bon candidat pour l'isolation de CSCs vivantes. D'un point de vue clinique, si certaines études ont pu corrélérer la forte expression de la nestine à un mauvais pronostic dans les gliomes (Arai et al., 2012; Wan et al., 2011), d'autres ne mettent pas en

évidence cette association (Chinnaiyan et al., 2008) ou uniquement dans les gliomes de bas grade (Dahlrot et al., 2014).

#### **2.2.2.2. Oct4**

Oct4, aussi connu sous le nom de Oct3/4 et de POU5F1 appartient à la famille des facteurs de transcription à domaine POU et est essentiel au maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (ESCs) (Nichols et al., 1998). Il est exprimé dans les cellules souches neurales (NSCs) dans les stades précoces de l'embryogénèse et l'induction de son expression dans les NSCs adultes les reprogramme en cellules souches pluripotentes (Kim et al., 2009; Lee et al., 2010). Oct4 est exprimé dans les gliomes et est nécessaire à la maintenance des CSCs (Du et al., 2009; Guo et al., 2011). Il est retrouvé coexprimé avec Sox2 et Nanog et parmi ces cellules triplement marquées, il a été montré que la moitié exprime également le CD133 et la nestine (Guo et al., 2011). L'inhibition de l'expression d'Oct4 induit la différenciation des CSCs de gliome, empêche la formation de neurosphères *in vitro* et de tumeurs *in vivo* et sensibilise les cellules à des agents chimiothérapeutiques (Ikushima et al., 2011; Morfouace et al., 2014). Son rôle dans le maintien du phénotype souche des cellules de gliome se ferait via son interaction avec Sox4 induisant ainsi la transcription de Sox2 (Ikushima et al., 2011). Enfin, l'expression d'Oct4 est corrélée au grade de gliome (Guo et al., 2011) et induite par HIF-2 $\alpha$  en hypoxie (Covello et al., 2006).

#### **2.2.2.3. Sox2**

Sox2 (SRY (Sex determining region Y)-related HMG (High mobility group) box2) est un facteur de transcription contenant un domaine HMG de liaison à l'ADN, jouant également un rôle dans le maintien du phénotype souche des ESCs et des NSCs (Kamachi et al., 2000). Il est surexprimé dans les gliomes et son expression est corrélée à l'expression de la nestine et de CD133 ainsi qu'au grade de gliome (Ben-Porath et al., 2008; Guo et al., 2011; Ikushima et al., 2009). Il a été montré que l'expression de Sox2 est induite par la voie du TGF- $\beta$  via l'activation de Sox4 maintenant ainsi le phénotype souche des CSCs de gliomes (Ikushima et al., 2009). L'inhibition de l'expression de Sox2 ou de Sox4 diminue la capacité à former des neurosphères, induit la différenciation des CSCs de gliome et empêche la formation de tumeur *in vivo* (Gangemi et al., 2009; Ikushima et al., 2009).

#### 2.2.2.4. Nanog

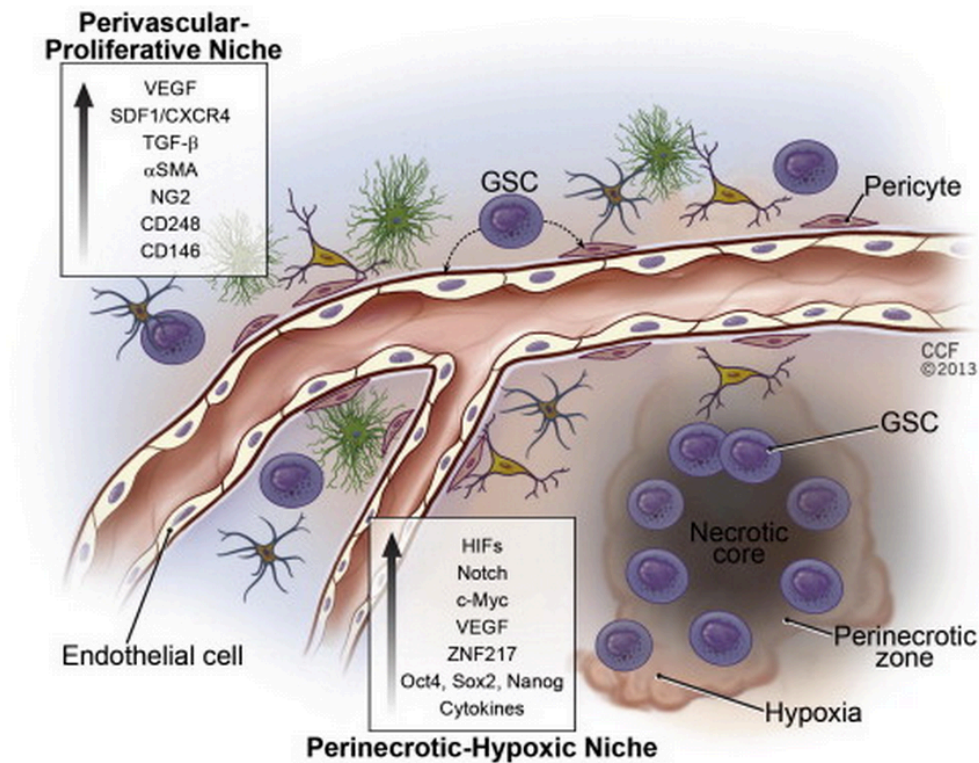
Tout comme Oct4 et Sox2, Nanog est un facteur de transcription régulant la pluripotence des ESCs (Hart et al., 2004). Son expression est retrouvée dans les gliomes et corrélée au grade de gliome (Ben-Porath et al., 2008; Guo et al., 2011; Niu et al., 2011). Nanog est essentiel pour la prolifération des CSCs *in vitro* et pour la formation de tumeur *in vivo* (Zbinden et al., 2010). Selon l'étude d'Elsir *et al.*, l'expression de Nanog pourrait être un bon facteur prédictif dans les gliomes (Elsir et al., 2014).

Même si beaucoup d'autres marqueurs potentiels de CSCs ont été étudiés dans les GBM tels que A2B5 (Ogden et al., 2008), L1CAM (Bao et al., 2008) ou bien encore CXCR4 (chemokine receptor type 4) (Ehtesham et al., 2009), il n'existe pas de consensus sur un unique marqueur de CSCs. De plus, aucune corrélation n'est clairement établie entre les marqueurs potentiels de CSCs et le pronostic vital des patients. Les différences observées entre les différentes études cliniques peuvent être expliquées par le fait qu'elles n'étudient pas les mêmes grades de gliomes, certaines différenciant uniquement les gliomes de bas grade des gliomes malins et d'autres différenciant chaque grade voire les GBM primaires des secondaires. De plus, les différences peuvent être également expliquées par l'utilisation de différents clones d'anticorps, ne reconnaissant pas les mêmes épitopes qui eux-mêmes varient par leur statut de glycosylation notamment pour le CD133. Finalement, l'utilisation de plusieurs marqueurs semble le plus approprié pour caractériser au mieux les CSCs d'autant plus que celles-ci peuvent provenir de cellules souches ou de progéniteurs à différentes étapes de différenciation et que les GBM sont des tumeurs présentant une grande hétérogénéité intra- et inter-tumorale.

### 2.3. Niches et hypoxie

Les cellules souches cancéreuses, tout comme les cellules souches neurales, résident dans un microenvironnement particulier, appelé niche. Ce microenvironnement est composé de multiples types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les péricytes, les astrocytes, les cellules immunitaires et la matrice extracellulaire qui génèrent de nombreux signaux induisant un contrôle de l'autorenouvellement et de la différenciation des cellules souches. Ces signaux incluent les BMPs (Bone morphogenic proteins), les voies Sonic Hedgehog (Shh), Wingless (Wnt) et Notch mais également les protéines d'adhésion telles que les cadhérines et les

facteurs mitogènes. Dans les GBM, la niche des CSCs comporte une région périvasculaire et une région hypoxique (Figure 9).



**Figure 9 : Microenvironnement des CSCs de GBM.**

Les CSCs de GBM résident dans des niches hypoxiques et périvasculaires dans lesquelles différents facteurs de croissance et cytokines maintiennent leur phénotype souche et leur prolifération. En retour, les CSCs augmentent l'expression, l'activation et la sécrétion de nombreuses molécules impliquées par exemple dans l'angiogénèse, la prolifération et la migration des cellules endothéliales. (Schonberg et al., 2014)

### 2.3.1. Niche périvasculaire

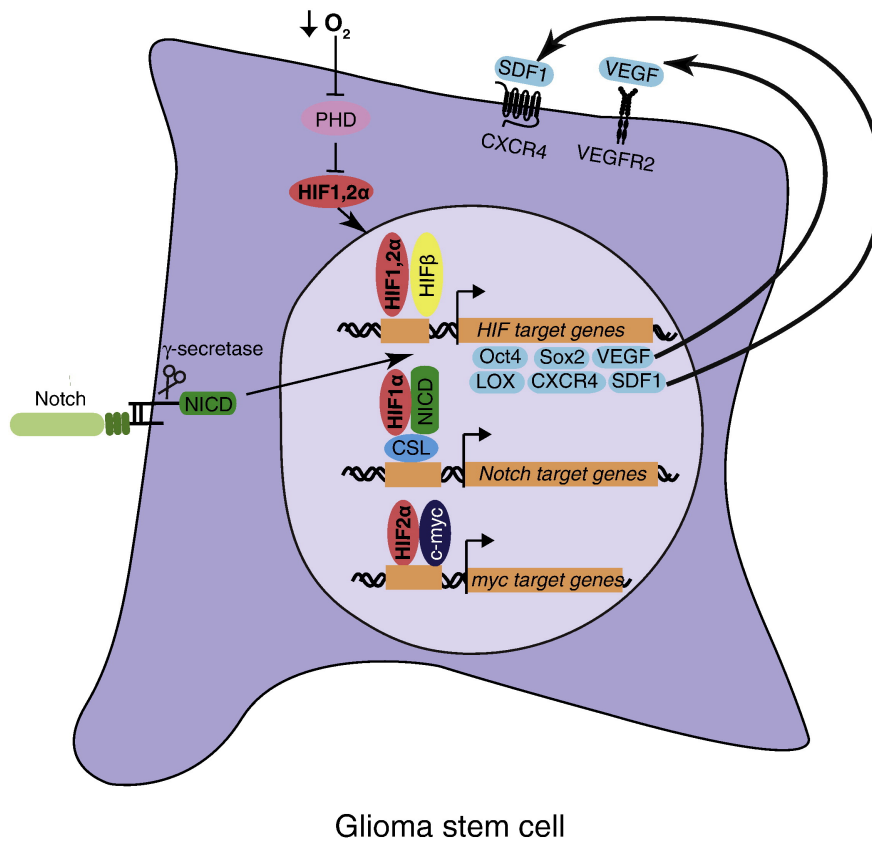
Les niches périvasculaires sont composées principalement de cellules endothéliales fournissant un site d'attachement aux CSCs et générant des facteurs régulant leurs fonctions (Figure 10).



La niche périvasculaire peut également contrôler le phénotype souche des CSCs. Les cellules endothéliales secrètent de nombreux facteurs impliqués dans la survie et le maintien du phénotype souche des CSCs (Figure 10). Au sein des tumeurs, les CSCs interagissent physiquement avec les cellules endothéliales et ces dernières sécrètent des ligands tels que JAG1 (Jagged1) ou DLL4 (Delta like ligand 4) activant la voie Notch des CSCs pour maintenir leur phénotype souche (Calabrese et al., 2007). *In vivo*, la co-injection de cellules endothéliales avec des CSCs de gliome augmente la croissance tumorale et cet effet est aboli par l'inhibition de l'expression de JAG1 ou de DLL4 (Calabrese et al., 2007; Zhu et al., 2011). Les cellules endothéliales produisent également de l'oxyde nitrique via la eNOS (endothelial nitric oxide synthase) qui active la voie Notch des CSCs et augmente la tumorigénicité de ces cellules *in vivo* (Charles et al., 2010). Enfin, les cellules endothéliales peuvent également produire Sonic Hedgehog (SHH) se fixant au récepteur Patched (PTCH) permettant la levée de répression de Smoothened (SMO) et l'activation du facteur de transcription Gli1. La voie SHH/Gli1 est impliquée dans le maintien du phénotype souche des CSCs et de leur tumorigénicité (Bar et al., 2007; Clement et al., 2007; Yan et al., 2014a). Enfin, il a été récemment démontré que les cellules endothéliales sécrètent également des facteurs activant la voie mTOR/Akt des CSCs de gliome permettant leur survie et le maintien de leur phénotype souche (Galan-Moya et al., 2011).

### **2.3.2. Niche hypoxique**

En plus de contenir des zones hautement vascularisées, les GBM contiennent également des zones hypoxiques formant des niches impliquées dans le maintien du phénotype souche et de la prolifération des CSCs (Figure 11).



**Figure 11 : Régulation des CSCs de gliome dans la niche hypoxique.**

Au sein des niches hypoxiques, les facteurs HIF permettent la maintenance des CSCs via l'induction de l'expression de gènes impliqués dans le maintien du phénotype souche. De plus, HIF peut induire l'expression de cytokines telles que VEGF et SDF-1 jouant un rôle dans la maintenance des CSCs de manière autocrine. (Filatova et al., 2013)

De plus, les GBM présentent très fréquemment des régions nécrotiques entourées par des cellules tumorales denses formant des pseudopalissades et caractérisées par un enrichissement en CSCs (Li et al., 2009). Evans *et al.*, ont analysé les concentrations en oxygène de tissus cérébraux normaux et de gliomes. Les concentrations physiologiques en oxygène dans le tissu sain varient de 12,5% à 2,5% et dans les GBM de 2,5% à 0,5% correspondant à de l'hypoxie moyenne, et de 0,5% à 0,1% pour de l'hypoxie modérée à sévère (Evans et al., 2008). Les réponses cellulaires à l'hypoxie sont médiées principalement par les facteurs de transcription HIF-(1-3) constitués de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité HIF- $\alpha$  est sensible à l'oxygène. En condition normoxique, elle est hydroxylée par les prolyl hydroxylases (PHD) puis complexée à VHL (Von Hippel-Lindau) permettant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. En condition hypoxique, HIF- $\alpha$  est stabilisé et s'hétérodimérise avec HIF-1 $\beta$ , exprimé constitutivement dans le noyau, pour induire la transcription de gènes cibles via leur fixation sur les séquences HREs (Hypoxia-



responsive elements) des promoteurs de gènes. Si HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  possèdent une activité transcriptionnelle, HIF-3 $\alpha$  ne possède pas de domaine d'activation transcriptionnel et joue un rôle de régulateur négatif de la transcription via la séquestration de HIF-1 $\beta$ .

Dans les gliomes, HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  sont tous les deux impliqués dans la régulation des CSCs puisque l'inhibition de l'expression de l'un ou de l'autre par siRNA diminue la prolifération et la capacité de formation de neurosphères des CSCs de gliome ainsi que la formation de tumeurs *in vivo* (Li et al., 2009). Cependant, HIF-1 $\alpha$  est induit par l'hypoxie à la fois dans les CSCs et dans les cellules cancéreuses de GBM alors que HIF-2 $\alpha$  semble plus spécifique des cellules souches puisqu'il est retrouvé surexprimé uniquement dans les CSCs en normoxie et en hypoxie et permet la surexpression de gènes spécifiques impliqués dans le maintien du phénotype souche (Li et al., 2009; Seidel et al., 2010). De plus, l'induction de son expression dans des cellules cancéreuses non souches de gliomes, induit l'expression de CD133, Oct4, Nanog et c-Myc et augmente la croissance tumorale *in vivo* (Heddleston et al., 2009). L'hypoxie via l'activation de HIF contribue au maintien des CSCs voire à une reprogrammation des cellules tumorales vers un phénotype souche aboutissant à une tumeur plus agressive (Helczynska et al., 2003; Jögi et al., 2002).

## **2.4. CSCs et résistance à la mort cellulaire**

L'échec des thérapies actuelles et la rechute quasi-systématique des patients atteints de GBM suggèrent la présence de cellules résiduelles présentant une résistance accrue aux traitements. En plus de la surexpression des voies de survie et de prolifération, les CSCs présentent une forte résistance à la mort cellulaire, notamment via la modification de leur balance des protéines pro/anti-apoptotiques en faveur de la survie, l'augmentation de leur capacité de réparation de l'ADN et de l'expression de transporteurs ABC (ATP binding cassette) (Liu et al., 2006). De plus, il a été montré par une étude de BH3 profiling dans un modèle de cancer colorectal, que les CSCs sont moins « primées » à l'apoptose que les cellules différenciées et donc qu'elles ont un seuil de déclenchement de l'apoptose plus élevé (Colak et al., 2014).

### **2.4.1. CSCs et résistance à l'irradiation**

Bien qu'elle ne reste que palliative de part la récurrence de la tumeur, la radiothérapie est le traitement le plus efficace dans le GBM après la chirurgie. Cependant, plusieurs études

ont montré un enrichissement de la tumeur en CSCs après irradiation *in vitro* et *in vivo* (Bao et al., 2006). De plus, il a été montré que les biopsies issues de tumeurs récurrentes de patients ayant été traités par radiothérapie étaient composées d'un nombre beaucoup plus important de cellules CD133<sup>+</sup> que les biopsies de tumeurs issues d'une première chirurgie avant traitement radiothérapeutique (Tamura et al., 2010). Une étude plus récente montre que l'irradiation peut induire la dédifférenciation des cellules de GBM et met en évidence le rôle de la survivine, protéine inhibitrice des caspases surexprimée dans les CSCs et après irradiation, dans ce phénomène (Dahan et al., 2014). Notre équipe a montré que l'irradiation induit la production et le relargage de PGE2 par les cellules de GBM, indépendamment de l'activation des caspases, promouvant la survie et la prolifération des cellules tumorales adjacentes via la transactivation du récepteur à l'EGFR et l'activation des voies Erk et Wnt/ $\beta$ -caténine (Brocard et al., 2015) (Annexe). Cependant, si certaines équipes ont montré que le PGE2 stimulait la prolifération des cellules souches et leur différenciation pour reformer la masse tumorale après irradiation, notre équipe n'a pu mettre en évidence une modification des marqueurs souches et de différenciation dans nos modèles de primocultures de GBM (Brocard et al., 2015; Durand and Zon, 2010; Huang et al., 2011; Li et al., 2010).

Un mécanisme de radiorésistance des CSCs est leur meilleure capacité de réparation des dommages à l'ADN (Bao et al., 2006; Jamal et al., 2012). En effet, les cellules CD133<sup>+</sup> présentent une activation accrue de différents points de contrôle des dommages à l'ADN comme ATM (Ataxia telangiectasia mutated), Rad17 et les kinases Chk1 et Chk2 (Bao et al., 2006; Jamal et al., 2012). D'ailleurs, l'inhibition des protéines kinases Chk1 et Chk2 diminue la radiorésistance des CSCs (Bao et al., 2006; Cheng et al., 2010). D'autres études mettent également en évidence l'augmentation de l'expression des checkpoint protéines dans les cellules CD133<sup>+</sup> comparé aux CD133<sup>-</sup> sans toutefois mettre en évidence une augmentation de la capacité des cellules CD133<sup>+</sup> à réparer l'ADN (McCord et al., 2009; Ropolo et al., 2009). Ces études sont réalisées sur des cellules issues de primocultures de GBM de patients et la radiorésistance des CSCs semble dépendante du sous-type de tumeur dont elles sont issues. Enfin, la résistance des CSCs à l'irradiation serait plus importante *in vivo* qu'*in vitro* mettant en évidence un rôle important du microenvironnement tumoral dans la résistance à la radiothérapie (Jamal et al., 2010).

Les voies de maintenance du phénotype souche sont également impliquées dans la radiorésistance des CSCs. L'inhibition de la voie Notch dans les CSCs de gliome sensibilise à la mort induite par les irradiations (Wang et al., 2010a). La voie Notch permettrait la

radiorésistance via l'activation de la voie PI3K/AKT et la surexpression de Mcl-1 spécifiquement dans les cellules CD133<sup>+</sup> de gliome (Wang et al., 2010a).

#### **2.4.2. CSCs et résistance à la chimiothérapie**

L'introduction du TMZ dans le protocole standard de traitement a permis un gain de survie des patients atteints de GBM. Cependant, en plus d'être résistantes à l'irradiation, les CSCs sont également des cellules très résistantes aux agents chimiothérapeutiques. Une des principales résistances aux agents alkylants tels que le TMZ est la surexpression de l'enzyme de réparation de l'ADN, la MGMT. Cette enzyme permet d'ôter les groupements méthyles induits par les agents alkylants sur les guanines en position O<sup>6</sup> de l'ADN, empêchant ainsi leurs effets cytotoxiques. Certaines études ont montré une augmentation de l'expression de la MGMT et de la résistance à différents agents chimiothérapeutiques dont le TMZ dans les cellules CD133<sup>+</sup> de GBM comparées aux cellules CD133<sup>-</sup> (Liu et al., 2006; Pistollato et al., 2010). L'induction du phénotype souche dans des cellules issues de lignées de GBM par la surexpression d'Oct4, de Sox2 et de Nanog augmente la résistance au TMZ (Olmez et al., 2015). De plus, certaines CSCs obtenues à partir de lignées de gliomes négatives pour la MGMT sont capables de la réexprimer (Qiu et al., 2014). Cependant, d'autres études mettent en évidence une sensibilité au TMZ plus importante des CSCs par rapport aux cellules différenciées (Beier et al., 2008; Clement et al., 2007). Si ces différences peuvent s'expliquer en partie par le fait que toutes les études ne font pas état de l'expression de la MGMT et n'utilisent pas les mêmes quantités de TMZ ni les mêmes temps de traitements, elles renforcent l'idée que la résistance des CSCs est dépendante du sous-type de tumeur dont elles sont issues.

Un deuxième mécanisme crucial dans la résistance des CSCs à la chimiothérapie est l'acquisition d'un phénotype nommé « multidrug resistance ». Les CSCs expriment fortement les pompes à efflux permettant d'exclure les agents chimiothérapeutiques de la cellule tels que les transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Cette famille de transporteurs inclut par exemple les protéines MDR1 (Multidrug résistance transporter 1 ou ABCB1 ou P-glycoprotein) et BCRP (Breast cancer resistance protein ou ABCG2). La capacité d'exclusion des drogues a été observée dans un premier temps dans les cellules souches hématopoïétiques par cytométrie en flux après marquage des cellules au Hoechst 33342 (Goodell et al., 1996). La population de cellules non marquées par le Hoechst 33342 a été nommée « side population » et correspond aux cellules souches. Il a été démontré que les cellules CD133<sup>+</sup> de

gliomes ont une plus forte expression de BCRP1 comparé aux cellules CD133<sup>-</sup> et que son inhibition sensibilise les CSCs à la chimiothérapie *in vitro* (Jin et al., 2009; Liu et al., 2006). De plus, l'induction ectopique de l'expression de CD133 induit une surexpression des transporteurs ABC et une diminution de la sensibilité à l'apoptose induite par la doxorubicine et la camptothécine (Angelastro and Lamé, 2010). Enfin, l'expression de BCRP1 est corrélée au grade de gliome (Jin et al., 2009).

Les voies de maintenance du phénotype souche sont également impliquées dans la chimiorésistance. Les voies Notch et Shh sont surexprimées après exposition au TMZ dans les cellules CD133<sup>+</sup> et leur inhibition sensibilise les cellules à la mort induite par le TMZ (Ulasov et al., 2011).

Enfin, les agents chimiothérapeutiques ciblent les cellules proliférant rapidement. Cependant, il a été mis en évidence que les cellules souches normales ainsi que les cellules souches leucémiques sont quiescentes. Même si ce phénomène n'a pu être encore démontré dans les tumeurs solides, la vitesse de prolifération lente des CSCs pourrait être également impliquée dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques.

La découverte de la présence de CSCs au sein des tumeurs, l'étude de leurs voies de signalisation, de l'influence de la niche et de leurs mécanismes de résistance aux traitements ont permis de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi des inhibiteurs des voies Notch et Shh sont actuellement en phase d'essai clinique (Kim et al., 2014; Krop et al., 2012). De plus, la plus forte résistance des CSCs aux traitements par rapport aux cellules cancéreuses différenciées a orienté les stratégies thérapeutiques vers l'induction de la différenciation des CSCs notamment via la modification de leur métabolisme.

### **3. Recherche de nouvelles thérapies : ciblage du métabolisme**

L'essor du séquençage dans les années 1980 a permis d'identifier des mutations géniques associées au développement des cancers et d'aboutir au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les voies de signalisation essentielles pour la survie et la prolifération des cellules. Cependant les cellules cancéreuses accumulent de nombreuses mutations et la plupart des traitements ne ciblant qu'un seul gène restent encore inefficaces

dans de nombreux cancers. Ces dernières années, un regain d'intérêt pour l'étude du métabolisme des cellules tumorales a émergé de part deux découvertes majeures. L'une est que les enzymes du métabolisme sont régulées par des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. L'autre est que des mutations de gènes codant pour des enzymes du métabolisme sont associées au développement de certains cancers comme les mutations de la fumarate hydratase et de la succinate dehydrogenase associées respectivement au cancer des reins et aux paragangliomes. Les études menées sur le métabolisme ont permis de mettre en évidence des différences entre les cellules normales et cancéreuses, ouvrant sur de nouvelles stratégies thérapeutiques.

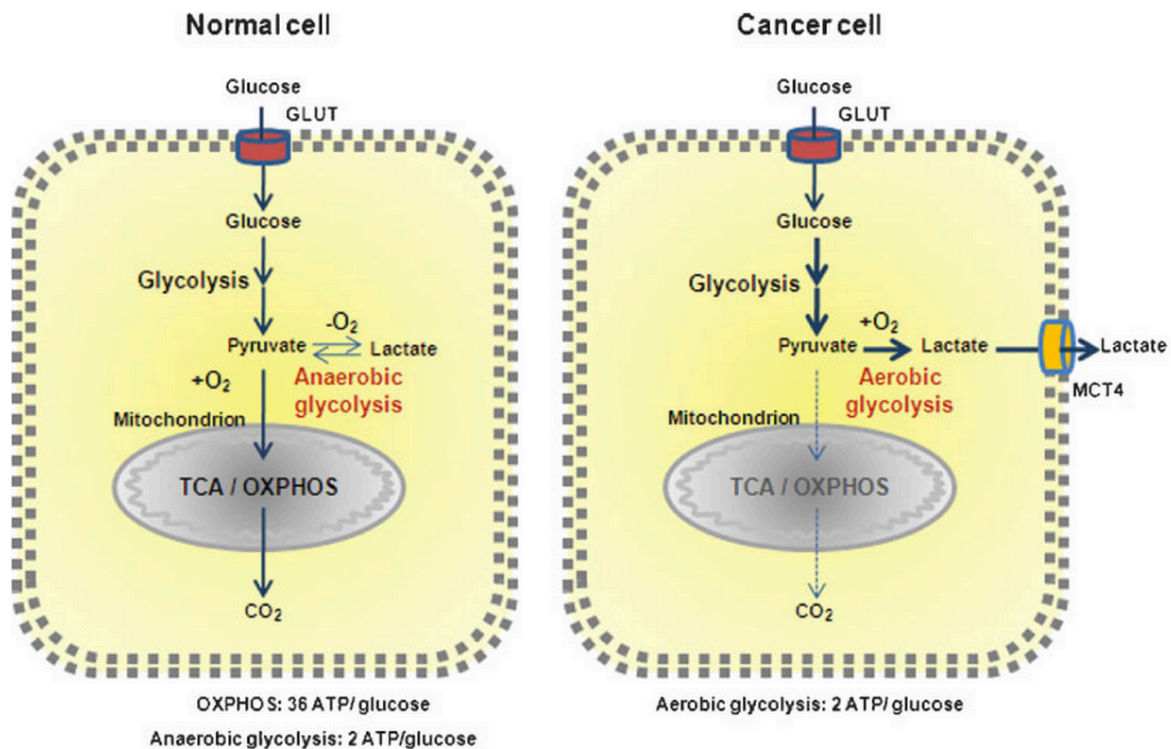
Les cellules qui prolifèrent ont des besoins énergétiques importants et nécessitent un métabolisme efficace pour permettre la synthèse de tous les éléments nécessaires à leur croissance et à leur division. Les deux principaux substrats énergétiques utilisés par les cellules en prolifération sont le glucose et la glutamine qu'elles transforment en lactate et/ou incorporent dans leurs mitochondries pour alimenter leur cycle de Krebs ou TCA (Tricarboxylic acid cycle) et produire de l'ATP via la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS). Les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme afin de répondre aux besoins beaucoup plus importants en énergie et en précurseurs des voies de biosynthèse nécessaires à leur prolifération rapide. Cette modification du métabolisme énergétique a d'ailleurs été récemment incluse parmi les marqueurs caractéristiques des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011).

### **3.1. Métabolisme du glucose**

Le glucose est l'un des principaux substrats énergétiques utilisés par les cellules qui l'incorporent via les transporteurs au glucose (GLUT). Il peut être dirigé vers trois voies : la glycolyse, la voie des pentoses phosphates (PPP) et la voie des hexosamines (HBP). La glycolyse aboutit à la formation de pyruvate pouvant avoir deux devenir. En condition aérobie, la majorité du pyruvate est dirigée vers la mitochondrie et est convertie en acetylCoA pour alimenter le TCA. En absence d'oxygène, le pyruvate est essentiellement converti en lactate via la lactate déshydrogénase (LDH) et permet de reformer du  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamide adenine dinucleotide) nécessaire à la glycolyse.

Dès les années 1920, Otto Warburg a pu montrer que les cellules cancéreuses consomment de grandes quantités de glucose qu'elles transforment principalement en lactate et ce même en

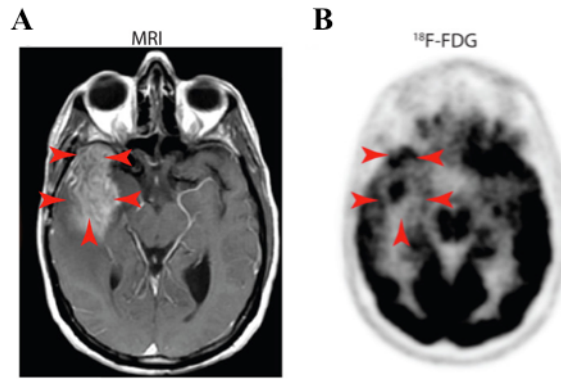
présence d'oxygène (Warburg, 1956; Warburg et al., 1927) (Figure 12). Cette voie est appelée glycolyse aérobie ou effet Warburg.



**Figure 12 : Différences de métabolisme entre les cellules normales et les cellules tumorales.**

Les cellules normales métabolisent le glucose en pyruvate et l'oxydent complètement en  $\text{CO}_2$  via le cycle de Krebs et l'OXPHOS, aboutissant ainsi à la formation de 36 molécules d'ATP. Lorsque l' $\text{O}_2$  est limitant, le pyruvate est converti en lactate générant seulement 2 molécules d'ATP par molécule de glucose. Dans les cellules cancéreuses, le glucose est dirigé vers les voies de biosynthèses et vers la production de lactate et ce même en présence d' $\text{O}_2$  (effet Warburg). (Marie and Shinjo, 2011)

La particularité des cellules cancéreuses à utiliser de grandes quantités de glucose est aujourd'hui utilisée en imagerie clinique pour visualiser les tumeurs solides et leurs métastases en PET-scan (positron emission tomography) en utilisant un analogue du glucose marqué, le 2-(18F)-fluoro-2-D-glucose (FDG) (Figure 13).



**Figure 13 : Utilisation d'un analogue marqué du glucose en imagerie médicale chez les patients atteints de GBM.**

La tumeur est délimitée par les flèches rouges. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) de contraste met en évidence la tumeur d'un patient atteint de GBM (A). Le PET-scan (tomographie par émission de positons) montre l'incorporation du  $^{18}\text{F}$ -FDG par la tumeur cérébrale (B). (Venneti et al., 2015)

L'effet Warburg a un faible rendement énergétique avec la production de seulement 2 molécules d'ATP par molécule de glucose contrairement à l'oxydation complète du glucose par le TCA et l'OXPPOS permettant de produire jusqu'à 36 molécules d'ATP. Plusieurs hypothèses existent sur le fait que les cellules cancéreuses privilégient cette voie au détriment de l'OXPPOS. Otto Warburg avait initialement proposé que les cellules tumorales présentaient des mitochondries défectueuses. Depuis il a été démontré que la plupart des cellules tumorales possèdent des mitochondries fonctionnelles et d'autres hypothèses ont émergé.

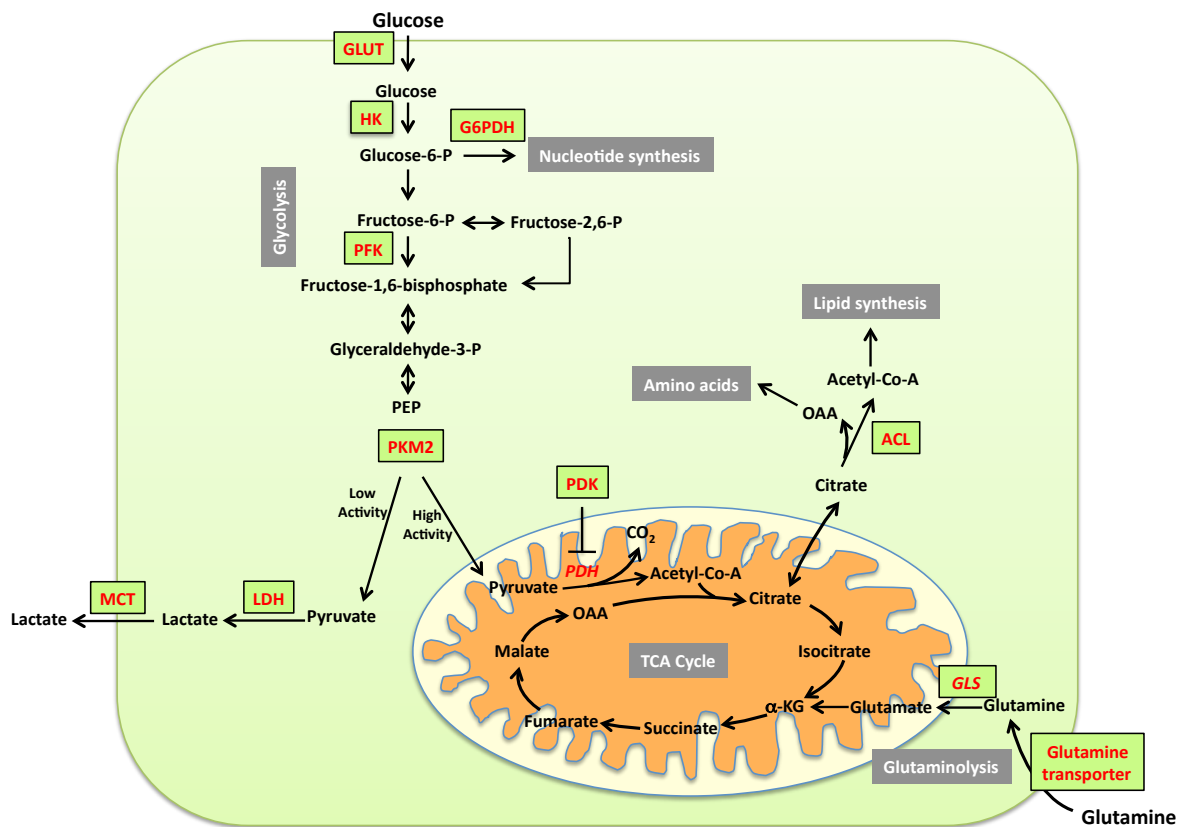
### 3.1.1. Hypothèse de la biodisponibilité des substrats

Les cellules cancéreuses se trouvent dans un environnement constamment fluctuant en apport d'oxygène et de nutriments (Cárdenas-Navia et al., 2008). Elles doivent donc faire preuve d'une plasticité métabolique leur permettant de résister à la pression du microenvironnement tumoral. En effet, les cellules tumorales, de part leur vitesse de prolifération, se retrouvent rapidement dans un environnement hypoxique. La diminution des apports en oxygène va induire une diminution de la respiration mitochondriale et un shift du métabolisme vers la glycolyse aérobie (Pouysségur et al., 2006). De plus, l'hypoxie, via l'activation de HIF-1 $\alpha$ , promeut la glycolyse et le recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins. Cette néovascularisation, bien qu'anormale structurellement, va permettre un apport en nutriments aux cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses auraient donc accès à des

quantités importantes de glucose et pourraient ainsi produire autant d'ATP via la voie de la glycolyse aérobie que via l'OXPHOS (Vander Heiden et al., 2009).

### 3.1.2. Hypothèse des intermédiaires de la glycolyse

En plus de l'ATP, les réactions biochimiques nécessaires à la duplication de la biomasse cellulaire requièrent des carbones et des coenzymes tel que le NADPH. L'effet Warburg permettrait aux cellules cancéreuses d'accumuler des intermédiaires de la glycolyse nécessaires aux voies de biosynthèse des nucléotides, acides aminés et lipides ainsi qu'à la production de NADPH (Figure 14).



**Figure 14 : Adaptations métaboliques des cellules cancéreuses.**

Le glucose et la glutamine sont les deux principaux substrats énergétiques utilisés par les cellules cancéreuses. Le glucose est importé dans les cellules via les transporteurs au glucose (GLUT) et phosphorylé par l'hexokinase (HK). Le glucose est ensuite métabolisé en pyruvate via la glycolyse ou dirigé vers la voie des pentoses phosphates (PPP). Le pyruvate est principalement converti en lactate, et ce même en présence d'O<sub>2</sub>, et excrété de la cellule par les transporteurs MCT. La glutamine est convertie en glutamate via la glutaminase (GLS) et alimente le TCA. (Adapté de (Pecqueur et al., 2013))



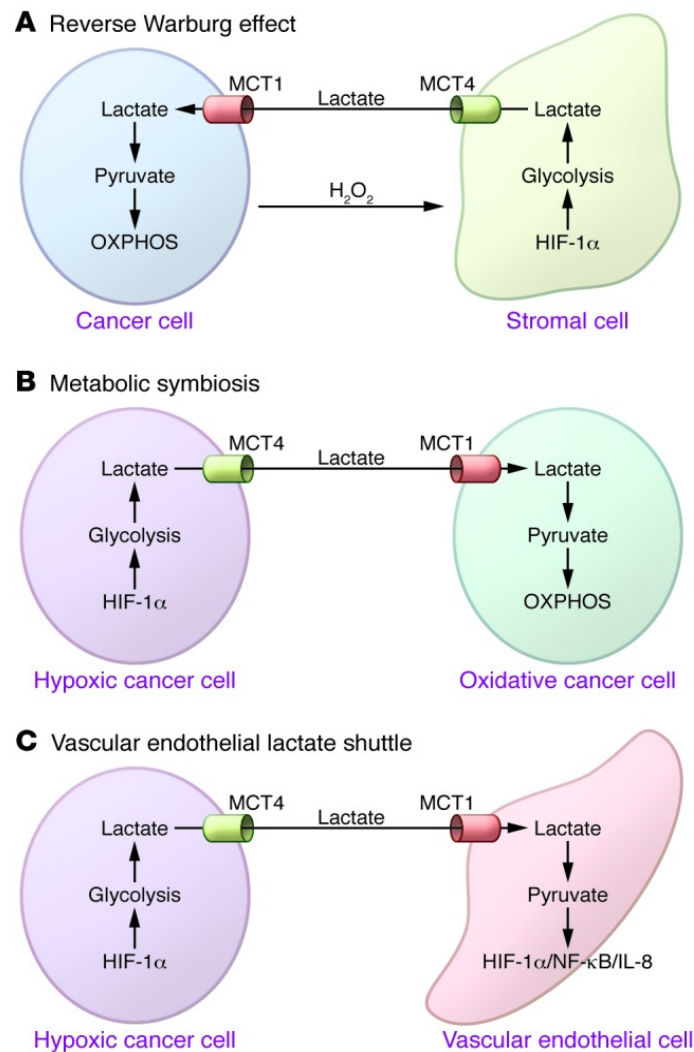
Un des phénomènes appuyant cette hypothèse est la surexpression dans les cellules cancéreuses de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase (PKM2), enzyme permettant la conversion du phosphoenolpyruvate (PEP) en pyruvate (Mazurek et al., 2005). Cet isoforme M2, contrairement à l'isoforme M1 tétramérique toujours actif, peut être dimérique ou tétramérique. La conformation en dimère ou en tétramère est directement corrélée à l'activation de l'enzyme. La forme dimérique de PKM2 possède une affinité plus faible pour son substrat, la PEP, résultant en l'accumulation des intermédiaires en amont de cette enzyme et ainsi en la redistribution des carbones vers les voies de biosynthèses telle que la voie PPP pour la synthèse des nucléotides, ou les voies de synthèse des acides aminés via l'accumulation de 3-phosphoglycerate (3-PG) et de PEP (Christofk et al., 2008). Les différentes conformations de PKM2 permettent de réguler le flux de carbone entre les voies de biosynthèse et la formation de pyruvate. Il s'agit d'un processus dynamique impliquant une boucle d'autorégulation puisque la forme dimérique de PKM2 induit l'accumulation de fructose-1,6-biphosphate (F1,6BP) qui en forte concentration promeut la tétramérisation de PKM2. La PKM2 sous sa forme active va augmenter le flux glycolytique vers la production de lactate jusqu'à induire la diminution de la quantité de F1,6BP résultant en la dissociation du tétramère en dimère. Ces conformations sont également régulées par les tyrosines kinases et les ROS qui déstabilisent la forme tétramérique de PKM2, respectivement par la phosphorylation de résidus tyrosines et par l'oxydation de résidus cystéines présents au site de fixation de F1,6BP entraînant son relargage et le retour à la forme dimérique (Anastasiou et al., 2011, 2012; Christofk et al., 2008). Enfin, dans les cellules cancéreuses, le pyruvate non transformé en lactate peut-être importé dans la mitochondrie pour être converti en substrats pour la production d'autres acides aminés et la synthèse des acides gras.

### **3.1.3. Hypothèse du lactate**

L'effet Warburg induit une sécrétion importante de lactate responsable de l'acidification du microenvironnement tumoral. Ce phénomène favoriserait l'invasion tumorale et l'immunosuppression. En effet, certaines études ont mis en évidence le rôle de l'acidité du pH dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse et de l'angiogénèse, respectivement via l'augmentation de l'expression de protéases ou de répresseurs de protéines d'adhésion telles que la vimentine et la cadhérine et via l'augmentation de facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF (Fukumura et al., 2001; Rofstad, 2006; Suzuki et al., 2014). D'autres études ont montré que le lactate induit la

sécrétion de cytokines proinflammatoires telle que l'IL-23 produite par les macrophages et les cellules dendritiques (Shime et al., 2008) et impliquée dans la diminution de la prolifération, de l'activité et de l'infiltration des lymphocytes T cytotoxiques au sein de la tumeur (Fischer et al., 2007; Mendler et al., 2012).

D'un point de vue métabolique, il a également été démontré que le lactate peut être utilisé comme source d'énergie par les cellules tumorales (Figure 15).



**Figure 15: Métabolisme du lactate par les cellules cancéreuses.**

Trois modèles d'utilisation du lactate par les cellules cancéreuses existent. Les cellules cancéreuses créent un environnement hypoxique via la sécrétion d' $H_2O_2$ , induisant les cellules stromales à sécréter du lactate, qu'elles incorporent ensuite via leur transporteur MCT1 (A). Dans le modèle de symbiose, les cellules tumorales d'une région hypoxique de la tumeur sécrètent du lactate qui est incorporé par les cellules tumorales d'une région oxygénée de la même tumeur (B). Le lactate excrété par les cellules tumorales est capté par les cellules endothéliales où il est converti en pyruvate activant HIF-1 $\alpha$  et la voie NF- $\kappa$ B/IL-8 (C). (Doherty and Cleveland, 2013)

Le groupe de Lisanti a mis en évidence que les cellules tumorales créent un environnement hypoxique induisant les cellules stromales à produire du lactate qu'elles vont ensuite incorporer via les transporteurs des monocarboxylates 1 (MCT1) pour alimenter leur TCA. Ce phénomène est nommé l'effet Warburg réverse (Pavlides et al., 2009). Sonveaux *et al.* ont également mis en évidence ce phénomène entre cellules tumorales. Ils ont montré que le lactate produit par les cellules tumorales d'une région hypoxique de la tumeur est incorporé par les cellules d'une région oxygénée via MCT1 pour alimenter leur TCA. *In vivo*, ils ont montré que l'inhibition de l'expression de MCT1 diminue la croissance tumorale (Sonveaux et al., 2008). Enfin, le lactate jouerait également un rôle dans la migration des cellules endothéliales et l'angiogénèse via sa conversion en pyruvate. Le pyruvate entrerait en compétition avec le l' $\alpha$ KG comme substrat des PHD, entraînant une diminution de l'activité des PHD et ainsi la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  et de NF $\kappa$ B (Sonveaux et al., 2012; Végran et al., 2011).

Toutes ces hypothèses ne sont pas exclusives mutuellement et si dans un premier temps le switch métabolique peut sembler être la conséquence d'une adaptation des cellules cancéreuses à leur microenvironnement, il joue un rôle crucial dans la progression tumorale en fournissant l'énergie et la biomasse nécessaire à la prolifération rapide des cellules et en favorisant l'invasion. Cette hypothèse est renforcée par le fait que ce switch métabolique, via la surexpression des enzymes de la glycolyse, est impliqué dans les mécanismes de résistance à la mort cellulaire.

#### **3.1.4. Métabolisme glycolytique et résistance à la mort cellulaire**

Si le métabolisme glycolytique permet la forte prolifération des cellules cancéreuses, il les protège également de la mort cellulaire. En effet, les cellules tumorales, en privilégiant la glycolyse aérobie, présentent un potentiel de membrane mitochondriale plus élevé de part le faible flux d'ions au sein de la chaîne respiratoire (Bonnet et al., 2007). Cette hyperpolarisation de la membrane mitochondriale induit une augmentation du seuil d'ouverture des pores mitochondriaux et donc un plus faible relargage des facteurs pro-apoptotiques. De plus les cellules cancéreuses surexpriment des enzymes de la glycolyse dont différents rôles dans la résistance à la mort cellulaire ont été démontrés.

#### **3.1.4.1. Hexokinase II**

L'hexokinase II (HKII) est l'enzyme permettant la conversion du glucose en glucose-6-phosphate (G6P). Dans le GBM, il a été montré que la surexpression de HKII induit une augmentation de la prolifération cellulaire et une augmentation de la résistance à l'apoptose (Wolf et al., 2011). Plusieurs études ont montré que HKII peut sous sa forme phosphorylée se lier à VDAC (voltage dependant anion channel) et ainsi interférer avec la liaison de la protéine pro-apoptotique Bax et empêcher le relargage des protéines de l'espace intermembranaire des mitochondries comme le cytochrome C (Pastorino et al., 2002). Dans les cellules cancéreuses 50 à 80% des hexokinases sont retrouvées liées à la membrane mitochondriale externe (Pastorino et al., 2002). Cette association de HKII à VDAC est sous le contrôle d'Akt qui induit la phosphorylation et ainsi l'inhibition de l'activité de la GSK3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase-3  $\beta$ ). Cette dernière, lorsqu'elle est activée, induit la phosphorylation de VDAC empêchant sa fixation à HKII (Pastorino, 2005). Enfin, il a été montré qu'en condition de privation en glucose, HKII stimule l'autophagie via l'inhibition de mTORC1 (Roberts et al., 2014).

#### **3.1.4.2. Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase**

La GAPDH (glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase) permet la conversion de la glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-bisphosphoglycerate avec la réduction de NAD<sup>+</sup> en NADH. En plus de son activité enzymatique, elle pourrait se lier à l'ADN et s'associer à des facteurs de transcription tel que Oct-1 pour activer la transcription de gènes codant pour les histones (Zheng et al., 2003). La LDH, permettant la conversion du pyruvate en lactate, serait également impliquée dans ce complexe. De plus, il a été montré que la GAPDH joue un rôle dans la mort cellulaire. Certaines études lui ont conféré un rôle pro-apoptotique. En effet, son expression est retrouvée augmentée dans les neurones lors de l'apoptose et l'inhibition de son expression empêche l'apoptose (Ishitani and Chuang, 1996; Sunaga et al., 1995). Cependant, d'autres études ont mis en évidence un rôle dans la résistance à la mort cellulaire. En effet, il a été démontré que la GAPDH ne protégerait pas les cellules de l'apoptose mais les protégerait de la mort cellulaire indépendante des caspases (CICD) via la stimulation de la glycolyse et l'augmentation de la quantité d'ATP permettant de maintenir le potentiel de membrane mitochondrial et via l'augmentation de la transactivation de gènes impliqués dans l'autophagie (Colell et al., 2007). Plus récemment, il a été montré que la GAPDH protège de la CICD en induisant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-XL (Jacquin et al.,

2013). La GAPDH se fixerait à la forme phosphorylée d'Akt et la stabiliserait inhibant ainsi la translocation nucléaire de FoxO et la transcription de Bcl-6, inhibiteur transcriptionnel de Bcl-XL. De plus, l'inhibition de l'expression de la GAPDH sensibilise les cellules résistantes de leucémie myéloïde chronique à la CICD induite par l'imatinib (Lavallard et al., 2009). Enfin, un rôle de la GAPDH dans la réparation de l'ADN a également été démontré. La GAPDH peut interagir avec APE1 (apurinic/ apyrimidinic protein endonuclease) et ainsi activer cette endonucléase impliquée dans l'excision de bases lors de la réparation de l'ADN (Azam et al., 2008).

#### **3.1.4.3. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases**

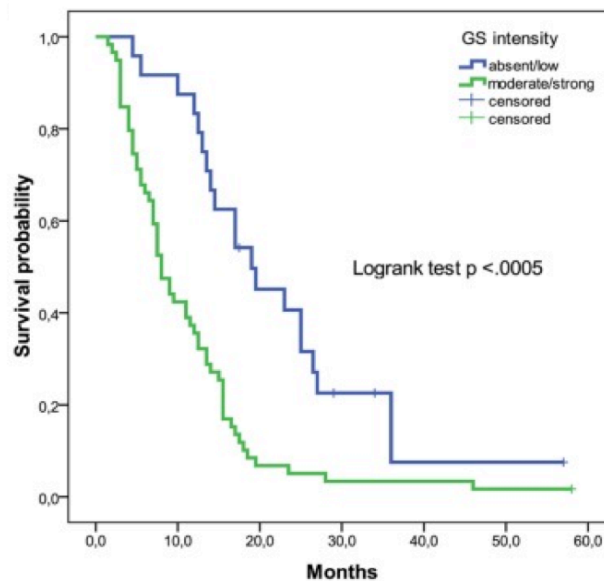
La PFKFB (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases) permet la conversion du fructose-6-phosphate (F6P) en fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP). Il a été démontré une localisation nucléaire de l'isoforme PFKFB3 (Yalcin et al., 2009). Le F2,6BP ainsi formé dans le noyau stimule Cdk1 entraînant la phosphorylation de p27 et sa dégradation par le protéasome (Yalcin et al., 2014). La protéine p27 contrôle la progression du cycle cellulaire en phase G1 en prévenant l'activation du complexe cyclin-E/Cdk2. PFKFB3 permet donc la diminution de l'expression de p27 via l'accumulation de F2,6BP et ainsi empêche l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose.

#### **3.1.4.4. Pyruvate kinase M2**

Outre son rôle dans la conversion du PEP en pyruvate, la PKM2 peut être transloquée dans le noyau et jouer un rôle dans la mort cellulaire. Il a été montré que la PKM2 peut sensibiliser à la mort indépendante des caspases suite à différents stimuli pro-apoptotiques comme les UV ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Steták et al., 2007). D'autres études ont mis en évidence que l'inhibition de PKM2 sensibilise les cellules cancéreuses à l'apoptose. Hu *et al.* ont démontré le rôle de PKM2 dans la résistance à l'apoptose via la dégradation de Bim dans des cellules de carcinome hépatocellulaire (Hu et al., 2015). Dans notre laboratoire, il a été démontré que l'inhibition de l'expression de PKM2 dans les cellules de GBM augmente la sensibilité à la mort induite par l'étoposide et les irradiations sous traitement au dichloroacétate, molécule favorisant l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie (Morfouace et al., 2014). Notre équipe a également montré que PKM2 peut interagir avec Oct4 et ainsi inhiber son activité transcriptionnelle, conduisant à la différenciation des CSCs de gliome (Morfouace et al., 2014).

## 3.2. Métabolisme de la glutamine

D'abord démontrée dans les cellules HeLa, la dépendance à la glutamine a été mise en évidence dans plusieurs lignées cellulaires tumorales (Reitzer et al., 1979). Cet acide aminé est impliqué dans le métabolisme oxydatif et la génération d'ATP, la biosynthèse des acides aminés, acides nucléiques et lipides ainsi que dans l'homéostasie rédox. L'importance de la glutamine pour les cellules cancéreuses est supportée par le fait que la glutaminase (GLS), enzyme permettant la conversion de la glutamine en glutamate, est retrouvée fortement exprimée et très active dans les cellules tumorales et que son inhibition diminue la prolifération des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Gao et al., 2009). De plus, une absence ou une faible expression de la glutamine synthase, enzyme permettant la synthèse de la glutamine, est associée à une meilleure survie des patients atteints de GBM (Rosati et al., 2013) (Figure 16). Sa surexpression ou sa forte activité enzymatique est associée à un faible pronostic vital et à la récurrence de la tumeur chez patients atteints de carcinomes hépatocellulaires (Osada et al., 2000).



**Figure 16 : Courbes de Kaplan-Meier estimant la survie des patients atteints de GBM.** Les patients atteints de GBM exprimant fortement la Glutamine synthase (GS) ont un pronostic vital plus faible que les patients ne l'exprimant pas ou faiblement. (Rosati et al., 2013)

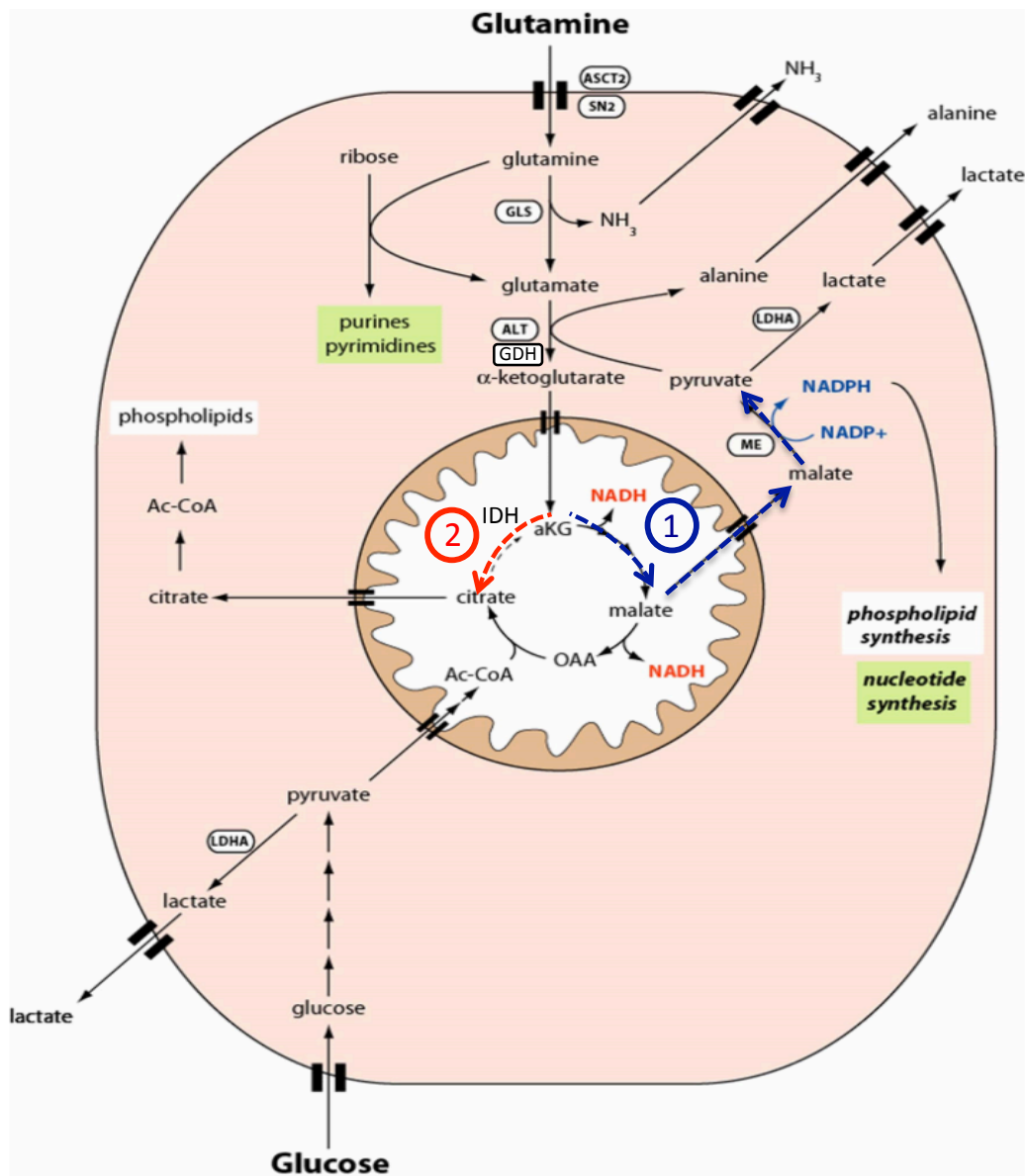
### 3.2.1. Précurseur de l' $\alpha$ -ketoglutarate

Il existe différents types de transporteurs de la glutamine au niveau de la membrane plasmique transportant également d'autres acides aminés. Ces transporteurs peuvent être

dépendants ou indépendants du sodium. Parmi les transporteurs dépendants du  $\text{Na}^+$ , certains sont classés dans le système N présentant une spécificité pour l'histidine et l'asparagine ou dans le système ASC spécifique pour l'alanine, la sérine et la cystéine. Une autre classification des transporteurs de la glutamine existe sous le nom SLC (solute carrier) (Pochini et al., 2014). Dans les cellules cancéreuses, SLC1A5 (ou ASCT2) est le plus exprimé (McGivan and Bungard, 2007).

La glutamine, après incorporation dans la cellule, va être convertie en glutamate via la glutaminase (GLS) avec la formation d'azote servant aux voies de biosynthèses des nucléotides ou excrété de la cellule sous forme d'ammonium. Il existe 2 formes de GLS, une codée par le gène *GLS1* appelée KGA (kidney-type glutaminase) et exprimée de manière ubiquitaire et une autre codée par le gène *GLS2* nommée LGA (liver-type glutaminase) et exprimée principalement dans le foie mais également dans le pancréas et le cerveau. Il existe deux variants du gène *GLS1*, différant selon leur région C-terminale, une forme longue nommée KGA et une forme courte GAC (glutaminase C).

Deux voies de conversion du glutamate en  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG) existent. La conversion du glutamate en  $\alpha$ KG peut se faire via une désamination oxydative par la glutamate dehydrogenase (GDH) dans la mitochondrie. Cette conversion peut également se faire via une transamination produisant les acides aminés non essentiels, dans la mitochondrie ou le cytosol, faisant appel à l'ALAT (alanine amino-transférase) ou à GOT (glutamate oxaloacétique transaminase) aussi appelée AAT (aspartate amino-transférase) (Figure 17). L'utilisation de l'une ou l'autre de ces voies semble être dépendant du type de tumeur. Récemment, il a été montré que la prolifération de cellules de cancer du pancréas mutées pour KRAS dépend de la production de glutamate via la voie de transamination de l' $\alpha$ KG (Son et al., 2013). L' $\alpha$ KG ainsi formé est important comme substrat des dioxygénases comme les PHD et les histones demethylases mais aussi comme source anaplerotique du TCA des cellules cancéreuses.



**Figure 17 : Métabolisme de la glutamine dans les cellules cancéreuses.**

La glutamine est importée dans la cellule par des transporteurs tel que ASCT2 puis métabolisée via la glutaminolyse. La glutamine est convertie en glutamate par le glutaminase (GLS) ou via les enzymes de la synthèse des nucléotides. Le glutamate est ensuite converti en  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG) par la glutamate déshydrogénase (GDH) ou par des transaminases tel que l'alanine aminotransférase (ALT). L' $\alpha$ KG alimente le TCA pour la formation de malate et de NADPH nécessaire aux voies de biosynthèses. L' $\alpha$ KG peut également générer du citrate via sa décarboxylation par IDH et ainsi alimenter la voie de biosynthèse des lipides. (Adapté de Wise et al. 2008)



### **3.2.2. Source anaplérotique du TCA**

Il a été montré que la glutamine constitue un substrat essentiel aux cellules tumorales comme source de carbone anaplérotique du cycle de Krebs (DeBerardinis and Cheng, 2010). Les cellules cancéreuses qui prolifèrent rapidement présentent un TCA tronqué. En effet, une grande majorité du citrate est exporté de la mitochondrie pour générer de l'acetylCoA, précurseur des lipides dans le cytoplasme. Ce flux de métabolites hors du TCA est contrebalancé par la glutamine qui, via sa conversion en  $\alpha$ KG, va être à l'origine de la reformation de l'oxaloacétate (OAA) s'associant à l'acetylCoA pour reformer du citrate. Dans les cellules de GBM, il a été montré que la glutamine est la source principale d'OAA alors que le glucose est la source principale d'acetylCoA (DeBerardinis et al., 2007). Cette voie est importante dans les cellules cancéreuses dépendantes de la glutamine puisque la mort induite par une déplétion en glutamine peut être réversée par l'apport de pyruvate, d'OAA ou d' $\alpha$ KG (Wise et al., 2008; Yuneva et al., 2007).

La glutamine peut être également le précurseur direct du citrate par deux voies distinctes. Une première voie utilise l'OAA, formé à partir de l' $\alpha$ KG, pour reformer du malate qui est exporté de la mitochondrie puis converti en pyruvate via l'enzyme malique. Ce pyruvate peut réentrer dans la mitochondrie et être converti en acetylCoA (Figure 17, voie 1). La deuxième voie implique la décarboxylation de l' $\alpha$ KG via IDH1 dans le cytosol ou IDH2 dans la mitochondrie pour former de l'isocitrate (Figure 17, voie 2). Cette réaction permet à l' $\alpha$ KG de remonter le TCA dans le sens inverse et d'aboutir à la génération de citrate et ainsi des lipides (Fendt et al., 2013; Metallo et al., 2012). Cette deuxième voie est d'autant plus importante dans les cellules en hypoxie, puisque la conversion du pyruvate en acetylCoA par la pyruvate dehydrogenase (PDH) est inhibée, et dans les cellules présentant des mitochondries défectueuses telles des mutations de la succinate dehydrogenase (SDH) ou de la fumarate hydratase (FH) retrouvées respectivement dans les paragangliomes et certains cancers du reins (Mullen et al., 2012; Wise et al., 2011).

### **3.2.3. Donneur d'azote pour la synthèse des nucléotides et acides aminés**

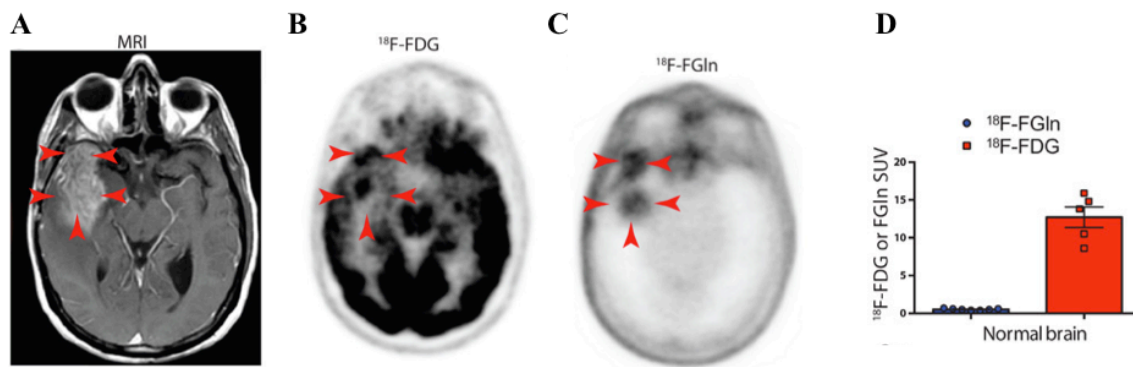
En plus de son rôle dans le maintien du TCA, la glutamine joue un rôle dans la biosynthèse des acides aminés non essentiels et des nucléotides. La glutamine lors de sa conversion en glutamate donne son groupement amide pour la synthèse des purines et pyrimidines. Le glutamate est également le donneur de groupements amines, lors de sa

transamination en  $\alpha$ KG, pour la synthèse des acides aminés non essentiels nécessaires à la synthèse des macromolécules. Les  $\alpha$ -cétoacides utilisés pour la génération de ces acides aminés sont le pyruvate, le 3-phosphoglycerate, l'OAA et le glutamate gamma-semialdehyde, utilisés pour former respectivement, l'alanine, la sérine, l'aspartate et l'ornithine.

#### **3.2.4. Régulateur de l'homéostasie redox**

Si l'activation du TCA et de la respiration mitochondriale par le métabolisme de la glutamine contribue à la production de ROS (Reactive oxygen species), celle-ci est contrebalancée par l'augmentation d'antioxydants. L'antioxydant majeur des cellules est le glutathion dont le précurseur est le glutamate. Le NADPH est requis pour réduire la forme oxydée du glutathion. La conversion du malate, issu de l'OAA formé à partir de l' $\alpha$ KG, en pyruvate permet la synthèse de NADPH. La conversion du malate en pyruvate est une voie prédominante dans les cellules cancéreuses puisqu'il a été montré par exemple, dans les cellules de glioblastome, que 60% de la glutamine était convertie en lactate et en alanine (DeBerardinis et al., 2007). À noter qu'outre la production de NADPH, cette voie produit du lactate qui, comme via la glycolyse aérobie, contribuera à la progression tumorale en tant que source d'énergie pour les cellules environnantes et à l'invasion.

Comme la dépendance au glucose, la dépendance des cellules cancéreuses à la glutamine pourrait être exploitée en imagerie médicale. Récemment il a été développé un analogue de la glutamine marqué au fluor 18, le 4- $^{18}$ F-(2S,4R)-fluoroglutamine ( $^{18}$ F-FGln) montrant une spécificité d'incorporation par les cellules tumorales de gliomes *in vivo* dans des xénogreffes chez la souris. Des premiers tests chez des patients atteints de gliomes montrent que le  $^{18}$ F-FGln présente une plus faible incorporation par le tissu sain que le FDG permettant ainsi une meilleure délimitation de la tumeur (Venneti et al., 2015) (Figure 18). Cependant, ce traceur est capté par le tissu osseux, limitant son utilisation à des tumeurs non osseuses et n'y métastasent pas.



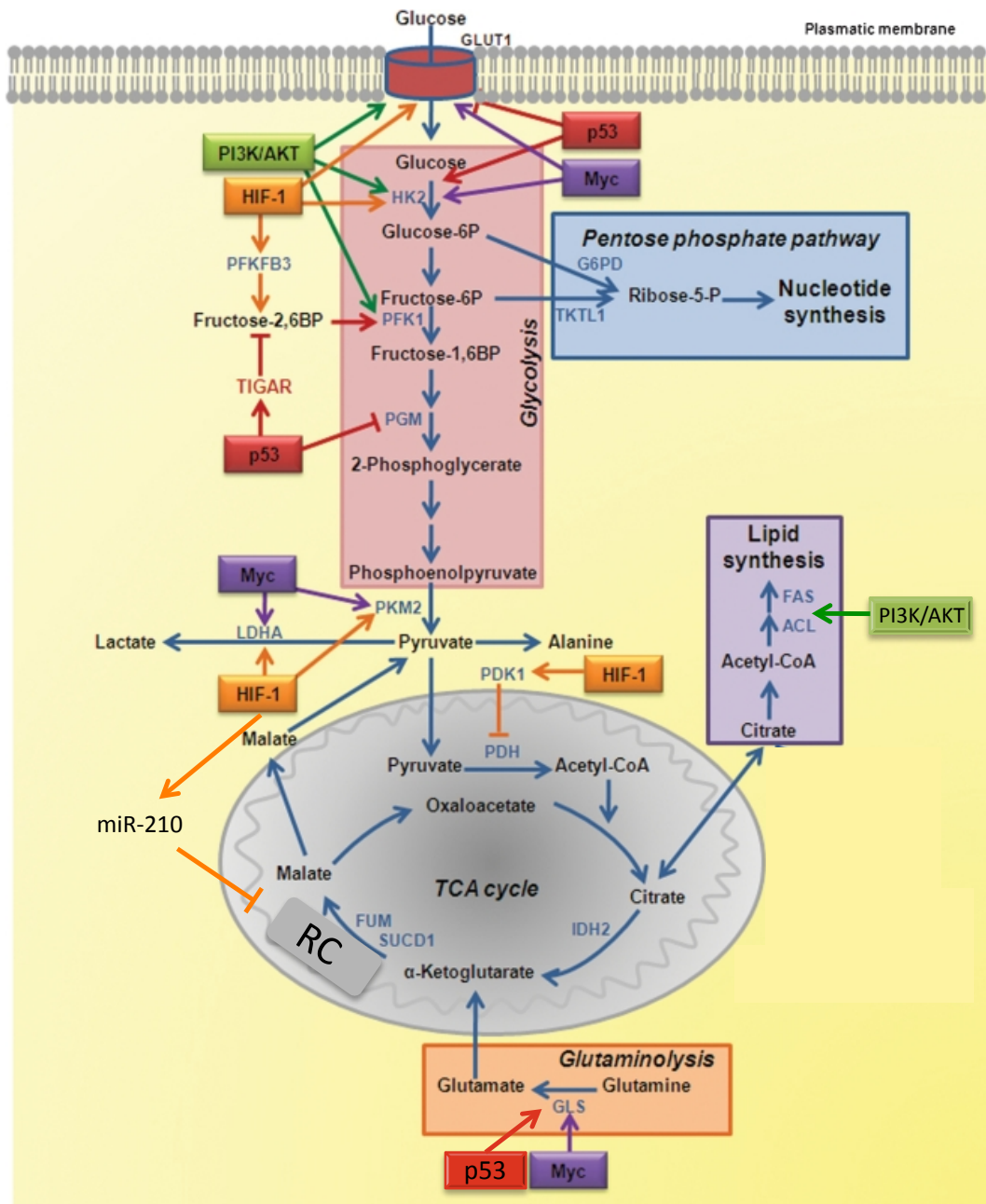
**Figure 18 : Utilisation d'un analogue marqué de la glutamine en imagerie médicale chez les patients atteints de GBM.**

La tumeur est délimitée par les flèches rouges. IRM de contraste mettant en évidence la tumeur d'un patient atteint de GBM (A). PET-scan montrant l'incorporation du  $^{18}\text{F}$ -FDG par la tumeur cérébrale mais également par le tissu sain (B). PET-scan utilisant le  $^{18}\text{F}$ -FGln montrant une incorporation spécifique par la tumeur (C). Comparaison de l'incorporation non spécifique du  $^{18}\text{F}$ -FDG (en bleu) et du  $^{18}\text{F}$ -FGln (en rouge) par le tissu cérébral sain. (Venneti et al., 2015)

Si les cellules sont capables d'alterner leurs sources de carbones ou de compenser le manque d'un nutriment par l'utilisation d'un autre, l'utilisation du glucose ou de la glutamine par les cellules cancéreuses n'est pas exclusive mais est au contraire finement coordonnée notamment par les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur. Un exemple parlant est la capacité de Myc à induire des gènes permettant l'augmentation de la glycolyse et de la glutaminolyse. De plus, il a par exemple été montré que la consommation de glutamine était associée à une activation de la glycolyse. Kaadige *et al.* ont démontré que la glutamine via la production d' $\alpha\text{KG}$  et le maintien du TCA induit le recrutement d'une HDAC inhibant l'expression de MandoA, répresseur transcriptionnel de TXNIP (thioredoxin interacting protein) aboutissant à l'activation de la glycolyse (Kaadige et al., 2009).

### 3.3. Contrôle des voies métaboliques

Les transporteurs et les enzymes impliqués dans le métabolisme du glucose et de la glutamine sont sous le contrôle d'oncogènes, de gènes suppresseurs de tumeur ainsi que de protéines clés des voies de prolifération et de survie (Figure 19).



**Figure 19 : Régulation des voies métaboliques par les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules cancéreuses.**

Les principales enzymes de la glycolyse, du TCA, de la glutaminolyse et des voies de biosynthèses sont représentées ainsi que les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs. (Adapté de Marie and Shinjo 2011)

### 3.3.1.1. PI3K/AKT

Les cellules cancéreuses présentent très fréquemment une activation constitutive d'Akt due à des mutations activatrices de la PI3K ou à la perte d'expression de PTEN. Il a été montré qu'Akt stimule l'expression de nombreuses enzymes de la glycolyse aérobie et que les cellules exprimant Akt sont dépendantes de la glycolyse pour maintenir les voies de

biosynthèse et ainsi leur survie et leur prolifération (Elstrom et al., 2004). Par exemple, Akt induit l'augmentation d'expression du transporteur au glucose GLUT1 et active la PFK. De plus, la surexpression d'Akt promeut l'association des HK à la mitochondrie diminuant ainsi l'apoptose induite par une privation en glucose (Gottlob et al., 2001). La perte de *PTEN*, levant l'inhibition d'Akt, stimule la glycolyse et l'induction de son expression peut induire le shift de la glycolyse vers l'OXPPOS (Blouin et al., 2010; Garcia-Cao et al., 2012). Enfin, Akt active la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin 1) impliquée dans de nombreuses voies métaboliques telles que la synthèse de lipides via l'activation du facteur de transcription SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) qui permet la transcription de plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse de lipides tels que l'ATP-citrate lyase (ACL) et la fatty acid synthase (FAS) (Düvel et al., 2010). De plus, mTOR peut supprimer l'expression de miR-143 et ainsi permettre l'augmentation de l'expression de HKII (Fang et al., 2012). mTOR peut être inhibé en condition de stress énergétique ou d'hypoxie par l'AMPK, protéine senseur de l'ATP. Cependant les cellules cancéreuses présentent des altérations de la voie LKB1-AMPK leur permettant de s'adapter au stress métabolique.

#### **3.3.1.2. c-Myc**

c-Myc régule la transcription de multiples gènes et microRNAs impliqués dans la prolifération cellulaire mais également dans le métabolisme. En effet, c-Myc permet la transactivation de gènes codant pour des protéines impliquées dans la glycolyse telles que GLUT, HKII, PFK, GAPDH, la phosphoglycerate kinase, l'énolase ainsi que la LDH (Osthus et al., 2000; Shim et al., 1997). L'oncogène Myc est également impliqué dans le métabolisme de la glutamine. En effet, il a été montré une dépendance à la glutamine des cellules surexprimant Myc (Wise et al., 2008). Celui-ci peut induire l'expression du transporteur de la glutamine SLC1A5 et de la GLS (Ren et al., 2015; Wise et al., 2008). De plus, c-Myc peut réguler l'expression de la GLS de manière post-transcriptionnelle via la répression de miR-23a et miR-23b permettant l'expression de leur cible la GLS (Gao et al., 2009).

#### **3.3.1.3. p53**

La protéine p53 est un facteur de transcription régulant de nombreuses fonctions cellulaires comme le cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence et la réparation de l'ADN. Le gène codant pour p53 est très fréquemment muté dans les cancers. De part son rôle dans le contrôle du cycle cellulaire, p53 joue un rôle très important dans la réponse au stress

métabolique. En effet, les cellules mutées pour p53 et privées en glucose ne peuvent pas subir d'arrêt du cycle cellulaire et survivent au stress métabolique. Il a été montré que p53 inhibe la glycolyse en réprimant l'expression des transporteurs au glucose et favorise l'OXPPOS (Schwartzberg-Bar-Yoseph et al., 2004). De plus, p53 induit l'expression de TIGAR (TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator), enzyme diminuant l'activité de PFK1. L'inhibition de la PFK conduit à l'accumulation de F6P favorisant la redirection du flux glycolytique vers la voie des pentoses phosphates (Bensaad et al., 2006). p53 inhibe également la glycolyse via l'activation de PTEN ou bien encore via l'induction de miR-34a, répresseur de HK et de la G-6Phosphate isomérase (Kim et al., 2013). Récemment, il a été mis en évidence l'implication de p53 dans l'activation de la glutaminolyse via l'induction de l'expression de la GLS (Hu et al., 2010).

#### **3.3.1.4. HIF**

Le facteur de transcription HIF-1, induit par l'hypoxie, contrôle l'expression des transporteurs au glucose et de nombreuses enzymes de la glycolyse comme HKII, PKM2 et la LDH. De plus, HIF active la transcription du gène codant pour la pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), protéine inhibant la pyruvate dehydrogenase (PDH) et donc la conversion du pyruvate en acetylCoA (McFate et al., 2008). Cette inhibition de la PDH inhibe l'OXPPOS et entraîne le flux de la glycolyse vers la production de lactate. HIF-1 peut également activer la transcription de miR-210 connu pour bloquer l'expression ou l'activité de certaines enzymes du TCA et des complexes de la chaîne respiratoire telle que la SDH (Chen et al., 2010b; Puisségur et al., 2011).

### **3.4. Métabolisme des CSCs**

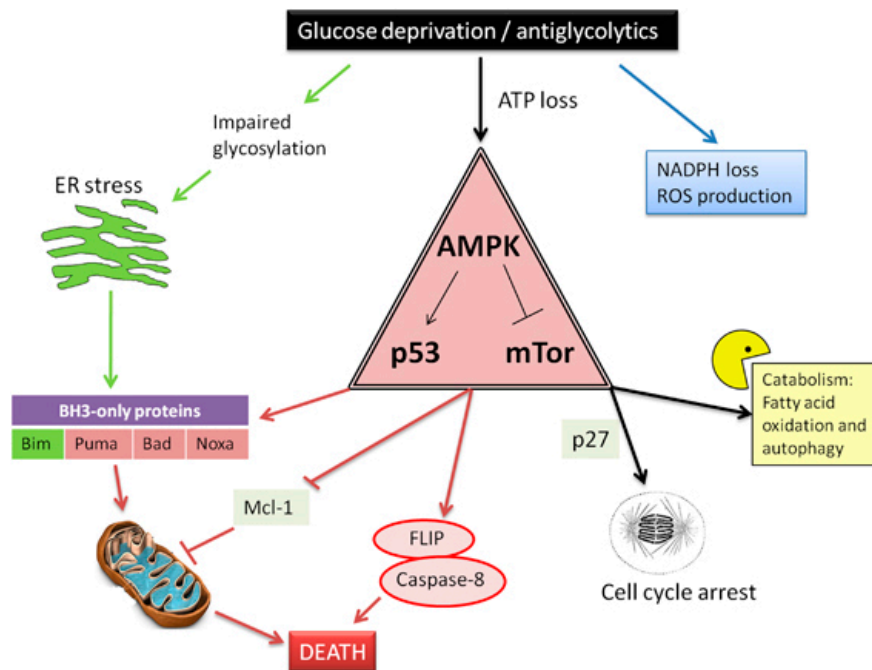
Les cellules souches normales présentent un métabolisme plus glycolytique que leurs progéniteurs plus différenciés. Cependant, de part leur difficulté d'isolement, peu d'études ont été menées sur le métabolisme des CSCs. Toutefois, étant donné leur similarité aussi bien au niveau de leur phénotype que de leur environnement de résidence dans des niches hypoxiques, les CSCs présenteraient un métabolisme similaire aux cellules souches normales. En effet, le métabolisme est régulé par des gènes du maintien du phénotype souche tel que c-Myc et par les gènes induits par l'environnement hypoxique où résident les cellules souches tel que HIF.

Il a été montré que le métabolisme des cellules souches normales repose sur la glycolyse aérobie avec une surexpression des enzymes de la glycolyse. En effet, il a été mis en évidence que les ESCs (embryonic stem cells) ou MSCs (mesenchymal stem cells) ont une forte production de lactate associée à une plus faible respiration mitochondriale que ces mêmes cellules différenciées (Chen et al., 2008; Cho et al., 2006; Prigione et al., 2010). Chung *et al.* ont également démontré que le switch de la glycolyse aérobie vers la phosphorylation oxydative mitochondriale est indispensable à la différenciation des ESCs en cardiomyocytes (Chung et al., 2007). À l'inverse, un switch de l'OXPPOS vers la glycolyse est observé pendant la conversion de cellules différenciées en iPSCs (induced Pluripotent Stem Cells) (Folmes et al., 2011).

Des études récentes d'analyse des profils protéomiques et métaboliques ou transcriptomiques de CSCs de cancer du sein et de ces mêmes cellules différenciées ont montré que l'induction de la différenciation des CSCs entraîne un shift de la glycolyse aérobie vers l'OXPPOS avec une augmentation de l'expression et de l'activité de la PDH (Ciavardelli et al., 2014; Feng et al., 2014). Dans le gliome, il a également été montré que le métabolisme des CSCs repose sur une forte glycolyse aérobie associée à un faible métabolisme oxydatif (Mao et al., 2013; Morfouace et al., 2012). Cependant, d'autres études mettent en évidence des différences dans les profils métaboliques des CSCs dans les gliomes selon leur degré de différenciation (souche ou progéniteur) et selon le sous-type de la tumeur (Mao et al., 2013; Vlashi et al., 2011). Ainsi Mao *et al.* montrent par exemple que le sous type mésenchymal serait plus glycolytique que le sous type proneural (Mao et al., 2013).

### **3.5. Modulation du métabolisme et sensibilité à la mort cellulaire**

Les cellules subissant un stress énergétique arrêtent leur prolifération et la synthèse de protéines via l'activation de l'AMPK et de p53 et l'inactivation de mTOR (Figure 20).



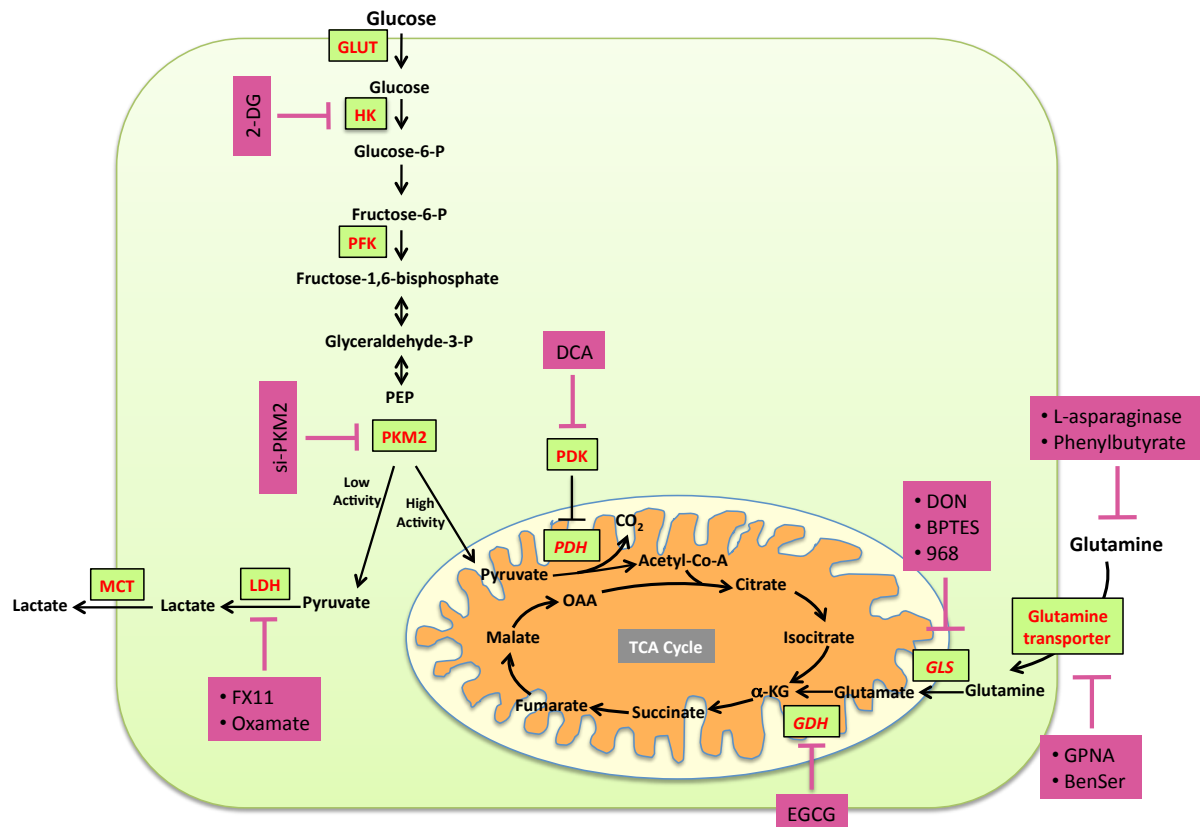
**Figure 20 : Réponses cellulaires au stress énergétique.**

La déplétion en glucose ou l'inhibition de la glycolyse par traitement pharmacologique induit une diminution d'ATP, un altération de la glycosylation des protéines et un stress oxydatif. La déplétion en ATP active l'AMPK inactivant mTOR et activant p53. L'activation de l'AMPK aboutit à l'arrêt du cycle cellulaire ou à l'autophagie. Le stress du réticulum endoplasmique et p53 induisent l'expression des protéines proapoptotiques et la mort cellulaire. (El Mjiyad et al., 2011)

Cependant, les cellules peuvent mettre en place des mécanismes de survie via l'activation de ces mêmes voies. En effet, un des principaux mécanismes de survie au stress énergétique est l'autophagie qui est activée par l'inhibition de mTOR. De plus, les cellules cancéreuses sont capables de compenser l'inhibition d'une voie énergétique par l'augmentation de l'utilisation d'une autre source d'énergie. Ainsi des cellules privées de glucose pourront activer la glutaminolyse via p53 ou bien encore la  $\beta$ -oxydation des lipides via l'AMPK pour alimenter leurs mitochondries. Toutefois, toutes les cellules ne sont pas capables de plasticité métabolique notamment à cause des mutations inactivant ces voies.

De nombreuses études ont démontré que la déplétion en glucose ou en glutamine induit ou sensibilise les cellules cancéreuses à la mort. Cibler le métabolisme cellulaire par des inhibiteurs pharmacologiques semble donc une bonne approche pour induire la mort des cellules tumorales ou pour potentialiser les effets des traitements existants en luttant contre les mécanismes de résistance mis en place par ces cellules (Figure 21). De nombreuses études suggèrent que la sensibilité à la mort des cellules cancéreuses et notamment des CSCs passe par leur différenciation associée à une augmentation de leur métabolisme mitochondrial.





**Figure 21 : Ciblage du métabolisme des cellules cancéreuses.**

Exemple d'inhibiteurs de différents transporteurs et enzymes impliqués dans les voies de la glycolyse et de la glutaminolyse. (Adapté de (Pecqueur et al., 2013))

### 3.5.1. Ciblage du métabolisme du glucose

#### 3.5.1.1. 2-Deoxyglucose

Le 2-Deoxyglucose (2-DG) est un analogue non-métabolisable du glucose inhibant la première réaction de la glycolyse. Il rentre en compétition avec le glucose pour son import intracellulaire par les GLUT puis, après sa phosphorylation par les HK, il ne peut plus être métabolisé via la glycolyse et s'accumule dans la cellule. Il a également été démontré que le 2-DG est capable d'inhiber la glucose phosphoisomerase et d'interférer avec la glycosylation des protéines (Kurtoglu et al., 2007; Wick et al., 1957). Le 2-DG induit une diminution de l'ATP entraînant une diminution de la prolifération, un arrêt du cycle cellulaire voire la mort cellulaire *in vitro* avec un effet plus important en condition d'hypoxie (Maher et al., 2004). *In vivo*, il a été montré que le 2-DG augmente l'efficacité de différents agents chimiothérapeutiques dans différents types de xénogreffes chez la souris (Maschek et al., 2004). Ces résultats ont mené cette molécule en phase d'essai clinique en combinaison avec des traitements radio- ou chimiothérapeutiques dans plusieurs types de cancer dont le gliome

pour lequel il a été démontré une augmentation de l'efficacité de la radiothérapie (Raez et al., 2013; Singh et al., 2005).

#### **3.5.1.2. Dichloroacétate**

Le dichloroacétate (DCA) est une petite molécule inhibant la PDK, enzyme clef déterminant l'entrée ou non du pyruvate dans la mitochondrie puisqu'elle est capable d'inhiber la PDH. Le DCA induit donc un shift de la glycolyse aérobie vers l'OXPPOS. Cette molécule a été initialement utilisée comme traitement de l'acidose lactique (Stacpoole et al., 1988). Cependant des études récentes mettent en évidence son rôle dans l'induction de la mort des cellules cancéreuses. En effet, cette molécule en forçant l'OXPPOS induit une repolarisation de la membrane mitochondriale et ainsi une diminution du seuil de déclenchement de l'apoptose (Bonnet et al., 2007). De plus, notre laboratoire a montré que le DCA pouvait sensibiliser les CSCs de gliome à l'étoposide d'une part via l'induction de leur différenciation par la séquestration d'Oct4 par PKM2 dans le cytoplasme et d'autre part via l'augmentation de l'expression de Bax (Morfouace et al., 2014). Des études précliniques du DCA ont montré une stabilisation ou une régression de la tumeur chez des patients atteints de GBM récurrents et il est très récemment entré en phase I d'essai clinique (Dunbar et al., 2014; Michelakis et al., 2010).

#### **3.5.1.3. Inhibiteur de la PKM2**

La PKM2 est l'isoforme de la pyruvate kinase principalement exprimée par les cellules cancéreuses et joue un rôle important dans la croissance tumorale (Christofk et al., 2008). De nombreuses études montrent que l'inhibition de l'expression de PKM2 par shRNA ou par siRNA induit l'apoptose ou sensibilise à la mort induite par des agents radio- ou chimiothérapeutiques dans différents types de tumeurs *in vitro* et *in vivo* (Goldberg and Sharp, 2012; Kim et al., 2015; Meng et al., 2015). De plus, *in vivo* l'injection de si-PKM2 induit la régression de différents types de tumeurs établies dans des modèles de xénogreffes chez la souris (Goldberg and Sharp, 2012). Des petites molécules inhibitrices de la PKM2 ont été identifiées et leur efficacité *in vitro* et *in vivo* restent à être établie (Vander Heiden et al., 2010).

#### **3.5.1.4. FX11 et Oxamate**

La LDH est l'enzyme catalysant la dernière étape de la glycolyse anaérobie et est surexprimée dans de nombreux cancers. L'inhibition de son expression ou l'inhibition de son activité par la molécule FX11 ou par l'oxamate diminue la prolifération et est capable d'induire ou de sensibiliser à la mort cellulaire dans différents types de tumeur (Fantin et al., 2006; Le et al., 2010; Xian et al., 2015; Zhou et al., 2010). De plus *in vivo*, l'inhibition de l'expression de la LDH inhibe la progression tumorale et les métastases (Fantin et al., 2006; Le et al., 2010; Sheng et al., 2012). Cet effet peut être dû à la production de ROS induite par l'augmentation de l'OXPPOS ou par la diminution de la production de lactate et donc de son utilisation comme source d'énergie par les cellules tumorales et de l'acidification du microenvironnement.

### **3.5.2. Ciblage du métabolisme de la glutamine**

#### **3.5.2.1. GPNA et Benzylsérine**

Le GPNA (1-8-glutamyl-p-nitroanilide) et la Benzylsérine (BenSer) sont deux inhibiteurs compétitifs du transporteur à la glutamine SLC1A5. Ces deux molécules entraînent la diminution de la prolifération des cellules issues de mélanome, de cancer de la prostate ou bien encore des poumons (Hassanein et al., 2013; Wang et al., 2014, 2015). *In vivo*, l'inhibition de l'expression d'ASCT2 par shRNA diminue la croissance et le développement de métastases de tumeurs de la prostate (Wang et al., 2015).

#### **3.5.2.2. L-asparaginase**

La L-asparaginase, hydrolysant l'asparagine en acide aspartique et ammonium, est utilisée dans le traitement des leucémies lymphoblastiques aiguës pédiatriques (Abshire et al., 2000; Grigoryan et al., 2004). Elle permet d'induire l'apoptose des lymphoblastes puisque ceux-ci sont incapables de synthétiser efficacement l'asparagine. Cependant il a été montré qu'en plus d'inhiber la synthèse *de novo* de l'asparagine, elle induit une déplétion plasmatique en glutamine chez les patients qui serait responsable de son efficacité thérapeutique (Willems et al., 2013).

### **3.5.2.3. Phenylbutyrate**

A l'instar de la L-asparaginase, le phenylbutyrate a montré une diminution des taux plasmatiques de glutamine (Darmaun et al., 1998). Le phenylbutyrate est métabolisé en phenylacetate qui se conjugue à la glutamine pour former la phenylacetylglutamine et être excrété de la cellule. Des données cliniques montrent un effet de cette drogue chez certains patients atteints de cancer de la prostate et de GBM (Thibault et al., 1994). Cependant, la part due à la déplétion en glutamine dans l'effet thérapeutique observé est discutée puisque cette drogue est également connue pour inhiber les histones déacetylases (Bolden et al., 2006).

### **3.5.2.4. DON**

L'inhibition de la glutaminase, première enzyme impliquée dans le métabolisme de la glutamine, par la DON (6-diazo-5-oxy-norleucine) diminue la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* (Shelton et al., 2010). Cependant cette molécule n'est pas spécifique de la GLS et a montré d'importants effets secondaires lors de son étude en phase d'essai clinique.

### **3.5.2.5. BPTES et composé 968**

Récemment, deux inhibiteurs sélectifs de la glutaminase ont été développés, le BPTES (Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide) et le composé 968 (benzophenanthridinone 968). Il a été montré que l'utilisation du BPTES ralentit la prolifération des cellules porteuses de la mutation *IDH* dans le glioblastome et dans les leucémies myéloïdes chroniques (Emadi et al., 2014; Seltzer et al., 2010). L'inhibition de la GLS par le composé 968 inhibe la transformation oncogénique dans le cancer du sein (Wang et al., 2010b). Dans ce même modèle, le composé 968 peut induire l'apoptose et sensibiliser aux agents chimiothérapeutiques les cellules de cancer du sein notamment via l'altération de certaines histones (Simpson et al., 2012).

### **3.5.2.6. EGCG**

La glutamine dehydrogenase (GDH) permet la conversion du glutamate en  $\alpha$ KG. Récemment il a été montré que l'EGCG, polyphénol le plus abondant du thé vert, peut inhiber l'activité de cette enzyme de manière allostérique en se fixant sur son site de liaison GTP (Li et al., 2006). Cependant ce composé connu pour ses effets antioxydants, présente de nombreux autres effets biologiques. L'EGCG possède des effets antiprolifératifs via la

modulation de multiples voies de signalisation comme l'inhibition des voies Erk, Akt, ou Wnt ou bien encore en inhibant l'activation des récepteurs à l'EGF (Kim et al., 2007; Masuda et al., 2001; Milligan et al., 2009; Oh et al., 2014). L'EGCG peut également induire l'apoptose des cellules cancéreuses en modifiant la balance Bax/Bcl-2 par exemple en stabilisant p53 ou en inhibant la voie NFκB (Hastak et al., 2003). L'EGCG a également montré des effets anti-invasifs et anti-métastatiques via l'inhibition par exemple de l'expression de métalloprotéases (Thangapazham et al., 2007). De plus, l'EGCG inhibe l'activité d'enzymes impliquées dans les régulations épigénétiques comme certaines DNMT et HDAC, et modifie l'expression de miRNA permettant ainsi la modulation de l'expression génique (Shankar et al., 2013).

L'inhibition des voies énergétiques du glucose et de la glutamine par des inhibiteurs pharmacologiques a montré une efficacité *in vitro* voire *in vivo* dans différents types de tumeurs et semble être une stratégie très prometteuse en clinique. Il existe de nombreux inhibiteurs de la glycolyse et de la glutaminolyse et la liste présentée ici n'est pas exhaustive. Des inhibiteurs d'autres voies métaboliques sont également développés comme des inhibiteurs des voies de biosynthèse des lipides. De plus, certaines cellules tumorales ont un métabolisme reposant sur l'OXPPOS et des agents ciblant la chaîne respiratoire sont également étudiés comme le VLX600 inhibant certains complexes de l'ETC ou la tigecycline inhibant les ribosomes mitochondriaux (Skrtić et al., 2011; Zhang et al., 2014). Il est également possible de combiner des inhibiteurs de différentes voies métaboliques pour lutter contre les mécanismes de compensation métaboliques qui peuvent être mis en place et ainsi potentialiser l'effet des drogues.

# **OBJECTIFS**

## II. Objectifs de la thèse

Les glioblastomes sont des tumeurs très agressives avec une médiane de survie des patients très faible. Les traitements actuels n'ont que très peu évolué ces dernières années et restent inefficaces. Les travaux de ce projet de thèse visant à mieux comprendre les mécanismes de résistance à la mort et à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ont émergés suite à différents constats :

- Des mutations de différents gènes codant pour des enzymes du métabolisme sont retrouvées dans différents cancers et jouent un rôle dans la progression tumorale. Notamment, des mutations de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) ont été récemment mises en évidence chez les patients atteints de GBM et seraient associées à un bon pronostic vital en clinique.

- Les cellules cancéreuses présentent un métabolisme particulier les différenciant des cellules normales et contribuant à leur prolifération rapide. En plus de l'augmentation de la glycolyse aérobie, la dépendance à la glutamine est une modification caractéristique du métabolisme des cellules cancéreuses offrant de nouvelles cibles thérapeutiques.

- L'hétérogénéité inter-tumorale des GBM d'un point de vue moléculaire, associée à la présence et au rôle des cellules souches cancéreuses dans la résistance des tumeurs aux traitements ajoute une difficulté dans la prise en charge thérapeutique des patients.

Ainsi ce projet de thèse s'est orienté vers trois axes d'études :

- Une première partie de ces travaux de thèse s'est intéressée à l'implication de la mutation d'IDH et de son oncométabolite, le D-2Hydroxyglutarate, sur la prolifération et la sensibilité à la mort cellulaire de lignées de GBM. Ces travaux ont été publiés dans *Cell Death and Disease* en 2015. (Article I)

- Une deuxième partie du projet de thèse s'est, dans un premier temps, consacrée à la caractérisation du métabolisme de différentes lignées cellulaires de GBM. L'impact de l'inhibition de la glutaminolyse par l'EGCG, inhibiteur de la GDH, sur la prolifération et la mort cellulaire de ces lignées ainsi que sur les voies de signalisations associées a ensuite été évaluée. (Article II, en cours d'écriture)

- Une troisième partie du projet s'est focalisée sur la caractérisation de plusieurs primocultures issues de patients atteints de GBM. Ces primocultures sont cultivées dans des conditions permettant le maintien de l'hétérogénéité tumorale d'un point de vue cellulaire et moléculaire. L'objectif était de caractériser ces primocultures de part leur niveau d'expression des marqueurs souches et de différenciation, de sensibilité à la mort et de métabolisme afin de mettre en évidence des différences pouvant être ciblées d'un point de vue thérapeutique. (Article III, en préparation)



# RESULTATS

### III. Résultats

#### 1. Impact de la mutation IDH et de son oncométabolite le D-2-hydroxyglutarate (D-2HG) sur la sensibilité à la mort cellulaire

Des altérations du métabolisme impliquées dans la tumorigénicité ont été mises en évidence avec la découverte de mutations de gènes codant pour différentes enzymes du métabolisme associées à des cancers. Parmi elles, des mutations de l'isocitrate dehydrogenase (IDH), ont été mises en évidence dans plus de 75% des gliomes de grade II et III et des GBM (Dang et al., 2010). Cette mutation a également été retrouvée dans 20% des AML puis dans le cancer de la thyroïde et les chondrosarcomes (Amary et al., 2011; Dang et al., 2010; Murugan et al., 2010). Sur les trois isoformes d'IDH, des mutations ont été retrouvées sur les deux ayant pour coenzyme le NADPH (Parsons et al., 2008). L'enzyme IDH catalyse la carboxylation oxydative de l'isocitrate en  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG) et sa mutation lui confère une nouvelle activité enzymatique produisant du D-2-hydroxyglutarate (D-2HG) via la réduction NADPH-dépendante de l' $\alpha$ KG (Dang et al., 2009). La part des effets dus à l'accumulation de D-2HG, à la diminution du pool d' $\alpha$ KG ou à la diminution du pool de NADPH, sur la sensibilité à la mort cellulaire est actuellement discutée. En effet, si l' $\alpha$ KG est nécessaire au maintien du TCA, il joue également un rôle dans les régulations épigénétiques en tant que substrat par exemple des prolylhydroxylases et des enzymes impliquées dans la méthylation des histones et de l'ADN. Le D-2HG, de part sa similarité structurale avec l' $\alpha$ KG, peut inhiber de nombreuses dioxygénases dépendantes de l' $\alpha$ KG. Enfin, le NADPH est impliqué dans les voies de biosynthèse et de régulation du niveau de ROS.

Les mutations d'*IDH* seraient associées à un meilleur pronostic des patients atteints de gliome de grade III ou de GBM. Cependant, cette mutation est retrouvée dans les gliomes de grade II et III sans autre altération génétique classiquement retrouvée de manière précoce au cours de la progression tumorale, suggérant que les mutations d'*IDH* apparaissent très tôt dans la gliomagenèse et joueraient un rôle dans la tumorigénicité. L'implication de la mutation dans la tumorigénèse et sa corrélation à un bon pronostic sont des points encore mal compris. De plus, plusieurs études *in vitro* étudiant l'impact de la mutation *IDH* sur la

prolifération et la sensibilité à la mort cellulaire ont montré des résultats opposés. Nous avons voulu déterminer quels étaient le rôle et l'implication respectifs de la mutation *IDH* et du D-2HG sur la sensibilité à la mort des cellules de GBM.

**Principaux résultats :**

- La mutation *IDH* confère un avantage prolifératif aux cellules de GBM qui peut être mimé par le D-2HG
- La mutation *IDH* augmente la résistance à la mort cellulaire induite par l'étoposide
- Le D-2HG n'est pas impliqué dans la résistance à la mort cellulaire des cellules mutées pour *IDH*
- La résistance à la mort des cellules mutées pour *IDH* est due à une diminution du pool mitochondrial de NADH

# D-2-Hydroxyglutarate does not mimic all the IDH mutation effects, in particular the reduced etoposide-triggered apoptosis mediated by an alteration in mitochondrial NADH

K Oizel<sup>1,2</sup>, C Gratas<sup>1,2,3</sup>, A Nadaradjane<sup>1,2</sup>, L Oliver<sup>1,2,3</sup>, FM Vallette<sup>1,2,4</sup> and C Pecqueur<sup>\*,1,2</sup>

Somatic mutations in isocitrate dehydrogenase (IDH)-1 and -2 have recently been described in glioma. This mutation leads to a neomorphic enzymatic activity as the conversion of isocitrate to alpha ketoglutarate ( $\alpha$ KG) is replaced by the conversion of  $\alpha$ KG to D-2-hydroxyglutarate (D-2HG) with NADPH oxidation. It has been suggested that this oncometabolite D-2HG via inhibition of  $\alpha$ KG-dioxygenases is involved in multiple functions such as epigenetic modifications or hypoxia responses. The present study is aimed at deciphering how the mutant IDH can affect cancer pathogenesis, in particular with respect to its associated oncometabolite D-2HG. We show that the overexpression of mutant IDH in glioma cells or treatment with D-2HG triggered an increase in cell proliferation. However, although mutant IDH reduced cell sensitivity to the apoptotic inducer etoposide, D-2HG exhibited no effect on apoptosis. Instead, we found that the apoptotic effect was mediated through the mitochondrial NADH pool reduction and could be inhibited by oxamate. These data show that besides D-2HG production, mutant IDH affects other crucial metabolite pools. These observations lead to a better understanding of the biology of IDH mutations in gliomas and their response to therapy.

*Cell Death and Disease* (2015) 6, e1704; doi:10.1038/cddis.2015.13; published online 26 March 2015

Gliomas are the most common type of human brain tumors and can be classified based on clinical and pathological criteria in four grades. The grade IV glioma, commonly known as glioblastoma multiforme (GBM), is the most invasive form and has a dismal prognosis with <5% patient survival at 5 years. These GBM can develop *de novo* (primary GBM) or through the progression from low-grade tumors (secondary GBM). Although these two types of GBM are histologically similar, primary and secondary GBM exhibit distinct genetic patterns. A recent integrated genome analysis of human GBM shows that 12% of these tumors have a mutation in the gene encoding isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) and to a lesser extent in IDH2 gene.<sup>1</sup> This mutation is present in >90% secondary GBMs, whereas it is present in <5% primary GBMs.<sup>2</sup> Mutations in IDH1 and IDH2 have also been identified in acute myeloid leukemia (AML)<sup>3</sup> and chondrosarcomas.<sup>4</sup> The occurrence of IDH mutations predicts a significantly longer survival for patients affected by GBM or grade III gliomas.<sup>1,2</sup> Whether this difference is driven by IDH mutations or reflects other fundamental biological differences between primary and secondary GBM is, as yet, unclear. For example, the prognostic significance of IDH mutations may be secondary to their prevalence among younger patients, as age is a well-known prognostic factor in gliomas.<sup>5</sup> In AML, the prognostic significance of IDH mutations is more ambiguous.

Several studies have reported that IDH mutations do not affect the prognosis in AML, whereas other studies have found that IDH mutations are associated with an increased or decreased risk of relapse when compared with IDH wild-type patients.<sup>6,7</sup>

The human genome has five IDH genes coding for three different IDH isoforms, the activities of which depend on either nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) for IDH3 or nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP<sup>+</sup>) for IDH1 and IDH2. Both IDH2 and IDH3 are located in the mitochondria where they participate in the TCA cycle, whereas IDH1 is mostly cytosolic.<sup>8</sup> To date, all reported mutations are located in the IDH1 and IDH2 genes and result in an amino-acid substitution at residues located in the enzymatic active site, respectively, R132 for IDH1 and R140 or R172 for IDH2. This mutation disrupts the normal enzymatic function of IDH, that is, the conversion of isocitrate to alpha ketoglutarate ( $\alpha$ KG) with the concomitant production of NADPH. Instead, mutant IDH displays a neomorphic activity converting  $\alpha$ KG into D-2-hydroxyglutarate (D-2HG), although reducing NADPH.<sup>9</sup> As a result, mutant IDH may alter the redox state of cells, modulate the activity of metabolic and epigenetic tumor suppressor enzymes that use  $\alpha$ KG as a co-substrate.<sup>10</sup> Loss of IDH function may also alter normal mitochondrial function and promote a metabolic switch in cancer cells to glycolysis.<sup>11,12</sup>

<sup>1</sup>CRCNA - INSERM UMR 892 - CNRS UMR 6299, Nantes F44007, France; <sup>2</sup>Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes F44007, France; <sup>3</sup>Centre Hospitalier-Universitaire (CHU) de Nantes, Nantes F44093, France and <sup>4</sup>Institut de Cancérologie de l'Ouest - René Gauducheau, St Herblain F44805, France

\*Corresponding author: C Pecqueur, CRCNA - INSERM UMR 892 - CNRS UMR 6299, 8 quai Moncoussu, Nantes F44007, France. Tel: +33 2 2808 0325; Fax: +33 2 2808 0204; E-mail: claire.pecqueur@univ-nantes.fr

**Abbreviations:**  $\alpha$ KG, alpha ketoglutarate; AAT, aspartate aminotransferase; D-2HG, D-2-hydroxyglutarate; ECAR, extracellular acidification rate; ETC, electron transport chain; ETO, etoposide; GBM, glioblastoma multiforme; Gln, glutamine; Glu, glutamate; IDH, isocitrate dehydrogenase; OCR, oxygen consumption rate

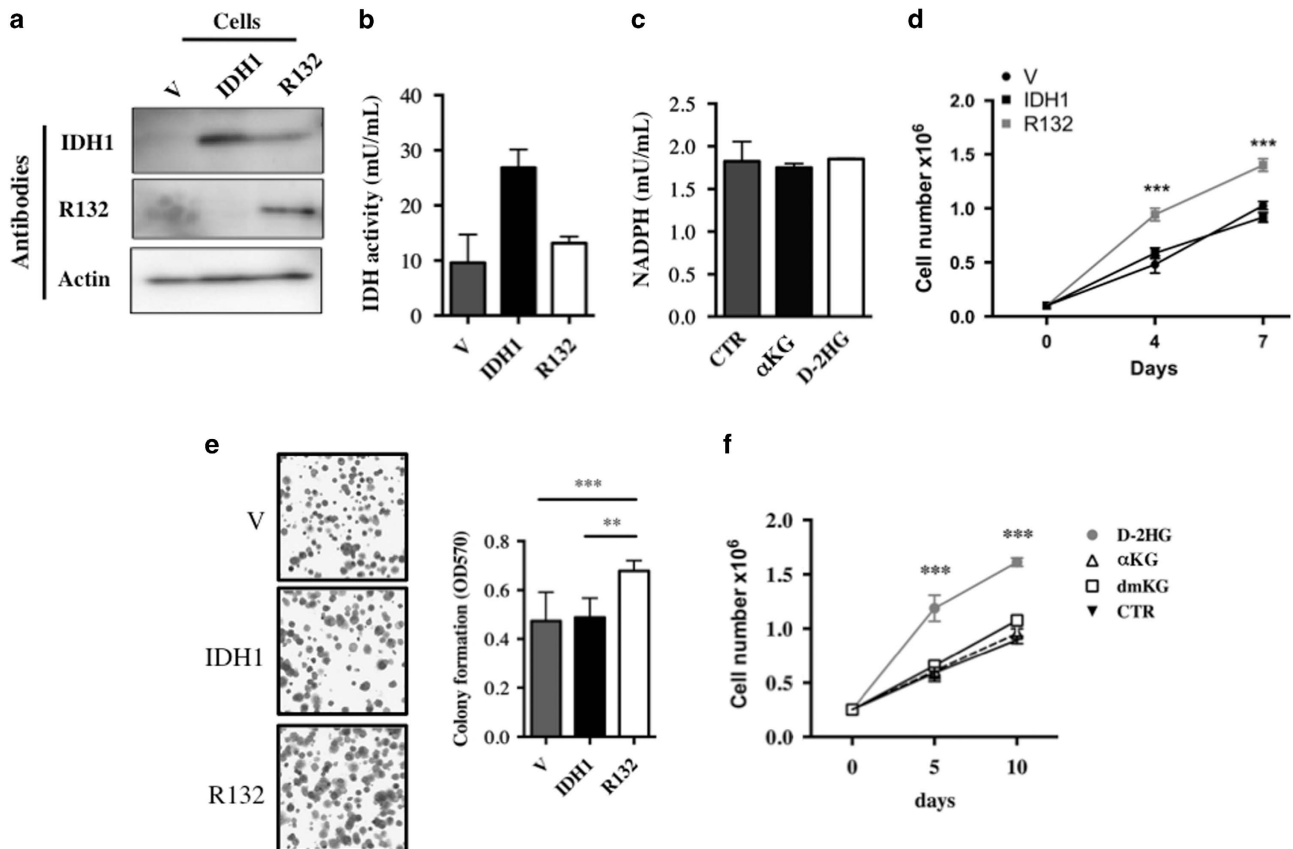
Received 16.9.14; revised 20.12.14; accepted 07.1.15; Edited by A Finazzi-Agro

Mutant IDH is widely believed to have the ability to transform cells by modulating  $\alpha$ KG-dependent enzymes. D-2HG and  $\alpha$ KG are structurally similar suggesting that D-2HG may act as a competitive inhibitor of  $\alpha$ KG-dioxygenases including prolyl hydroxylase involved in HIF-1 $\alpha$  stability, histone demethylases and the Ten-Eleven Translocation (TET) family of 5-methylcytosine hydroxylases involved in epigenetic modifications of DNA.<sup>13,14</sup> In fact, IDH mutations lead to numerous metabolic abnormalities besides D-2HG production. Deciphering the relative importance of either D-2HG production,  $\alpha$ KG or NADPH reduction in cancer pathogenesis remains to be determined. In this paper, we show that mutant IDH increases cell proliferation and reduces etoposide (ETO)-induced cell death through different metabolic pathways. Although cell proliferation changes are mediated through D-2HG, alteration in the mitochondrial NADH pool is involved in the response to apoptosis.

## Results

**Glioma cell lines overexpressing IDH1<sup>R132</sup> exhibit reduced NADP production and increased cell proliferation.** To date,

the lack of mutant IDH glioma cell lines has been an issue in the study of the pathogenic role of IDH mutations. To address this, we stably transfected a human glioma cell line, U251, with vectors encoding the wild-type or the mutant form of IDH1 (IDH1<sup>R132</sup>; Figure 1a). IDH1 was detected by western blot in cytoplasmic lysate. In order to determine whether IDH1<sup>R132</sup> overexpression was associated with the neomorphic enzymatic activity, the NADPH level was measured in these cells (Figure 1b). As expected, lysate from IDH1-overexpressing cells exhibited higher levels of IDH activity as compared with IDH1<sup>R132</sup>. Note that the level of NADPH detected in control cells was similar to the level observed in mutant IDH-expressing cells. Addition of either  $\alpha$ KG or D-2HG to the cell medium did not affect the total cellular NADPH level (Figure 1c). In order to study how these mutations can affect cancer pathogenesis, cell proliferation and cell death response to different stimuli were measured. An increased proliferation and an increased ability to form colonies when cells were plated at very low density were detected in cells overexpressing IDH1<sup>R132</sup> (Figures 1d and e). To determine whether D-2HG had a role in this increased proliferation, cells were cultured for 6 days in the presence of  $\alpha$ KG,



**Figure 1** (a) Expression of wild-type or mutant IDH1 isoforms in stable overexpressing cells was confirmed by immunoblotting using whole lysates (40  $\mu$ g). Actin was used as a loading control. (b) IDH activity of cells overexpressing wild-type or mutant IDH1 isoforms. Cells ( $1 \times 10^5$ ) were plated, lysed the next day and subsequently assayed for their IDH activity. (c) NADPH production in cells treated for 6 days with  $\alpha$ KG (3 mM) or D-2HG (3 mM) as in b. (d) Proliferation of wild-type and mutant IDH1-overexpressing cells. Cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells and counted 3 and 7 days later using trypan blue staining. (e) The ability of forming colonies of wild-type and mutant IDH1-overexpressing cells. Cells were plated at 500 cells per well then fixed and stained with violet crystal 1 week later. (f) Proliferation of cells treated with  $\alpha$ KG (3 mM), dimethyl- $\alpha$ KG (3 mM) and HG (3 mM). Cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells and counted 5 and 10 days later using trypan blue staining. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments performed in triplicate. V, empty vector expressing cells; IDH1, wild-type IDH1-expressing cells; R132, IDH1<sup>R132</sup>-expressing cells transfected. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$

a cell-permeant form of  $\alpha$ KG, dimethyl  $\alpha$ KG (dmKG) or D-2HG. As expected,  $\alpha$ KG and dmKG had no effect on cell proliferation, whereas, similar to the overexpression of IDH1<sup>R132</sup>, D-2HG increased significantly cell proliferation compared with the control or cells treated with the different forms of  $\alpha$ KG (Figure 1f).

**IDH1<sup>R132</sup> reduces ETO-induced apoptosis.** Cell death was measured at different time points after irradiation (5 Gy), ETO (50  $\mu$ g/ml), TRAIL (50 ng/ml), FasL (60 ng/ml) or cisplatin (15  $\mu$ g/ml) treatment in U251 cells. All treatments were associated with a significant death and activation of caspase-3 (Table 1). However, the optimal time point of cell death induction varied from 6 h with TRAIL to 24 h with ETO, Cisplatin, and FASL treatments, and to 72 h with irradiation. Next, sensitivity to cell death was analyzed in IDH1- and IDH1<sup>R132</sup>-overexpressing cells. For most treatments, overexpression of IDH1<sup>R132</sup> did not affect caspase-3 activity (Figure 2a). However, although addition of ETO caused a high caspase-3 activation in control and wild-type IDH1-overexpressing cells, activation of caspase-3 was significantly reduced in IDH1<sup>R132</sup>-overexpressing cells. These results were confirmed by FACs analysis, which showed that the percentage of propidium iodide-stained cells after ETO exposure was lower in IDH1<sup>R132</sup> cells compared with the control and IDH1 cells (Figure 2b). During apoptosis, the integrity of the mitochondrial outer membrane is compromised, a process called mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP). In order to determine whether IDH1 or IDH1<sup>R132</sup> expression was affecting the MOMP, we measured the mitochondrial membrane potential  $\Delta\Psi$ m in our cells using JC-1 staining.  $\Delta\Psi$ m was reduced in a time-dependent manner after ETO exposure as indicated by the decrease of the red/green ratio (Figure 2c). Of note, the median of healthy cells red fluorescence was significantly higher in IDH1<sup>R132</sup> cells compared with IDH1 cells (845  $\pm$  75

versus 655  $\pm$  56;  $n=6$ ;  $P<0.05$ ), suggesting a mitochondrial hyperpolarization of IDH1<sup>R132</sup> cells. Sensitivity to ETO was then tested in other glioma cell lines overexpressing either IDH1 or IDH1<sup>R132</sup>, LN18 and T98 (Figures 2d and e). In both cells lines, IDH1<sup>R132</sup> overexpression was associated with reduced ETO-induced cell apoptosis.

**Mutant IDH2 decreases sensitivity to ETO but D-2HG has no effect.** To determine whether mutant IDH2 triggered similar effects on cell death, U251 cells were transfected with vector, IDH2, IDH2<sup>R140</sup> and IDH2<sup>R172</sup>. Western blot analysis showed that IDH2 proteins were expressed in the mitochondria and not in the cytosol (Figure 3a). Similarly to IDH1<sup>R132</sup>, mutant IDH2-expressing cells exhibited decreased NADPH consumption corresponding to its neomorphic activity (Figure 3b). Interestingly, caspase-3 activation following ETO treatment was also significantly reduced (Figure 3c). Altogether, these results showed that all mutants IDH, independently of their respective subcellular localization, reduced ETO-induced cell death.

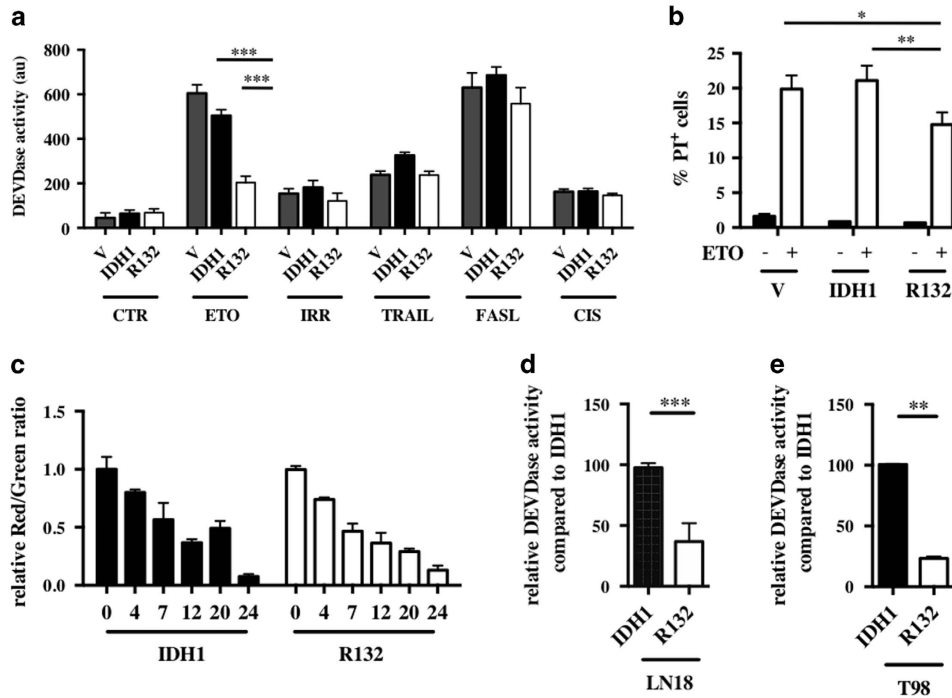
To determine whether D-2HG could be involved in this phenotype, U251 cells were treated with 3 mM or 10 mM of D-2HG for 6 days before ETO treatment. However, none of the pretreatments affected ETO-induced apoptosis (Figure 3d and data not shown). Thus, D-2HG does not fully recapitulate the mutant IDH phenotypes as exogenous D-2HG is able to increase cell proliferation but does not affect cell sensitivity to ETO.

**Reduced mitochondrial spare capacity with IDH1<sup>R132</sup> but not with D-2HG.** To better understand how IDH1<sup>R132</sup> affects apoptosis, several parameters were analyzed. IDH mutation can alter protein expression through epigenetic modifications, redox homeostasis and metabolism of glucose, glutamine (Gln) and fatty acids. As an aberrant methylation status of Bax and Bcl2 has been shown to be associated with

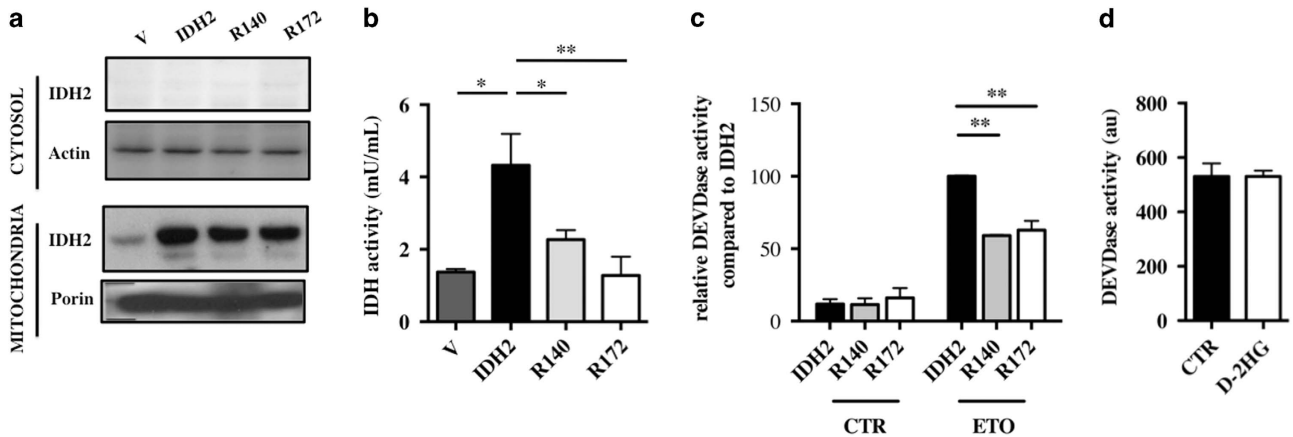
**Table 1** Cell death was monitored in U251 after irradiation (5 Gy), ETO (50  $\mu$ g/ml), TRAIL (50 ng/ml), FasL (60 ng/ml) or cisplatin (15  $\mu$ g/ml) treatment after 5, 24, 48 and 72 h by FACS analysis using propidium iodide incorporation and caspase-3 activation

	CTR	6 h	24 h	48 h	72 h
<b>Etoposide</b>					
% Dead cells	2.6 $\pm$ 0.8 ( $n=3$ )	NA	28 $\pm$ 2 ( $n=4$ )	28 $\pm$ 3 ( $n=4$ )	NA
DEVDase activity	3.3 $\pm$ 0.3 ( $n=3$ )	37 $\pm$ 11 ( $n=4$ )	204 $\pm$ 18 ( $n=4$ )	128 $\pm$ 11 ( $n=4$ )	NA
<b>Irradiation</b>					
% Dead cells	2.6 $\pm$ 0.8 ( $n=3$ )	NA	6 $\pm$ 2 ( $n=3$ )	8 $\pm$ 1 ( $n=3$ )	15 $\pm$ 1 ( $n=5$ )
DEVDase activity	3.3 $\pm$ 0.3 ( $n=3$ )	NA	65 $\pm$ 25 ( $n=3$ )	NA	143 $\pm$ 13 ( $n=5$ )
<b>TRAIL</b>					
% Dead cells	2.6 $\pm$ 0.8 ( $n=3$ )	22 $\pm$ 3 ( $n=4$ )	6.4 $\pm$ 1 ( $n=3$ )	NA	NA
DEVDase activity	3.3 $\pm$ 0.3 ( $n=3$ )	107 $\pm$ 3 ( $n=4$ )	7 $\pm$ 0.3 ( $n=3$ )	NA	NA
<b>FASL</b>					
% Dead cells	2.6 $\pm$ 0.8 ( $n=3$ )	10 $\pm$ 1 ( $n=3$ )	20 $\pm$ 3 ( $n=3$ )	NA	NA
DEVDase activity	3.3 $\pm$ 0.3 ( $n=3$ )	38 $\pm$ 8 ( $n=3$ )	115 $\pm$ 3 ( $n=3$ )	51 $\pm$ 13 ( $n=3$ )	NA
<b>Cisplatin</b>					
% Dead cells	2.6 $\pm$ 0.8 ( $n=3$ )	NA	16 $\pm$ 2 ( $n=3$ )	NA	NA
DEVDase activity	3.3 $\pm$ 0.3 ( $n=3$ )	NA	139 $\pm$ 18 ( $n=3$ )	NA	NA

Abbreviation: NA, not applicable  
Apoptosis was measured through caspase-3 activation



**Figure 2** (a) Caspase 3 activation was determined with DEVDase activity assay in stable transfected U251 cells expressing empty vector, wild-type and mutant IDH1 isoforms after induction of apoptosis. Cells were plated at  $5 \times 10^5$  cells and treated the next day with different inducers of cell apoptosis. Cellular extracts were prepared from untreated cells (CTR), 5 h after treatment with TRAIL (50 ng/ml), 24 h after ETO (50  $\mu$ g/ml), FASL (60ng/ml) or cisplatin (CIS) (15  $\mu$ g/ml) and 72 h after  $\gamma$ -irradiation (IRR; 5 Gy). (b) The number of dead cells 24 h after ETO (50  $\mu$ g/ml) treatment was determined by FACS. Cells were incubated 5 min with propidium iodide (1  $\mu$ g/ml) and analyzed by FACS. (c) The mitochondrial membrane potential was determined by FACS after ETO (50  $\mu$ g/ml) treatment at different time points. Cells were incubated 15 min with JC-1 probe and analyzed by FACS. (d and e) Caspase 3 activation after 24 h ETO (50  $\mu$ g/ml) exposure was determined with DEVDase activity assay, respectively, in wild-type and mutant IDH1-overexpressing LN18 and T98 cells. Results are expressed relative to wild-type IDH1-expressing cells. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments performed in triplicate. V, empty vector expressing cells; IDH1, wild-type IDH1-expressing cells; R132, IDH1<sup>R132</sup>-expressing cells transfected. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$

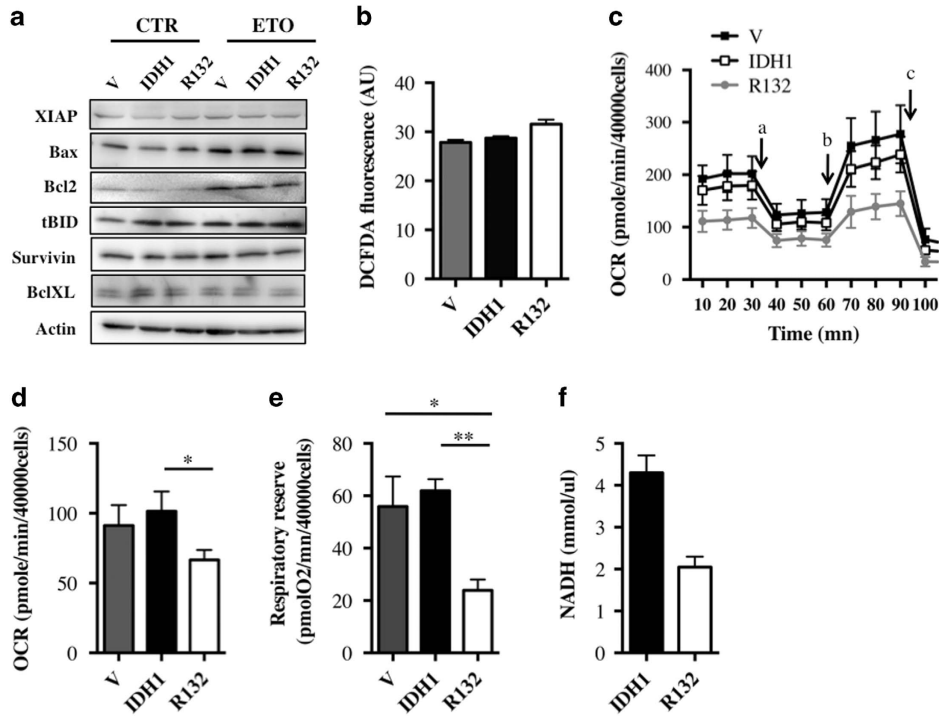


**Figure 3** (a) Expression of wild-type (IDH2) or mutant IDH2 (R140 and R172) isoforms in stable overexpressing U251 cells was confirmed by immunoblotting using whole lysates (40  $\mu$ g) or purified mitochondria. Actin and porin were used as a loading control, for whole lysates and mitochondria, respectively. (b) IDH activity in cells overexpressing wild-type or mutant IDH2 isoforms. Cells ( $1 \times 10^6$ ) were plated, lysed the next day and subsequently assayed for their ability to generate NADPH. (c) Caspase 3 activation was determined with DEVDase activity assay in stable U251 cells expressing wild-type and mutant IDH2 isoforms after 24 h ETO (50  $\mu$ g/ml) exposure. Results are expressed relative to wild-type IDH2-expressing cells. (d) Caspase 3 activation was determined with DEVDase activity assay after 24 h ETO (50  $\mu$ g/ml) exposure in U251 cells treated with D-2HG (3 mM) for 6 days. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments performed in triplicate. V, empty vector expressing cells; IDH2, wild-type IDH2-expressing cells; R140, IDH1<sup>R140</sup>-expressing cells transfected; R172, IDH1<sup>R172</sup>-expressing cells transfected. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$

apoptosis escape,<sup>15</sup> expression of these proteins, as well as BclXL, XIAP, truncated BID (tBID) and survivin, was analyzed by western blot (Figure 4a). However, neither IDH1<sup>R132</sup> nor wild-type IDH1 expression affected protein expression of

either control or ETO-treated cells. Expression of Bax and Bcl2 increased upon ETO treatment but to the same extent in vector, IDH1- and IDH1<sup>R132</sup>-expressing cells. Of note, a similar pattern of expression of Bax and Bcl2 was observed in





**Figure 4** (a) Expression of proteins involved in apoptosis in U251 cells expressing empty vector, wild-type and mutant IDH1 isoforms. Whole lysates of cells were isolated 24 h after vehicle (V) or etoposide (ETO) treatment and analyzed (40  $\mu$ g) by immunoblotting with the indicated antibodies (left panel). Actin was used as a loading control. (b) ROS production was measured using the DCFDA probe. U251 cells expressing empty vector, wild-type and mutant IDH1 isoforms were seeded at  $2.5 \times 10^4$  cells then incubated with the DCFDA probe. Fluorescence was measured at 538 nm every 3 min for 75 min and the slope corresponding to ROS production was calculated. (c) Oxygen consumption rate (OCR) of stable cells expressing empty vector, wild-type and mutant IDH1 isoforms was measured over time. Cells ( $4 \times 10^4$ ) were plated and OCR was measured 24 h later by a XF24 Analyzer (Seahorse Bioscience). Mitochondrial inhibitors (oligomycin(a), CCCP(b), and rotenone and antimycin A(c)) were added as indicated with arrows. (d) Basal oxygen consumption was determined by measuring OCR as in c removing the non-mitochondrial oxygen consumption (OCR upon rotenone and antimycin A treatment). (e) The respiratory reserve of U251 cells expressing empty vector, wild-type and mutant IDH1 isoforms was measured by a XF24 Analyzer (Seahorse Bioscience). The respiratory reserve was determined as the difference between maximal OCR and basal OCR. (f) NADH production of cells expressing wild-type or mutant IDH1 isoforms. Cells ( $1 \times 10^6$ ) were plated, lysed the next day and subsequently assayed for their ability to produce NADH. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments performed in triplicate

cells treated with  $\alpha$ KG or D-2HG before ETO (Supplementary Figure S1). As ROS and mitochondria have an important role in apoptosis, we then measured ROS production using the DCFDA probe and cell metabolism using the XF24 analyzer. Cellular ROS were not affected by either wild-type or IDH1<sup>R132</sup> overexpression as shown in Figure 4b. Of note, ROS production was increased with rotenone, an inhibitor of the mitochondrial complex I able to induce mitochondrial ROS production, and decreased with EGCG, a polyphenol compound known for its antioxidant effect (Supplementary Figure S2). Interestingly, overexpression of IDH1<sup>R132</sup> and IDH2<sup>R172</sup> was associated with a slight but significant decrease in mitochondrial oxygen consumption rate (OCR) (Figures 4c and d, Supplementary Figure S3A). In addition to the basal OCR, maximal consumption rate, spare capacity and coupling efficiency were calculated from the recordings of the OCR following addition of different mitochondrial inhibitors (Figure 4c). Oligomycin is an inhibitor of ATP synthase and can be used to determine mitochondrial coupling efficiency, the efficiency with which mitochondria convert oxygen into ATP. CCCP, an uncoupler of mitochondrial oxidative phosphorylation raises OCR to its maximal rate, which allows the calculation of the respiratory reserve. Finally, rotenone and antimycin A, respectively, inhibits the complex I and complex III, which allows the

determination of the non-mitochondrial oxygen consumption. Interestingly, a reduced respiratory reserve was observed in cells overexpressing IDH1<sup>R132</sup> (Figure 4e) or IDH2<sup>R172</sup> (Supplementary Figure S3B). To determine which complex was involved in the decreased respiratory reserve, OCR was recorded after sequential addition of rotenone and antimycin A. Complex I activity (left panel) contributed for 90% of total OCR, whereas complex II (right panel) contributed for only 10% (Supplementary Figure S4). Mutant IDH did not change the respective contribution of these complexes to mitochondrial respiration. Taken into account that the majority of the electrons entering the electron transport chain (ETC) are doing so at the level of complex I through oxidation of NADH, the decreased mitochondrial respiratory reserve triggered by mutant IDH reflects probably a reduction of the NADH mitochondrial pool. In order to confirm this hypothesis, NADH level was measured in our cells (Figure 4f). Indeed, NADH level was decreased in IDH1<sup>R132</sup> cells compared with IDH1 cells.

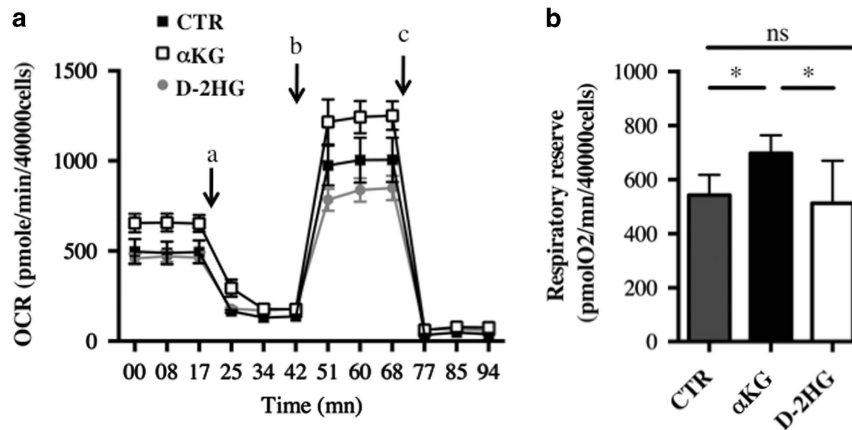
No difference was observed in the coupling efficiency between ETC activity and ATP synthesis or in glycolysis as reflected by the extracellular acidification rate (ECAR; Supplementary Figure S5). We then assessed the mitochondrial OCR of cells treated with  $\alpha$ KG or D-2HG for 6 days. The addition of  $\alpha$ KG significantly increased both



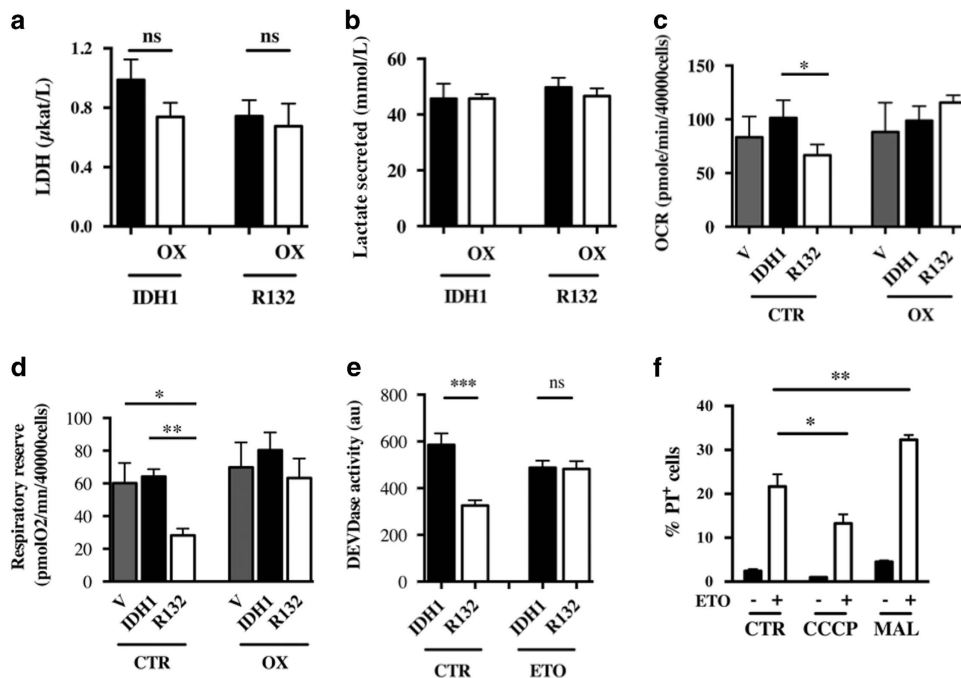
the basal and the respiratory reserve, which is not surprising as this metabolite directly fuels the TCA cycle (Figures 5a and b). However, D-2HG affected neither the basal OCR nor the respiratory reserve. Glycolysis was not affected by D-2HG (data not shown).

**Oxamate prevents reduction of both the respiratory reserve and ETO-induced apoptosis triggered by IDH1<sup>R132</sup>.** Oxamate is a known inhibitor of lactate dehydrogenase. In order to determine whether forcing the cell into oxidative

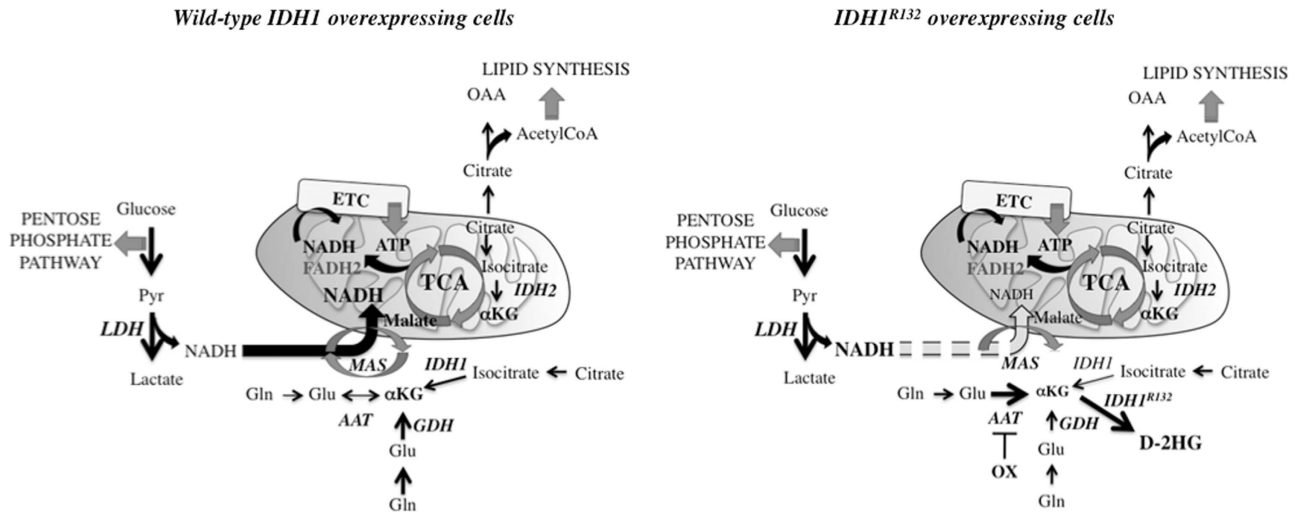
phosphorylation could affect the sensitivity to apoptosis after ETO treatment, cells were exposed to oxamate (3 mM for 3 days) before metabolic analysis or ETO treatment. Surprisingly, lactate dehydrogenase (LDH) activity was not inhibited by oxamate as shown in Figures 6a and b. Furthermore, although oxamate did not affect basal OCR or the respiratory reserve of vector and IDH1-overexpressing cells, the reduction in both basal OCR and the respiratory reserve observed in over-expressing IDH1<sup>R132</sup> cells was restored by oxamate (Figures 6c and d). ETO-induced apoptosis was then evaluated in the



**Figure 5** OCR (a) and mitochondrial respiratory reserve (b) were measured respectively as in Figure 4 in cells treated or not with 5 mM  $\alpha$ KG or D-2HG for 5 days. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments performed in triplicate. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$



**Figure 6** Lactate dehydrogenase activity (a) and lactate production (b) of U251 cells expressing IDH1 isoforms. Cells were treated or not with 3 mM oxamate (OX) for 48 h. (c) Basal oxygen consumption was determined by measuring OCR as in Figure 4c in cells expressing IDH1 isoforms treated or not with 3 mM oxamate for 7 days. (d) Mitochondrial respiratory reserve was determined as in Figure 4e in cells treated or not with 3 mM oxamate for 7 days. (e) Caspase 3 activation was determined using a DEVDase activity assay 24 h after ETO-induced apoptosis in U251 cells treated or not for 7 days with 3 mM oxamate. (f) The number of dead cells was measured 24 h after a concomitant treatment with CCCP (1  $\mu$ M) or malate (3 mM) and ETO (50  $\mu$ g/ml). The number of dead cells was determined by FACS after propidium iodide (1  $\mu$ g/ml) staining. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments performed in triplicate



**Figure 7** Metabolic alterations driven by IDH mutation in U251 cells. In cancer cells, glycolysis upregulation generates the production of reducing equivalents NADH, which is then shuttles from the cytosol to mitochondria with the MAS. Glutamine is converted to glutamate, which is further converted to  $\alpha$ KG by GDH. IDH also produces  $\alpha$ KG from isocitrate. In cells expressing IDH1<sup>R132</sup>, IDH1<sup>R132</sup> converts  $\alpha$ KG into D-2HG. To limit cellular  $\alpha$ KG depletion, IDH1<sup>R132</sup>-overexpressing cells diverts AAT from MAS function to produce  $\alpha$ KG. As a result, glycolytic NADH is no longer fully imported into mitochondria. AAT, aspartate aminotransferase; ETC, electron transport chain; GDH, glutamate dehydrogenase; Gln, Glutamine; Glu, Glutamate; IDH, isocitrate dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase; MAS, malate–aspartate shuttle; Pyr, pyruvate; TCA, tricarboxylic acid cycle

presence of oxamate. Interestingly, caspase-3 activation was not modified with oxamate after ETO treatment in IDH1-overexpressing cells (Figure 6e). However, the sensitivity of IDH1<sup>R132</sup> cells to ETO in the presence of oxamate was comparable to that of IDH1 cells (Figure 6e). Altogether, these results strongly suggest that resistance to ETO-induced apoptosis is associated with a depleted mitochondrial NADH pool triggered by mutant IDH expression. In order to determine whether the mitochondrial NADH level can affect cell sensitivity to ETO, U251 cells were treated concomitantly with either CCCP (1 $\mu$ M) or malate (5 mM) and ETO and cell death was analyzed 24 h later. Indeed, although addition of CCCP was associated with reduced cell death, addition of malate led to increased cell death (Figure 6f).

## Discussion

One of the main consequences triggered by tumor-associated IDH mutations is D-2HG accumulation as mutant IDH leads to the synthesis of D-2HG instead of  $\alpha$ KG.<sup>9</sup> In this paper, we show that mutant IDH overexpression increases cell proliferation of glioma cells and reduces ETO-induced apoptosis. Although the metabolite D-2HG is involved in the proliferation phenotype, its potential role is excluded for the latter phenotype on cell death. This is the first study showing that D-2HG does not fully recapitulate the IDH mutation phenotype.

The oncogenic potential of D-2HG has been extensively studied since the discovery of IDH mutations. In fact, D-2HG and  $\alpha$ KG are structurally similar, suggesting that D-2HG may act as a competitive inhibitor of a number of  $\alpha$ KG-dioxygenases. This hypothesis has been confirmed *in vitro* as the addition of D-2HG to cells causes the inhibition of multiple  $\alpha$ KG-dioxygenases.<sup>14</sup> Epigenetic profiling of AML and glioma patient cohorts show that IDH mutations trigger a global DNA hypermethylation.<sup>16,17</sup> Several studies have shown

that D-2HG is sufficient to disrupt TET2 function and impair histone demethylation.<sup>11,13,18</sup> In addition, this metabolite impacts a number of cellular processes such as increasing cell proliferation and blocking cell differentiation.<sup>18,19</sup> In agreement with these reports, we show an increase in cell proliferation at both low and high densities with either mutant IDH or D-2HG treatment. However, other groups<sup>20</sup> have shown reduced growth with overexpression mutant IDH, generally associated with increased oxidative stress. These data suggest that metabolic abnormalities associated with mutant IDH are cell type specific.

IDH mutations cause many other metabolic abnormalities besides D-2HG accumulation.<sup>21</sup> Cells expressing mutant IDH exhibit decreased NADPH because of the lack of conversion of isocitrate to  $\alpha$ KG and also because of the consumption of NADPH in the conversion of  $\alpha$ KG to D-2HG. NADPH serves as an electron carrier for the maintenance of redox homeostasis and reductive biosynthesis with separate cytosolic and mitochondrial pools. Thus, mutant IDH may lead to increased intracellular ROS oxidation. However, in our cell model, we show that mutant IDH does not affect the total cellular ROS nor affect superoxide dismutase 2 and catalase expression (data not shown). Studies by Leonardi *et al.*<sup>11</sup> have indicated that mutant IDH may compromise the ability of this enzyme to catalyze the Gln-dependent reductive carboxylation reaction. This pathway can be stimulated by a perturbation in the redox ratio. However, our mutant IDH cells show no selective sensitivity to Gln metabolism inhibitors such as EGCG and BPTES (Supplementary Figure S6). In our model, oxidative stress is not increased with the overexpression of mutants IDH, which could explain why there was no increase in Gln dependency in our glioma cell lines.

Several studies have been published showing opposite effects of mutant IDH on cell death. We show that mutant IDH increases the resistance of gliomas to specific cell death

stimuli. Our results are in agreement with the data published by the group of Park, showing an increased sensitivity to radiation in different cell types when IDH1 or IDH2 is silenced.<sup>22–25</sup> However, other studies show increased cell sensitivity to cell death when mutant IDH is overexpressed, in particular in ROS-mediated cell death such as radiation-<sup>26</sup> or BCNU-induced cell death.<sup>27</sup> However, these cells are addicted to glutaminolysis contrary to the glioma cell lines used in our study. This difference in metabolism could explain the discrepancy observed in cell death sensitivity between the different cell lines. Another explanation for these opposing results could be the specific genetic background of the different cell types, in particular the expressed forms of p53 and EGFR, the methylation status of MGMT and the presence or not of PTEN. This raises the possibility that, in general, the phenotype associated with mutant IDH may be restricted to some cell lines. Mutant IDH may also increase the resistance of gliomas to specific cell death stimuli. Resistance to apoptosis by IDH1<sup>R132</sup> provides a rationale for the high frequency of IDH1<sup>R132</sup> in secondary GBM.

Interestingly, our data show that both mutant IDH1 and mutant IDH2 that, respectively, are expressed in cytosol and mitochondria, lead to decreased mitochondrial respiratory reserve. Numerous studies have shown that IDH mutants use  $\alpha$ KG as a substrate to produce D-2HG instead of producing it. This drain of  $\alpha$ KG must be balanced to some extent by the cells. There are two ways of converting glutamate (Glu) into  $\alpha$ KG, either by deamination through glutamate dehydrogenase (GDH) or by transamination through aspartate aminotransferase (AAT).<sup>28</sup> Usually, AAT functions in tandem with the malate dehydrogenase (MDH) in the malate–aspartate shuttle (MAS), which transfers reducing equivalent NADH from the cytosol to mitochondria. Glycolysis, which is highly upregulated in cancer cells, is a key source of the reduced form of cytosolic NADH, mainly at the level of LDH.<sup>29</sup> As a result, the activity of MAS is increased to shuttle the glycolytic NADH into mitochondria.<sup>30</sup> However, it has also been shown that the presence or the lack of mitochondrial substrates could greatly influence the ability of AAT to effectively compete with GDH for Glu.<sup>31</sup> We speculate that to limit cytosolic and mitochondrial  $\alpha$ KG depletion induced by the presence of mutant IDH, cells are using AAT, independently of MDH, to produce  $\alpha$ KG rather than to shuttle NADH in mitochondria (Figure 7). As a result, the dissociation of AAT activity from MDH results in the accumulation of the reductive power of malate trapped in the cytosol and the reduction of mitochondrial NADH pool built from the MAS activity. Altogether, these effects lead ultimately to a reduced mitochondrial respiratory reserve. Further experiments such as direct inhibition of AAT need to be performed in order to confirm our hypothesis. However, it is in agreement with metabolomic studies showing that mutant IDH is associated with decreased fumarate and malate levels, as well as mitochondrial dysfunction.<sup>32</sup> Furthermore, it is reinforced with the recovery of the mitochondrial respiratory reserve with oxamate. Indeed, besides being an inhibitor of LDH, oxamate also inhibits AAT.<sup>33,34</sup> In our study, oxamate did not decrease lactate secretion as predicted by its LDH inhibitory action but instead prevented

the mitochondrial respiratory reserve loss only in mutant IDH-overexpressing cells.

This metabolic alteration has an important role in the resistance to ETO-induced apoptosis in IDH<sup>R132</sup>-overexpressing cells. ETO is a DNA-topoisomerase II inhibitor widely used in the treatment of diverse tumors.<sup>35</sup> Like many other agents, ETO can be used in monotherapy or in combination with other treatments. One of the major pathways of ETO metabolism in cells involves cytochrome P450 reductase, which uses NADPH as a cofactor for its enzymatic activity. Furthermore, it has been shown that ETO-induced apoptosis requires fully functional mitochondria.<sup>36</sup> Our data and others show that mutant IDH decreases the cellular NADPH pool combined with the altered mitochondrial metabolism<sup>37</sup> may explain the specific resistance to ETO of IDH1<sup>R132</sup>-overexpressing cells.

Collectively, our data support the hypothesis that mutant IDH affects tumor progression and therapy resistance, which may, at least in part, explain the high frequency of IDH mutation in secondary GBM. On the basis of our and other observations, D-2HG mediates pro-tumorigenic effects, whereas altered metabolism and in particular the imbalance of NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup> coenzymes are associated with cell resistance to specific cell death stimuli.

In conclusion, IDH mutation deregulates mitochondrial metabolism and as a consequence alters cell sensitivity to specific stimuli. Clinically, a better understanding of IDH mutations will enable IDH-directed therapies to be developed in the future.

## Materials and Methods

**Cell culture and stable transfection.** Glioblastoma U251 and LN18 cell lines were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5 g/l glucose and supplemented with 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 2 mM Glu and, respectively, 10% and 5% fetal calf serum (FCS). T98 cells were cultured in DMEM 1 g/l glucose, supplemented with penicillin, streptomycin, Glu and 10% FCS. Cells were seeded in 12-well plates and transfected with Lipofectamine 2000 transfection reagent as recommended by the manufacturer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The expression vectors for wild-type and mutated IDH1 and IDH2 were described previously.<sup>38</sup> U251, LN18 and T98 stable cells lines overexpressing IDH were selected using geneticin (Life Technologies). Hydroxyglutarate was purchased from Peptech (Bedford, MA, USA) and  $\alpha$ KG, dimethyl- $\alpha$ KG and oxamate from Sigma (St Louis, MO, USA). For cell death experiments, 0.5  $\times$  10<sup>6</sup> cells were plated and treated the next day with 50  $\mu$ g/ml ETO (Mylan, St Priest, France), 50 ng/ml TRAIL (PreproTech, Neuilly sur-Seine, France), 60 ng/ml FASL (PreproTech) and 15  $\mu$ g/ml cisplatin (Mylan).  $\gamma$ -Irradiation was carried out in a Faxitron CP160 irradiator (Faxitron X-ray Corporation, Tucson, AZ, USA) at a dose rate of 5 Gy. The number of dead cells was evaluated by FACS after incubation of 5 min with propidium iodide (Sigma).

**Cell counts, viability and clonogenicity assay.** Cell counts and viability were performed using the Countess optics and image automated cell counter (Life Technologies). Cells were mixed with trypan blue (50/50) and loaded into a Countess chamber slide. The image analysis software was used to automatically analyze the acquired cell images from the sample to give cell count and viability. Data were plotted either as the number of viable cells for cell proliferation or as the percent of dead cells for viability assessment. For cell proliferation, cells were seeded at 100,000 cells and counted every 3 to 4 days. For the clonogenicity assay, 500 cells were seeded on a 6-well plate. After 1 week, cells were fixed and stained with a solution of violet crystal 0.05% in ethanol 50%. The number of colonies is counted.



**ROS and mitochondrial membrane potential.** ROS production was measured using a DCFDA probe (Life Technologies). Cells were seeded at  $2 \times 10^4$  cells in a 96-well plate and incubated with the DCFDA probe. The fluorescence is measured at 538 nm every 3 min for 75 min. Mitochondrial membrane potential was evaluated by FACS analysis using JC-1 probe (Life Technologies) staining accordingly to the manufacturer's instruction.

**Biochemical analysis.** Production of NADH and NADPH was measured using, respectively, the NAD/NADH kit (Abcam, Cambridge, UK) and the NADP/NADPH kit (Abcam) according to the manufacturer's instruction. Lactate and LDH activity were measured using the Roche diagnostic kit on a Cobas 8000 (Roche Diagnostics, Mannheim, DE, USA) as described previously.<sup>39</sup>

**Protein lysates, immunoblotting and caspase activation.** Cells were lysed at the indicated time points in RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.6 containing 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% Na-deoxycholate and 0.1% SDS) supplemented with protease inhibitors. Protein concentration was determined using BCA protein assay (Sigma). Samples were adjusted accordingly, analyzed by SDS-PAGE and subsequent immunoblotting with antibodies that recognize IDH1 (Abcam), IDH2 (Abcam), IDH1-R132H (Dianova, Hamburg, Germany), actin (Millipore, Billerica, MA, USA), Bax (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), Bcl2 (BD Pharmingen), XIAP (R&D system, Abingdon, UK), tBid (R&D System), porin (Calbiochem, Nottingham, UK), survivin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). HRP-conjugated secondary antibodies were from BioRad (Marnes-la-Coquette, France). The ImageJ 1.42q software (NIH) was used to digitally quantify the signal intensities of western blot bands. Caspase 3 activity was quantified using the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC, as described in.<sup>15</sup>

**OCR and extracellular consumption rate (ECAR).** Cells were plated at 40 000 cells per well in 24-well XF (extracellular flux) cell culture microplate (Seahorse Bioscience, Copenhagen, Denmark). OCR was measured the next day using a XF24 Analyzer (Seahorse Bioscience). Cells were equilibrated for 1 h at 37 °C in bicarbonate-free DMEM (Sigma) supplemented with 25 mM glucose, 1 mM pyruvate and 2 mM Glu, pH 7.3 before any measurement. To determine mitochondrial parameters, OCR was measured at baseline and after addition of oligomycin (0.4 μM), FCCP (2 μM), rotenone (0.6 μM) and antimycin A (0.6 μM). All measurements were done at least in three wells per condition, twice for each experiment. Respiratory reserve was calculated as maximal OCR, after oligomycin and CCCP injections, minus basal OCR. Coupling efficiency corresponded to OCR inhibition by oligomycin. Relative contribution of complex I and II to OCR corresponded, respectively, to OCR inhibition by rotenone and antimycin A.

**Statistical analysis.** Experiments were done at least three times and data were analyzed using GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences with *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

#### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** This work was supported by grants from 'La Ligue contre le Cancer' and 'Region-Pays de la Loire'. K Oizel was funded by Region-Pays de la Loire. We thank CB Thompson for providing pCMV-IDH1 and pCMV-IDH1<sup>R132</sup> plasmids.

1. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; **321**: 1807–1812.
2. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009; **360**: 765–773.
3. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009; **361**: 1058–1066.
4. Amary MF, Bacsi K, Maggiani F, Damato S, Halai D, Berisha F et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and

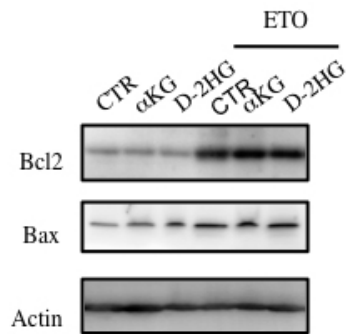
- periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J Pathol* 2011; **224**: 334–343.
5. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)* 2007; **114**: 97–109.
6. Abdel-Wahab O, Patel J, Levine RL. Clinical implications of novel mutations in epigenetic modifiers in AML. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011; **25**: 1119–1133.
7. Rakheja D, Konoplev S, Medeiros LJ, Chen W. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol* 2012; **43**: 1541–1551.
8. Pecqueur C, Oliver L, Oizel K, Lalier L, Vallette FM. Targeting metabolism to induce cell death in cancer cells and cancer stem cells. *Int J Cell Biol* 2013; **2013**: 1–13.
9. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; **462**: 739–744.
10. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst* 2010; **102**: 932–941.
11. Leonardi R, Subramanian C, Jackowski S, Rock CO. Cancer-associated isocitrate dehydrogenase mutations inactivate NADPH-dependent reductive carboxylation. *J Biol Chem* 2012; **287**: 14615–14620.
12. Oermann EK, Wu J, Guan K-L, Xiong Y. Alterations of metabolic genes and metabolites in cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2012; **23**: 370–380.
13. Chowdhury R, Yeoh KK, Tian Y-M, Hillringhaus L, Bagg EA, Rose NR et al. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep* 2011; **12**: 463–469.
14. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim S-H et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 2011; **19**: 17–30.
15. Cartron P-F, Juin P, Oliver L, Martin S, Meflah K, Vallette FM. Nonredundant role of bax and bak in bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 4701–4712.
16. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010; **18**: 553–567.
17. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 2012; **483**: 479–483.
18. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 2012; **483**: 474–478.
19. Losman J-A, Looper RE, Koivunen P, Lee S, Schneider RK, McMahon C et al. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science* 2013; **339**: 1621–1625.
20. Bralten LBC, Kloosterhof NK, Balvers R, Sacchetti A, Lapre L, Lamfers M et al. IDH1 R132H decreases proliferation of glioma cell lines in vitro and in vivo. *Ann Neurol* 2011; **69**: 455–463.
21. Reitman ZJ, Duncan CG, Poteet E, Winters A, Yan L-J, Gooden DM et al. Cancer-associated isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) R132H mutation and D-2-hydroxyglutarate stimulate glutamine metabolism under hypoxia. *J Biol Chem* 2014; **22**: 23318–23328.
22. Kim SY, Yoo YH, Park J-W. Silencing of mitochondrial NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase gene enhances glioma radiosensitivity. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; **433**: 260–265.
23. Jung KH, Park J-W. Suppression of mitochondrial NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase activity enhances curcumin-induced apoptosis in HCT116 cells. *Free Radic Res* 2011; **45**: 431–438.
24. Kil IS, Jung KH, Nam WS, Park J-W. Attenuated mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase activity enhances EGCG-induced apoptosis. *Biochimie* 2011; **93**: 1808–1815.
25. Kil IS, Chung KH, Park J-W. Silencing of mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase gene enhances selenite-induced apoptosis. *Free Radic Res* 2010; **44**: 332–339.
26. Li S, Chou AP, Chen W, Chen R, Deng Y, Phillips HS et al. Overexpression of isocitrate dehydrogenase mutant proteins renders glioma cells more sensitive to radiation. *Neuro Oncol* 2013; **15**: 57–68.
27. Mohrenz IV, Antonietti P, Pusch S, Capper D, Balss J, Voigt S et al. Isocitrate dehydrogenase 1 mutant R132H sensitizes glioma cells to BCNU-induced oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 2013; **18**: 1416–1425.
28. McKenna MC, Stevenson JH, Huang X, Hopkins IB. Differential distribution of the enzymes glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in cortical synaptic mitochondria contributes to metabolic compartmentation in cortical synaptic terminals. *Neurochem Int* 2000; **37**: 229–241.
29. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; **4**: 891–899.
30. Greenhouse WV, Lehninger AL. Occurrence of the malate-aspartate shuttle in various tumor types. *Cancer Res* 1976; **36**: 1392–1396.
31. Erecińska M, Nelson D. Activation of glutamate dehydrogenase by leucine and its nonmetabolizable analogue in rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 1990; **54**: 1335–1343.
32. Thornburg JM, Nelson KK, Clem BF, Lane AN, Arumugam S, Simmons A et al. Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008; **10**: R84.

33. Reitman ZJ, Jin G, Karoly ED, Spasojevic I, Yang J, Kinzler KW *et al*. Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 3270–3275.
34. Rej R. Measurement of aspartate aminotransferase activity: effects of oxamate. *Clin Chem* 1979; **25**: 555–559.
35. Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 1998; **34**: 1514–1521.
36. Kulawiec M, Owens KM, Singh KK. Cancer cell mitochondria confer apoptosis resistance and promote metastasis. *Cancer Biol Ther* 2009; **8**: 1378–1385.
37. Grassian AR, Parker SJ, Davidson SM, Divakaruni AS, Green CR, Zhang X *et al*. IDH1 mutations alter citric acid cycle metabolism and increase dependence on oxidative mitochondrial metabolism. *Cancer Res* 2014; **74**: 3317–3331.
38. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA *et al*. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 2010; **17**: 225–234.
39. Gratas C, Séry Q, Rabé M, Oliver L, Vallette FM. Bak and Mcl-1 are essential for Temozolomide induced cell death in human glioma. *Oncotarget* 2014; **5**: 2428–2435.



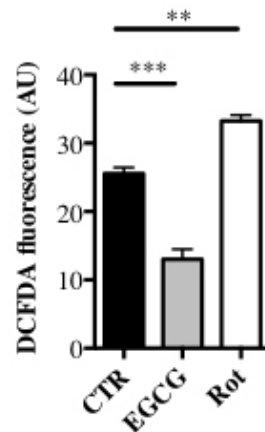
**Cell Death and Disease** is an open-access journal published by *Nature Publishing Group*. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (<http://www.nature.com/cddis>)



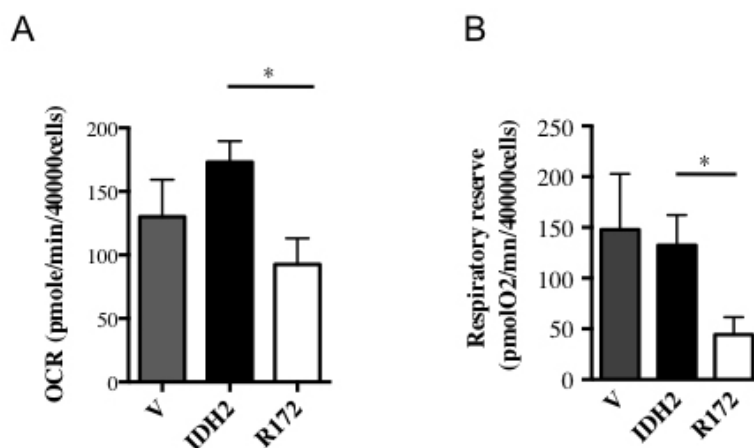
### Supplementary 1

Expression of proteins involved in apoptosis in U251 cells expressing empty vector, wild-type and mutant IDH1 isoforms. Whole lysates of cells (40 $\mu$ g) untreated or treated with 3mM of  $\alpha$ KG or D-2HG for 3 days prior to etoposide (ETO) treatment were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. Actin was used as a loading control.



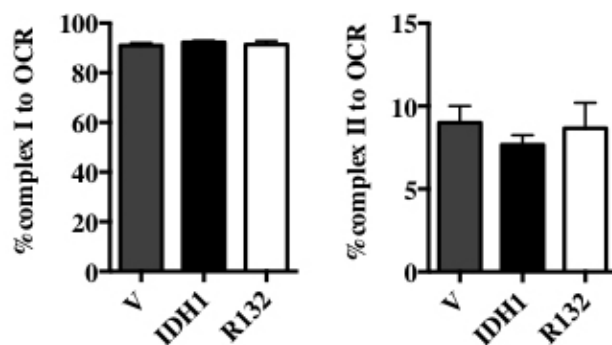
### Supplementary 2

ROS production was measured using the DCFDA probe. U251 cells treated with either rotenone expressing empty vector, wild-type and mutant IDH1 isoforms were seeded at 2,5 x 10<sup>4</sup> cells then incubated with the DCFDA probe. Fluorescence was measured at 538nm every 3 min for 75 min and the slope corresponding to ROS production was calculated



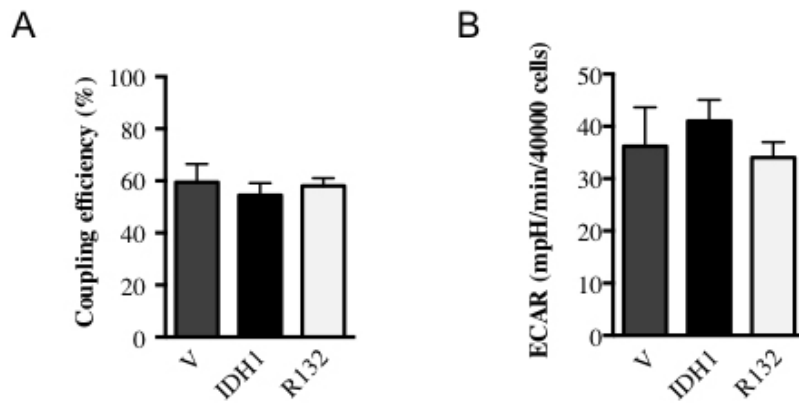
### Supplementary 3

**A)** Oxygen consumption rate (OCR) of stable cells expressing empty vector (V), wild-type (IDH2) and mutant (R172) IDH2 isoforms was measured over time.  $4 \times 10^4$  cells were plated and OCR was measured 24h later by a XF24 Analyzer (Seahorse Bioscience). **B)** The respiratory reserve of U251 cells expressing empty vector, wild-type and mutant IDH2 isoforms was measured by a XF24 Analyzer (Seahorse Bioscience). The respiratory reserve was determined as the difference between maximal OCR and basal OCR.



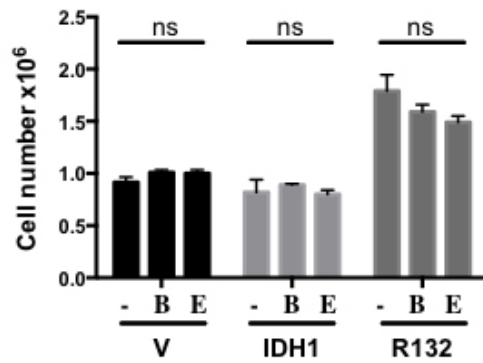
### Supplementary 4

Relative contribution of complex I and II to ETC in cells. Contribution of complex I was calculated as percent of OCR inhibited by rotenone while complex II contribution was calculated as  $(OCR_{\text{Rotenone}} - OCR_{\text{Rotenone+AntimycinA}}) / OCR$ .



#### Supplementary 5

**A)** Coupling efficiency of transfected U251 cells with vector (V), IDH1 and IDH1R132 (R132) isoforms was calculated as the inverse ratio of OCR<sub>oligomycin</sub> over OCR<sub>basal</sub>. **B)** Basal glycolysis was assessed by measuring ECAR in U251 cells expressing IDH1 isoforms.



#### Supplementary 6

Proliferation of vector, wild-type and mutant IDH1 cells after EGCG (E) or BPTES (B) treatments. Cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells, treated for 6 days with EGCG ( $110 \mu\text{M}$ ) or BPTES ( $10 \mu\text{M}$ ) and counted 10 days later using trypan blue staining.



## **2. Impact de l'inhibition de la glutaminolyse sur la sensibilité à la mort cellulaire**

En plus de l'augmentation de la glycolyse aérobie, la dépendance à la glutamine est une modification caractéristique du métabolisme des cellules cancéreuses qui a reçu un intérêt croissant comme cible thérapeutique potentielle. L'augmentation de la consommation de la glutamine fournit des avantages énergétiques aux cellules cancéreuses. Notamment, cet acide aminé est utilisé par les cellules cancéreuses comme source anaplerotique du TCA, via sa conversion en  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG), et comme donneur d'azote pour la synthèse des acides nucléiques et acides aminés non essentiels. Dans les gliomes, l'expression de la glutamine synthase est très fréquemment élevée et corrélée à un mauvais pronostic vital des patients (Rosati et al., 2013). Toutefois, les essais cliniques ciblant la glutaminolyse ont montré peu d'efficacité de part les effets secondaires toxiques engendrés (Bobrovnikova-Marjon and Hurov, 2014). La récente mise en évidence que l'epigallocatechin-3-gallate (EGCG) est capable d'inhiber la glutamate déhydrogenase est d'autant plus intéressante qu'il s'agit d'un composé naturel extrait du thé vert ouvrant la possibilité de pouvoir diminuer la toxicité éventuellement engendrée. Nous avons voulu déterminer la dépendance des lignées de GBM à la glutamine et l'impact de l'EGCG sur leur sensibilité à la mort cellulaire.

### **Principaux résultats :**

- L'EGCG inhibe l'oxydation mitochondriale de la glutamine
- La déplétion en glutamine inhibe la prolifération des lignées de GBM et cet effet est mimé par l'EGCG
- L'EGCG peut induire directement la mort cellulaire des cellules de GBM
- L'EGCG peut induire un shift métabolique vers l'oxydation mitochondriale du glucose
- L'EGCG peut sensibiliser les cellules de GBM à l'apoptose extrinsèque induite par TRAIL et FAS-L

**L'inhibition de l'oxydation mitochondriale de la glutamine par l'EGCG sensibilise les lignées cellulaires de glioblastome à la mort cellulaire**

Kristell Oizel<sup>1,2</sup>, Catherine Gratas<sup>1,2,3</sup>, Lisa Oliver<sup>1,2,3</sup>, François M. Vallette<sup>1,2,4</sup> & Claire Pecqueur<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>CRCNA - INSERM UMR 892 - CNRS UMR 6299, Nantes F44007 France

<sup>2</sup>Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes F44007 France

<sup>3</sup>Centre Hospitalier-Universitaire (CHU) de Nantes, Nantes F44007 France

<sup>4</sup>Institut de Cancérologie de l'Ouest - René Gauducheau, St Herblain

## Introduction

Les dérégulations du métabolisme ont été récemment incluses parmi les marqueurs caractéristiques des cellules cancéreuses et associées à la résistance aux traitements thérapeutiques. Une des principales altérations du métabolisme, mise en évidence par Otto Warburg dès les années 1920, est la forte dépendance des cellules cancéreuses à la glycolyse aérobie quelque soit la concentration en oxygène (effet Warburg). Cette adaptation métabolique leur permet de subvenir à leurs besoins énergétiques et de biosynthèses nécessaires à leur prolifération rapide. En plus du glucose, la glutamine a été récemment démontrée comme étant une source énergétique importante pour la prolifération des cellules cancéreuses (1). Cet acide aminé est utilisé par les cellules cancéreuses comme source anaplérotique du TCA (Tricarboxylic acid cycle) et comme source d'azote pour la synthèse des acides nucléiques et des acides aminés non essentiels. La première réaction de la glutaminolyse est la conversion de la glutamine en glutamate par la glutaminase (GLS). Le glutamate est ensuite converti en  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG) par une réaction de désamination oxydative par la glutamate dehydrogenase (GDH) ou par une réaction de transamination par les aminotransférases permettant la formation d'acides aminés. L' $\alpha$ KG est un métabolite clé impliqué à la fois dans la synthèse de l'oxaloacétate (OAA) et du citrate et dans l'activité de nombreuses dioxygénases modulant l'expression génique comme les prolylhydroxylases ou les histones deméthylases. De plus, en absence de glutamine, l'apport d' $\alpha$ KG à la mitochondrie est nécessaire à la survie des cellules surexprimant Myc (2).

Le métabolisme particulier des cellules cancéreuses a mené au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant si certains modulateurs du métabolisme ont montré des effets en essai clinique, leur utilisation reste limitée par les effets toxiques engendrés. Un des principaux challenges est donc de développer des molécules ciblant les cellules cancéreuses avec le minimum d'effets secondaires. L'intérêt s'est porté vers des composés naturels tels que les polyphénols extraits du thé vert. Parmi eux, l'epigallocatechin-3-gallate (EGCG) a montré une efficacité *in vitro* et *in vivo* dans de nombreux types de cancers, seul ou en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques, incluant l'inhibition de la prolifération, de l'invasion, de l'angiogénèse et des métastases (3). Cependant, ses mécanismes d'action anticancéreux ne sont pas encore bien définis d'autant plus que l'EGCG présente des effets pléiotropiques et dépendants du type de tumeur. Parmi

ses nombreux effets, l'EGCG est capable d'inhiber l'activité de la GDH (4). Afin de déterminer l'importance du métabolisme de la glutamine dans la progression tumorale des GBM, nous avons dans un premier temps caractérisé le métabolisme basal de différentes lignées cellulaires humaines de GBM. Nous montrons que l'utilisation de la glutamine est couplée à l'oxydation phosphorylative mitochondriale. L'inhibition de ce métabolisme par l'EGCG inhibe la prolifération cellulaire et sensibilise les cellules à la mort cellulaire induite par des ligands de récepteurs de mort comme FAS-L et TRAIL.

## **Matériels et Méthodes**

Tous les matériels nécessaires à la culture cellulaire proviennent de Life Technologies. Tous les produits chimiques sont obtenus de Sigma-Aldrich sauf si spécifié autrement.

### **Culture Cellulaire**

Les lignées cellulaires MG-U87 et T98 sont cultivées à 37 °C en atmosphère humide avec 5% CO<sub>2</sub> en milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) Glutamax contenant 1g/L de glucose et supplémenté avec 100U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal (SVF). La lignée cellulaire LN18 est cultivée en DMEM à 5g/L de glucose, supplémenté en pénicilline, streptomycine, 2mM de glutamine et 5% de SVF. Les lignées cellulaires A172 et U251 sont cultivées en DMEM à 5g/L de glucose, supplémenté en pénicilline, streptomycine, 2mM de glutamine et 10% de SVF.

### **Traitements cellulaires**

Les cellules sontensemencées à  $0.5 \times 10^6$  cellules en pétri 100mm et traitées avec 110µM d'EGCG pendant le temps indiqué. Pour les expériences de mort cellulaire,  $0.5 \times 10^6$  cellules sontensemencées en pétri 100mm et traitées le jour suivant avec 50 µg/mL d'étoposide (Mylan) pendant 24h, 200 ng/mL de TRAIL (PreproTech) pendant 5h, 60ng/mL de FAS-L (PreproTech) pendant 6h, 50µM de témozolomide (Interchim) pendant 72h ou irradiées à 5Gy et récupérées 72h après irradiation. L'irradiation est réalisée dans un irradiateur Faxitron CP160 (Faxitron X-ray Corporation).

### **Comptage cellulaire, viabilité et cycle cellulaire**

Les cellules sont comptées à l'aide du bleu trypan en utilisant le compteur automatique Countess (Invitrogen). Pour la viabilité, les cellules sont incubées 5min avec de l'iodure de propidium et le nombre de cellules mortes est évalué par cytométrie en flux FACSCalibur (BD Biosciences, France). Le cycle cellulaire est réalisé sur 100000 cellules après marquage au DAPI selon le protocole Two-Step Cell Cycle Analysis et lecture au NucleoCounter NC-3000 (Chemometec).

### **Cytométrie en flux**

L'expression des transporteurs au glucose est mesurée par cytométrie en flux. Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 4% puis incubées 1h à 4°C avec l'anticorps Glut1 (Novus)

ou Glut4 (Novus). Les anticorps secondaires couplés à l'Alexa sont incubés 1h à 4°C. Les intensités de fluorescences sont lues par passage au cytomètre de flux FACSCalibur (BD Biosciences, France). Pour les expériences de prolifération, les cellules sont placées dans un milieu à 0,1% de SVF sur la nuit puis incubées avec le Violet Proliferation Dye (VPD450, BD Horizon) (1µM) pendant 15 minutes. Les cellules sont lavées au PBS et cultivées 72h avant passage au cytomètre de flux FACSCanto (BD Biosciences, France). Les analyses sont réalisées grâce aux logiciels CellQuestPro et FlowJo.

### **Lysats protéiques, western-blot et activité caspase**

Les cellules sont lysées en tampon Phosphosafe (Merck) et la concentration protéique est déterminée en utilisant le kit BCA protein assay. Les protéines (50µg) sont séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane PVDF. Les anticorps primaires sont incubés une nuit à 4°C et reconnaissent l'actine (Millipore, Billerica, MA, USA), pAKT (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), pAMPK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), ATF4 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), Bax (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), Bcl-2 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), pERK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), LC3 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Les anticorps secondaires couplés à la HRP (BioRad) sont incubés 1h à 37°C. Le logiciel ImageJ 1.42q est utilisé pour quantifier les intensités des bandes de Western-blot. L'activité caspase 3 est mesurée en utilisant le substrat fluorescent Ac-DEVD-AMC (Bachem, Suisse) sur les lysats protéiques.

### **Métabolisme cellulaire**

Les cellules sontensemencées à 40000 cellules/puits dans les plaques de cultures 24 puits XF-24 (Extracellular Flux) (Seahorse Bioscience, Copenhagen, Denmark). La consommation d'oxygène (OCR) et l'acidification extracellulaire (ECAR) sont mesurées le jour suivant en utilisant le XF24 Analyzer (Seahorse Bioscience). Pour les cellules prétraitées à l'EGCG, les cellules sontensemencées le jour même de l'expérience sur les plaques de cultures XF-24 à l'aide du Cell Tak (Corning). Pour les mesures basales en milieu complet, les cellules sont équilibrées 1heure à 37°C en milieu DMEM bicarbonate-free supplémenté avec 25mM de glucose, 1mM de pyruvate et 2mM de glutamine, pH 7.3 avant toute mesure. Pour déterminer les paramètres mitochondriaux, l'OCR est mesurée en basal et après addition d'oligomycine (1 µM), de CCCP (1 µM), de roténone (1 µM) et d'antimycine A (1 µM). Pour déterminer la glycolyse, l'ECAR est mesurée en basal. Pour les expériences de capacité d'oxydation du

glucose et de la glutamine, les cellules sont équilibrées en milieu DMEM bicarbonate-free contenant respectivement 2mM glutamine ou 1mM de pyruvate. L'oxydation mitochondriale du substrat est déterminée par la différence entre l'OCR avant injection et l'OCR après injection du substrat. Toutes les mesures sont réalisées au minimum dans 3 puits par condition et deux expériences indépendantes.

### **Dosage du glucose et des acides aminés (AA) dans le milieu de culture**

Les cellules sont ensemencées à 50000 cellules/puits dans des plaques de culture de 12 puits. 24h après encencement, les milieux de cultures sont changés et traités ou non à l'EGCG et des puits contrôles de milieux sans cellules en présence ou non d'EGCG sont ajoutés. Après 72h de culture, les milieux sont récupérés et centrifugés pour éliminer les débris cellulaires. Les résultats exprimés correspondent à la différence de concentration en glucose ou en AA entre les milieux de culture en présence de cellules et les milieux contrôles respectifs traités ou non à l'EGCG. Les concentrations sont ensuite rapportées au nombre de cellules comptées à 72h.

Le dosage du glucose est réalisé dans le Service de Biochimie du CHU de Nantes. Le glucose est dosé sur l'automate Cobas 8000 (Roche Diagnostics, France) à l'aide du kit Diagnostic Glucose HK Gen.3 (05168791190-Roche Diagnostics GmbH, D-68298, Mannheim). La méthode est basée sur la mesure photométrique (340nm) de la concentration en NADPH formé suite à l'oxydation du glucose en 6-phosphogluconate. La concentration en NADPH formé est directement proportionnelle à la concentration en glucose.

Le dosage des AA est réalisé à la Plateforme de Spectrométrie de Masse du CHU de Nantes. Les AA sont dosés dans le milieu de culture par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Les AA sont marqués à l'aide du kit aTRAQ (ABSciex, MA, USA). Des contrôles de qualité interne (Norleucine et Norvaline, AA non physiologiques, présents dans les tampons de marquage) et des contrôles de qualité externe (sérum dont la concentration en AA est connue) (RECIPE, Allemagne), sont inclus lors du marquage pour vérifier la qualité du processus. La concentration des AA est déterminée par rapport au standard interne à l'aide du logiciel Analyst (ABSciex, MA, USA).

### **Analyses statistiques**

Les expériences sont réalisées au minimum trois fois et les résultats sont analysés en comparant la moyenne +/-sem des différentes conditions par un t-test ou un Anova. Ces analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.00 (GraphPad

Software, San Diego, CA, USA). Les différences avec des P-values  $< 0.05$  sont considérées comme statistiquement significatives.



## Résultats

### Caractérisation du métabolisme de différentes lignées cellulaires de GBM

Afin de caractériser le métabolisme cellulaire des lignées de GBM, nous avons mesuré, en utilisant la technologie Seahorse, la vitesse de consommation d'oxygène (OCR) reflet de la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS) et l'acidification du milieu extracellulaire (ECAR) reflet de l'oxydation complète du glucose en lactate. Deux profils métaboliques se distinguent. Un métabolisme global élevé c'est à dire possédant à la fois une forte phosphorylation oxydative et une forte glycolyse, retrouvé dans les lignées U251 et T98 (Fig.1A). Un métabolisme global plus faible est retrouvé pour les lignées U87, LN18 et A172. Les deux principaux substrats énergétiques utilisés par les cellules en prolifération sont le glucose et la glutamine. L'utilisation de ces substrats a été mesurée au niveau de la mitochondrie et de la production de lactate. Pour cela nous avons mesuré les différences d'OCR et d'ECAR avant et après injection de ces deux substrats. Si l'oxydation mitochondriale du glucose est faible pour toutes les lignées (données non montrées), celles-ci oxydent complètement le glucose en lactate (Fig1.B). Les lignées T98 et U251 ont une capacité d'oxydation du glucose en lactate plus importante que les autres lignées, en accord avec leur ECAR basal plus important (Fig.1A). La glutamine n'est pas utilisée par les lignées pour la production de lactate (données non montrées). L'utilisation de la glutamine est couplée à l'OXPHOS pour toutes les lignées et est plus importante pour les lignées U251 et U87 (Fig.1C). Contrairement à l'oxydation du glucose en lactate reflet de la glycolyse, l'utilisation mitochondriale de la glutamine n'est pas corrélée à la respiration mitochondriale basale des lignées (Fig.1A). En effet, la lignée U251 possède une plus forte oxydation mitochondriale de la glutamine couplée à l'OXPHOS que la lignée T98 alors que leur métabolisme basal est identique. De la même manière, la lignée U87 possède une oxydation mitochondriale de la glutamine plus élevée que les lignées LN18 et A172 bien qu'elles possèdent des métabolismes globaux similaires.

### La glutamine est nécessaire à la prolifération des lignées de GBM

Nous avons évalué l'impact d'une déplétion en glutamine dans le milieu de culture sur la prolifération des lignées de GBM. Nous montrons que la déplétion en glutamine induit une forte diminution de la prolifération de toutes les lignées (Fig.2A et Suppl.S1). Seules les lignées U251 et T98 continuent de proliférer sous déplétion en glutamine. Cette observation

peut être expliquée par leur forte capacité d'oxydation mitochondriale du glucose comparé aux autres lignées. Nous avons ensuite déterminé si cette diminution de prolifération était due à un arrêt du cycle cellulaire ou à de la mort cellulaire. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux lignées U87 et LN18 présentant un métabolisme basal similaire mais une capacité d'oxydation de la glutamine différente. L'absence de glutamine dans le milieu de culture entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase S (Fig.2B) et une induction de mort cellulaire de la lignée LN18 (Fig.2C). En revanche, la déplétion en glutamine n'induit ni arrêt du cycle (Fig.2B) ni mort cellulaire pour la lignée U87 (données non montrées). Nous avons ensuite déterminé si l'absence de glutamine dans le milieu de culture pouvait ralentir la vitesse de prolifération des cellules U87 par marquage au VPD450. Nous montrons une diminution du nombre de divisions effectuées par les cellules U87 en absence de glutamine d'un facteur 2,6 comparé aux cellules contrôles cultivées en présence de glutamine (Fig.2D). L'absence de glutamine dans le milieu de culture entraîne donc une diminution de la prolifération via un ralentissement du cycle cellulaire des cellules U87 sans arrêt définitif du cycle cellulaire.

### **L'EGCG mime les effets d'une déplétion en glutamine**

Nous avons montré que l'utilisation de la glutamine est couplée à l'OXPHOS pour toutes les lignées de GBM. L'epigallocatechin-3-gallate (EGCG) est capable d'inhiber la glutamate dehydrogenase (GDH), enzyme de conversion du glutamate en  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG) (4). Dans un premier temps, nous avons vérifié l'inhibition de la GDH par l'EGCG dans nos lignées. Pour cela, nous avons mesuré les différences d'OCR avant et après injection de glutamine sur des cellules cultivées en présence ou non d'EGCG pendant 24h. Comme attendu, l'EGCG diminue significativement l'augmentation d'OCR observée dans les cellules contrôles après addition de glutamine (Fig.3A). De plus, le dosage du glutamate dans le milieu de culture de la lignée LN18 montre une accumulation significative de ce métabolite après 72h de traitement à l'EGCG (Fig.3B). La lignée U87 est cultivée en milieu contenant du Glutamax, forme modifiée de la glutamine permettant de la stabiliser, qui peut être clivé par les peptidases aboutissant en un apport continu en glutamine et en alanine dans le milieu. De façon similaire à la lignée LN18, mais non significative, nous retrouvons une accumulation de glutamate dans le milieu extracellulaire de la lignée U87 après traitement EGCG (Fig.3B). L'ensemble de ces résultats est en accord avec un effet inhibiteur de l'EGCG sur la GDH. De plus, l'inhibition de la GDH par l'EGCG est associée à l'augmentation non significative de la

consommation de glutamine suggérant que les cellules cherchent à compenser l'absence d'apport d' $\alpha$ KG à la mitochondrie (Fig.3C).

Nous avons ensuite mesuré la prolifération des lignées en présence d'EGCG. De façon similaire à la déplétion en glutamine, l'EGCG inhibe complètement la prolifération de la lignée LN18 (Fig.3D). Cet effet est associé à un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Fig.3E) et à une induction de la mort cellulaire (Fig.3F). L'EGCG inhibe également la prolifération de la lignée U87 mais cette inhibition est plus faible que sous une déplétion en glutamine (Fig.3D). Cependant les mécanismes impliqués semblent similaires puisque l'EGCG diminue le nombre de divisions (Fig.3G) sans arrêt du cycle (Fig.3E) ni de mort cellulaire (données non montrées). Cet effet de l'EGCG sur la prolifération de la lignée U87 est identique que les cellules soient cultivées en milieu Glutamax ou en milieu DMEM supplémenté en glutamine (Fig. suppl. S2).

### **L'EGCG inhibe la glycolyse aérobie des lignées de GBM**

Parmi ses effets pléiotropiques, il a été montré dans certains modèles cellulaires que l'EGCG pouvait également inhiber la glycolyse (5–7), notamment en diminuant l'expression du transporteur au glucose GLUT1 à la surface des cellules. Afin de déterminer si cet effet était retrouvé dans nos lignées, nous avons mesuré la production de lactate par la technique du Seahorse après injection d'EGCG. Nous montrons que l'EGCG inhibe la production de lactate dans les deux lignées de GBM testées (Fig.4A). Cette inhibition de la glycolyse aérobie est immédiate et proportionnelle à la quantité d'EGCG injectée. Pour déterminer si une diminution d'expression des transporteurs au glucose pouvait expliquer cet effet, nous avons mesuré l'expression de ces transporteurs à la surface des cellules par FACS après un traitement de 24h à l'EGCG. Nous n'avons pas pu mettre pas en évidence de diminution d'expression des transporteurs au glucose GLUT1 et GLUT4 quelque soit la lignée considérée (Fig.4B). Au contraire, l'expression de GLUT1 et de GLUT4 est augmentée dans la lignée U87 après traitement EGCG, toutefois de manière non significative. De plus, dans notre modèle, l'EGCG augmente significativement la consommation en glucose de la lignée LN18 (Fig.4C). La même tendance est observée pour les cellules U87 cependant non significative. Ces résultats suggèrent que le glucose n'est pas converti en lactate mais utilisé pour alimenter d'autres voies comme la mitochondrie ou la voie des pentoses phosphate.

### **L'EGCG stimule la nécrose de la lignée LN18 et la sénescence de la lignée U87**

Afin de déterminer si l'EGCG provoque un stress métabolique, l'activation de différentes voies de signalisations a été analysée par Western-blot. L'EGCG active la voie AMPK dès 24h dans les lignées U87 et LN18 (Fig.5A et B). De plus, si la voie Akt n'est pas modifiée par l'EGCG dans aucune des deux lignées, nous montrons une activation transitoire de la voie ERK à 24h dans la lignée U87 (Fig.5A et B). L'activation de l'AMPK supporte l'existence d'un stress énergétique. Afin de déterminer si ce stress métabolique est associé à l'autophagie ou au réticulum endoplasmique, nous avons évalué l'expression de LC3 (Light Chain 3) et ATF4. L'association de la LC3-I à la phosphatidyl-ethanolamine forme la LC3-II nécessaire à la première étape de la formation des autophagosomes ou vacuoles autophagiques. Comme montré par l'absence d'augmentation de la forme LC3-II, le stress métabolique déclenché par l'EGCG n'induit l'autophagie dans aucune des deux lignées (Fig.5A et B). ATF4 est un facteur de transcription induit par le stress du réticulum endoplasmique et activant la transcription de gènes codant pour les protéines pro-apoptotiques notamment Puma et Noxa. Nous montrons une augmentation de l'expression d'ATF4 spécifiquement dans la lignée LN18. Afin de déterminer si la mort observée dans la lignée LN18 après traitement à l'EGCG était induite par apoptose nous avons mesuré l'expression des protéines Bax et Bcl-2 et mesuré l'activité DEVDase dans ces cellules. Nous ne mettons pas en évidence de modification du rapport Bax/Bcl-2 (Fig.5A) et ne montrons pas d'augmentation significative de l'activité des caspases 3 après traitement à l'EGCG dans la lignée LN18 (Fig.5C). Ces résultats suggèrent que l'EGCG n'induit pas l'apoptose ni l'autophagie mais plutôt une mort par nécrose. Enfin, le stress énergétique produit par l'EGCG induit un marquage  $\beta$ -gal positif dans la lignée U87 synonyme d'une entrée potentielle des cellules en sénescence (environ 20%) (Fig.5D).

### **L'EGCG induit un shift métabolique de la lignée U87 vers l'oxydation mitochondriale du glucose**

Nous avons montré que la lignée U87 était capable de survivre au stress énergétique induit par l'EGCG. L'EGCG induit une augmentation de la consommation de glucose par les cellules qui n'est pas associée à la production de lactate. Ces données suggèrent une redirection du métabolisme des cellules. Nous avons mesuré la respiration mitochondriale ainsi que l'utilisation de différents acides aminés après différents temps de traitement à

l'EGCG. Dans un premier temps, nous montrons que l'inhibition de l'oxydation mitochondriale de la glutamine par l'EGCG est maintenue au cours du temps (Fig.6A). De plus, nous ne mettons pas en évidence d'augmentation de la production d'alanine ni d'aspartate après traitement EGCG ce qui suggère que les cellules U87 ne compensent pas par l'utilisation de la voie de transamination du glutamate en  $\alpha$ KG pour alimenter la mitochondrie (Fig.6B et C). L'inhibition de la conversion du glucose en lactate par l'EGCG est également retrouvée et maintenue au cours du temps (Fig.6D). De façon intéressante, l'oxydation du glucose dans la mitochondrie est significativement augmentée après 72h de culture en présence d'EGCG et maintenue après 6 jours de traitement (Fig.6E). De plus, nous montrons que la lignée U87 augmente sa respiration mitochondriale après 6 jours de traitement à l'EGCG (Fig.6.F). La réserve respiratoire mitochondriale a ensuite été mesurée en présence d'un découplant synthétique de la chaîne respiratoire, le CCCP. La capacité de réserve respiratoire est augmentée de manière très importante par l'EGCG (Fig.6.G). L'ensemble de ces résultats suggère qu'en présence d'EGCG, empêchant l'apport par la glutamine de métabolites anaplérotiques au niveau de la mitochondrie, les cellules réorientent l'utilisation du glucose vers l'oxydation mitochondriale plutôt que vers la production de lactate. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons évalué la sensibilité de ces cellules à un inhibiteur de la glycolyse, le 2-Deoxyglucose (2DG), par calcul de l'IC50. La sensibilité des cellules U87 au 2DG est diminuée avec le prétraitement à l'EGCG (CTR IC50=134,9mM; EGCG IC50=35,27mM) (Fig.6H).

### **L'EGCG sensibilise la lignée U87 à l'apoptose extrinsèque**

L'EGCG n'induisant pas directement la mort des cellules U87, nous avons voulu déterminer s'il était capable de les sensibiliser à différents inducteurs de mort. En absence d'EGCG, les cellules U87 sont résistantes à tous les inducteurs de mort testés, les irradiations, l'étoposide, le témozolomide, TRAIL et FAS-L. En présence d'EGCG, si les cellules survivent à la majorité des traitements, une augmentation significative de l'activité DEVDase est observée après traitement par FAS-L et TRAIL, deux ligands de récepteurs de mort impliqués dans l'apoptose extrinsèque (Fig.7A). Afin de déterminer si la sensibilisation à ces deux inducteurs de mort était due à la diminution des apports anaplérotiques à la mitochondrie, nous avons évalué l'effet d'une déplétion en glutamine ainsi que d'un apport exogène d' $\alpha$ KG sur la sensibilité à TRAIL. Nous montrons que la déplétion en glutamine dans le milieu de culture ne sensibilise pas à la mort induite par TRAIL (Fig.7B). De même, un apport exogène de

dimethyl- $\alpha$ KG, forme permettant sa diffusion à travers les membranes, ne réverse pas la mort induite par TRAIL sous traitement EGCG (Fig.7C). Ces données suggèrent l'implication d'autres mécanismes dans la sensibilisation à la mort induite par l'EGCG.

## Discussion

Il a longtemps été pensé que la majorité des cellules cancéreuses présentaient des mitochondries défectueuses les poussant à utiliser la glycolyse aérobie pour répondre à leurs besoins énergétiques. Cependant, il est communément admis aujourd'hui que la respiration mitochondriale persiste dans la majorité des cellules cancéreuses ayant un métabolisme reposant sur l'effet Warburg et que celles-ci utilisent la glutamine comme source de carbone anaplérotique du TCA (8). Nous avons montré que les lignées de GBM ont un métabolisme reposant à la fois sur la glycolyse aérobie et la respiration mitochondriale. Si les lignées testées oxydent très peu le glucose dans leurs mitochondries, elles sont capables d'oxyder la glutamine plus ou moins fortement. Dans cette étude, nous montrons que l'EGCG, inhibiteur allostérique de la GDH, enzyme permettant la conversion du glutamate en  $\alpha$ KG, inhibe la prolifération des lignées de GBM. Nous montrons également que l'EGCG est capable d'induire directement la mort ou de sensibiliser à la mort induite par TRAIL et FAS-L.

Plusieurs études épidémiologiques démontrent que la consommation de thé vert est associée à un effet protecteur contre le développement de certains cancers tels que les cancers du poumon, de la prostate et du sein (9,10). L'EGCG est le constituant majeur du thé vert et a montré des effets antiprolifératifs voire d'induction de mort dans différents types de lignées cancéreuses. Toutefois, ses mécanismes d'action sont encore mal déterminés et récemment il a été montré que l'EGCG pouvait inhiber la GDH (4). Cet effet est retrouvé de manière indirecte dans nos lignées de GBM puisque nous montrons que l'EGCG inhibe l'oxydation mitochondriale couplée à l'OXPHOS de la glutamine conduisant à l'accumulation de glutamate. Il a été montré que la transamination du glutamate était la principale voie de formation de l' $\alpha$ KG dans les cellules cancéreuses surexprimant Myc, facteur induisant la dépendance des cellules à la glutamine (2). Il serait intéressant de déterminer le niveau d'expression de c-Myc dans nos lignées. Cependant, nous mettons ici en évidence que l'inhibition de la GDH par l'EGCG inhibe la prolifération de nos deux lignées d'intérêt suggérant l'utilisation préférentielle de la GDH plutôt que des transaminases. De plus, même si l'inhibition de la prolifération de la lignée U87 par l'EGCG est plus faible que celle observée par une déplétion en glutamine, nous montrons par dosage de l'alanine et de l'aspartate que la lignée U87 ne compense pas l'apport d' $\alpha$ KG par l'utilisation de la voie de transamination.

Il a été montré dans plusieurs lignées cancéreuses que l'EGCG pouvait induire l'apoptose via la modulation de la balance bax/bcl-2 (11). De manière intéressante, nous montrons que l'EGCG est capable d'induire directement une mort indépendante de l'activation des caspases dans la lignée LN18. Le stress énergétique prolongé comme la déplétion en glucose ou en acides aminés active l'UPR (unfold protein response), une voie déclenchée par un excès de protéines présentant une conformation anormale dans le réticulum endoplasmique. Il a été montré que ATF4, un des effecteurs de cette voie, joue un rôle important dans le déclenchement de l'apoptose induite par la déplétion en glutamine dans des cellules de neuroblastome surexprimant c-Myc (12). Nous mettons en évidence une activation d'ATF4 dès 48h de traitement EGCG dans la lignée LN18. Outre l'apoptose, il a été montré que ATF4 peut déclencher la mort cellulaire par nécrose (13). Nos résultats seraient donc en accord avec le déclenchement d'une mort cellulaire non apoptotique médiée par ATF4 dans la lignée LN18. Toutefois, pour valider cette hypothèse, le rôle d'ATF4 dans l'induction de cette mort devra être vérifiée en inhibant l'expression de cette protéine en utilisant par exemple un siRNA.

Nous nous sommes intéressés aux mécanismes de survie de la lignée U87. Hwang *et al.* avaient montré que l'EGCG était capable d'inhiber la transcription des transporteurs au glucose (6). Dans notre modèle, nous ne mettons pas en évidence de diminution de l'expression des transporteurs au glucose et montrons que les lignées sont au contraire toujours capables de consommer le glucose. L'EGCG induit une réorientation métabolique de la lignée U87 vers l'oxydation mitochondriale du glucose après 72h de traitement. Etant donné l'effet immédiat de l'EGCG sur l'inhibition de la conversion du glucose en lactate, deux hypothèses peuvent être envisagées. L'effet de l'EGCG pourrait être expliqué par l'inhibition de la lactate déhydrogénase (LDH) ou plus en amont de la glycolyse par l'inhibition de la PKM2. L'EGCG pourrait inhiber l'activité de la LDH et ainsi la conversion du pyruvate en lactate amenant à une accumulation d'intermédiaires de la glycolyse qui dans un deuxième temps induirait l'activation de la PKM2 sous sa forme tétramérique et ainsi l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie. Cette réorientation de l'utilisation du glucose pourrait être due à un effet direct de l'EGCG sur l'activité de la LDH ou de PKM2 ou à un effet indirect via le stress énergétique et l'activation de l'AMPK.

Nos résultats suggèrent que la lignée U87 adapterait son métabolisme en privilégiant l'apport de carbones au niveau de la mitochondrie pour maintenir la production de citrate nécessaire à la biosynthèse des lipides nécessaires au maintien de sa prolifération. En effet, l'induction de



l'oxydation mitochondriale du glucose démontre l'apport du pyruvate à la mitochondrie et l'observation d'une diminution de la formation d'alanine et d'aspartate suggère un maintien du pool d'OAA. De plus, nous montrons que la lignée U87 est d'avantage dépendante à la glycolyse après traitement à l'EGCG puisque sa sensibilité au 2DG est augmentée. Il a été démontré que l'augmentation de l'expression de la pyruvate carboxylase qui permet de transformer le pyruvate en OAA rend les cellules surexprimant c-Myc résistantes à la mort induite par la déplétion en glutamine (14). L'expression de la pyruvate carboxylase pourra être évaluée dans la lignée U87 sous traitement EGCG. Enfin, de nombreux acides aminés peuvent jouer un rôle dans l'adaptation métabolique et la résistance à la mort induite par l'EGCG. Il a par exemple été montré que l'asparagine empêche la mort induite par la déplétion en glutamine dans des cellules de GBM (15). Lors de notre étude nous avons réalisé le dosage des acides aminés dans le milieu de culture des lignées. Afin de compléter cette étude, il serait intéressant de mettre au point la technique de dosage intracellulaire de ces acides aminés. La technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) utilisant des carbones marqués serait encore plus précise pour regarder le devenir des carbones issus du glucose ou de la glutamine après traitement EGCG.

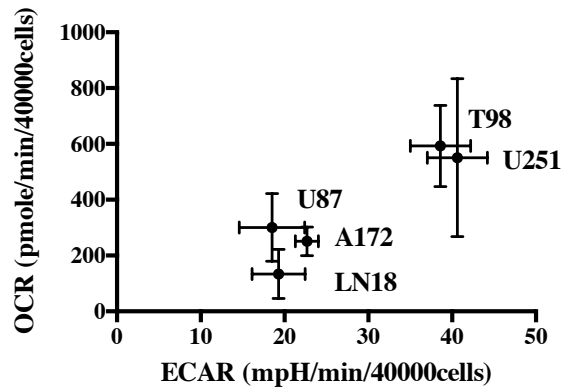
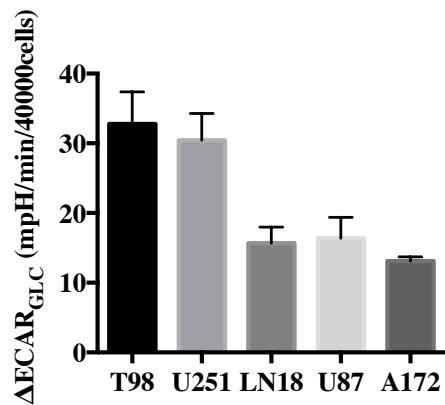
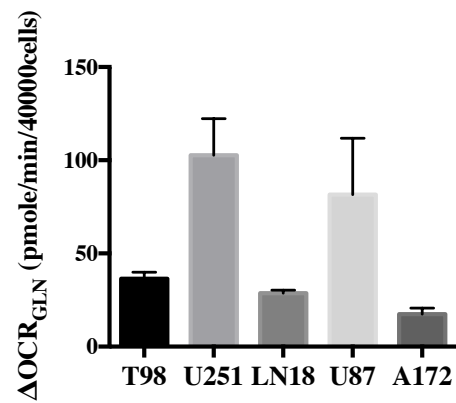
Enfin, il a été montré que l'EGCG pouvait augmenter la sensibilité à la mort induite par des agents chimiothérapeutiques *in vitro* et *in vivo* comme le paclitaxel dans le cancer du sein ou la doxorubicine dans le carcinome hépatocellulaire (16,17). Nous montrons qu'un prétraitement à l'EGCG induit la sensibilisation de la lignée U87 aux inducteurs d'apoptose extrinsèque TRAIL et FAS-L mais pas aux inducteurs d'apoptose intrinsèque tels que l'étoposide, le témozolomide ou les irradiations. Ces résultats rejoignent ceux de Siegelin *et al.* qui ont montré dans le gliome que la sensibilisation à TRAIL par l'EGCG passait par la diminution de PEA15 une protéine inhibitrice de l'apoptose appartenant à la famille de protéines possédant un domaine effecteur de mort (DED) (18). Dans des lignées de carcinomes hépatocellulaires et de la prostate, il a été montré que la sensibilisation à TRAIL par l'EGCG passe par l'inhibition de l'expression d'une autre protéine de la famille des DED-containing protein, cFLIP, associée à une augmentation de l'expression des récepteurs à TRAIL DR4 et/ou DR5 (19,20). Nos données préliminaires ne montrent pas de modification de l'expression de DR4 ni de DR5 par l'EGCG. L'expression de cFLIP et de PEA15, impliqués tous les deux dans l'apoptose extrinsèque induite par TRAIL et FAS-L, sera étudiée dans les cellules U87 traitées à l'EGCG.

Nous avons montré l'importance de la glutamine pour la croissance et la survie des cellules de GBM et la possibilité de cibler le métabolisme de la glutamine pour sensibiliser aux traitements. Beaucoup de points restent encore à éclaircir comme les voies de compensations métaboliques engendrées par l'EGCG ainsi que ses mécanismes de sensibilisation à la mort cellulaire. De part ses effets pléiotropiques, la part due à la simple modification du métabolisme sur ses effets anticancéreux est difficile à évaluer. Un exemple concret est l'impact de l'EGCG sur la modulation des facteurs épigénétiques qui peut être direct comme l'inhibition des DNMT ou HDAC et indirect via l'inhibition de la GDH et la diminution du pool d' $\alpha$ KG, substrat nécessaire aux dioxygénases comme les TET. Cette question est d'autant plus pertinente dans notre modèle qu'un traitement concomitant EGCG et TRAIL ne sensibilise pas à la mort la lignée U87 (données non montrées). L'impact de l'EGCG sur les marqueurs épigénétiques sera donc évalué et des études actuellement en cours ont pour but d'évaluer la part due à l'inhibition de la glutaminolyse et du switch métabolique dans la sensibilité à la mort cellulaire des lignées en utilisant d'autres modulateurs du métabolisme comme le BPTES (Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide), inhibiteur synthétique de la glutaminase (21).

## Bibliographie

1. Wang J-B, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, et al. Targeting Mitochondrial Glutaminase Activity Inhibits Oncogenic Transformation. *Cancer Cell*. 2010 Sep 14;18(3):207–19.
2. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang X-Y, Pfeiffer HK, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(48):18782–7.
3. Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2011 Dec 15;82(12):1807–21.
4. Li C, Allen A, Kwagh J, Doliba NM, Qin W, Najafi H, et al. Green Tea Polyphenols Modulate Insulin Secretion by Inhibiting Glutamate Dehydrogenase. *J Biol Chem*. 2006 Apr 14;281(15):10214–21.
5. Kobayashi Y, Suzuki M, Satsu H, Arai S, Hara Y, Suzuki K, et al. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *J Agric Food Chem*. 2000 Nov;48(11):5618–23.
6. Hwang J-T, Ha J, Park I-J, Lee S-K, Baik HW, Kim YM, et al. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett*. 2007 Mar 8;247(1):115–21.
7. Moreira L, Araújo I, Costa T, Correia-Branco A, Faria A, Martel F, et al. Quercetin and epigallocatechin gallate inhibit glucose uptake and metabolism by breast cancer cells by an estrogen receptor-independent mechanism. *Exp Cell Res*. 2013 Jul;319(12):1784–95.
8. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(49):19345–50.
9. Nakachi K, Suemasu K, Suga K, Takeo T, Imai K, Higashi Y. Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. *Jpn J Cancer Res Gann*. 1998 Mar;89(3):254–61.
10. Khan N, Mukhtar H. Tea and health: studies in humans. *Curr Pharm Des*. 2013;19(34):6141–7.
11. Hastak K, Gupta S, Ahmad N, Agarwal MK, Agarwal ML, Mukhtar H. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene*. 2003 Jul 31;22(31):4851–9.
12. Qing G, Li B, Vu A, Skuli N, Walton ZE, Liu X, et al. ATF4 regulates MYC-mediated neuroblastoma cell death upon glutamine deprivation. *Cancer Cell*. 2012 Nov 13;22(5):631–44.

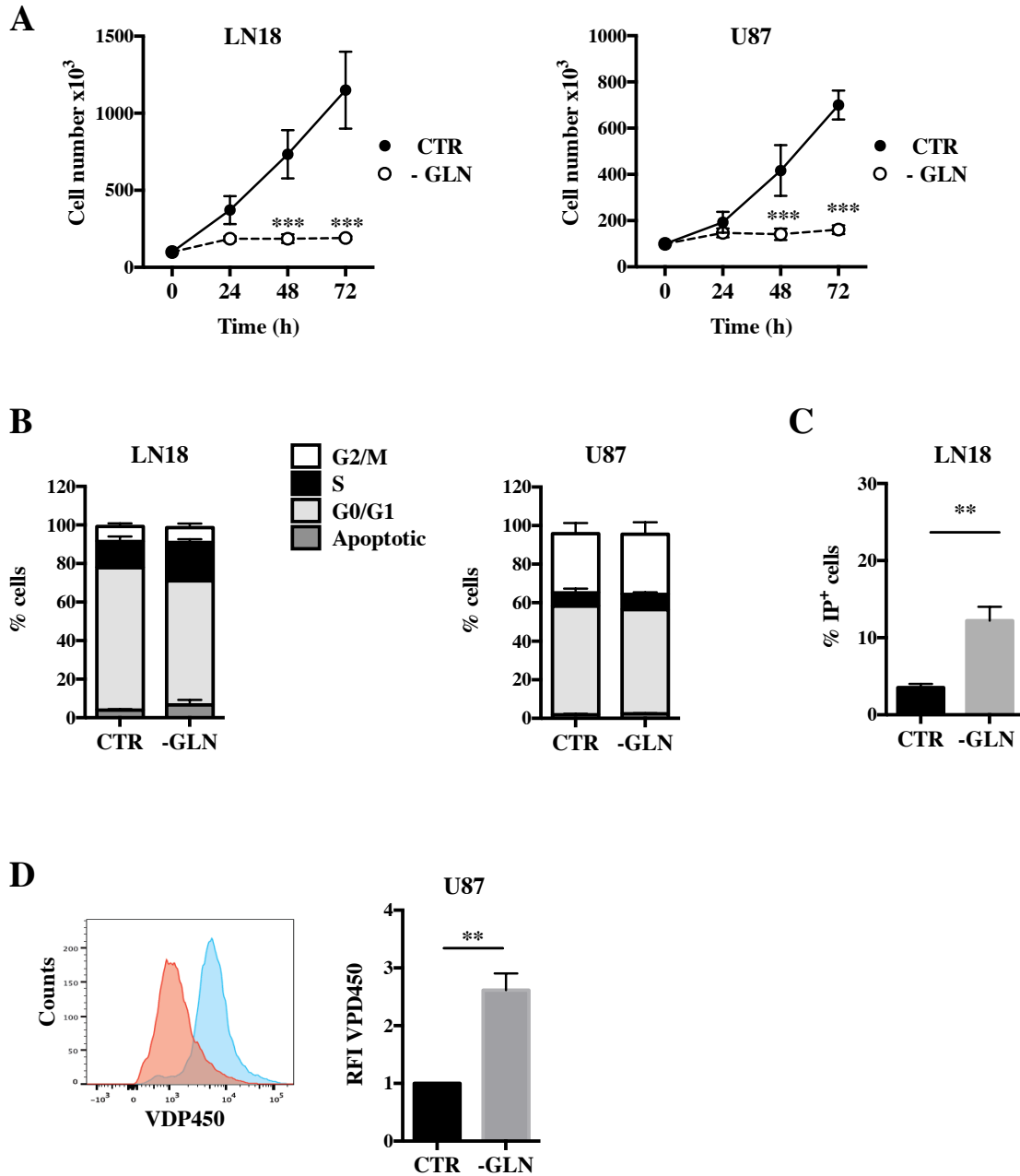
13. León-Annicchiarico CL, Ramírez-Peinado S, Domínguez-Villanueva D, Gonsberg A, Lampidis TJ, Muñoz-Pinedo C. ATF4 mediates necrosis induced by glucose deprivation and apoptosis induced by 2-deoxyglucose in the same cells. *FEBS J.* 2015 Jul 14.
14. Cheng T, Sudderth J, Yang C, Mullen AR, Jin ES, Matés JM, et al. Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 May 24;108(21):8674–9.
15. Zhang J, Fan J, Venneti S, Cross JR, Takagi T, Bhinder B, et al. Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion. *Mol Cell.* 2014 Oct 23;56(2):205–18.
16. Luo T, Wang J, Yin Y, Hua H, Jing J, Sun X, et al. (-)-Epigallocatechin gallate sensitizes breast cancer cells to paclitaxel in a murine model of breast carcinoma. *Breast Cancer Res BCR.* 2010;12(1):R8.
17. Liang G, Tang A, Lin X, Li L, Zhang S, Huang Z, et al. Green tea catechins augment the antitumor activity of doxorubicin in an in vivo mouse model for chemoresistant liver cancer. *Int J Oncol.* 2010 Jul;37(1):111–23.
18. Siegelin MD, Habel A, Gaiser T. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) downregulates PEA15 and thereby augments TRAIL-mediated apoptosis in malignant glioma. *Neurosci Lett.* 2008 Dec 19;448(1):161–5.
19. Siddiqui IA, Malik A, Adhami VM, Asim M, Hafeez BB, Sarfaraz S, et al. Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis. *Oncogene.* 2008;27(14):2055–63.
20. Abou El Naga RN, Azab SS, El-Demerdash E, Shaarawy S, El-Merzabani M, Ammar el-SM. Sensitization of TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by phytochemicals. *Life Sci.* 2013 Mar 21;92(10):555–61.
21. Robinson MM, McBryant SJ, Tsukamoto T, Rojas C, Ferraris DV, Hamilton SK, et al. Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES). *Biochem J.* 2007 Sep 15;406(3):407–14.

**A****B****C****Figure 1 : Caractérisation du métabolisme des lignées de GBM**

A) Vitesses de consommation d'oxygène (OCR) et d'acidification du milieu (ECAR) des lignées de GBM mesurées 24h après ensemencement des cellules.

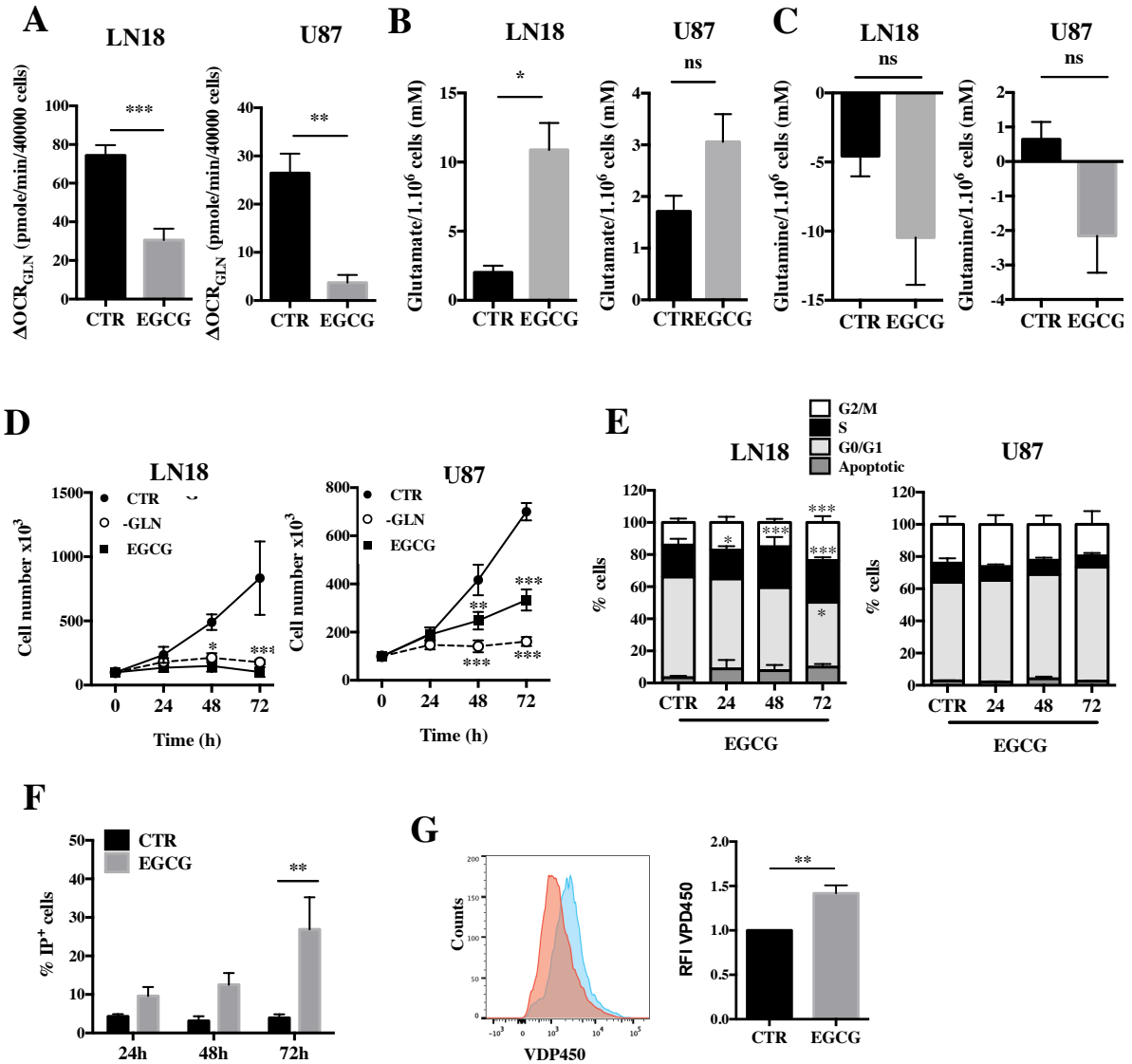
B) Production de lactate après injection de glucose.

C) Oxydation de la glutamine couplée à l'activité de la chaîne respiratoire.



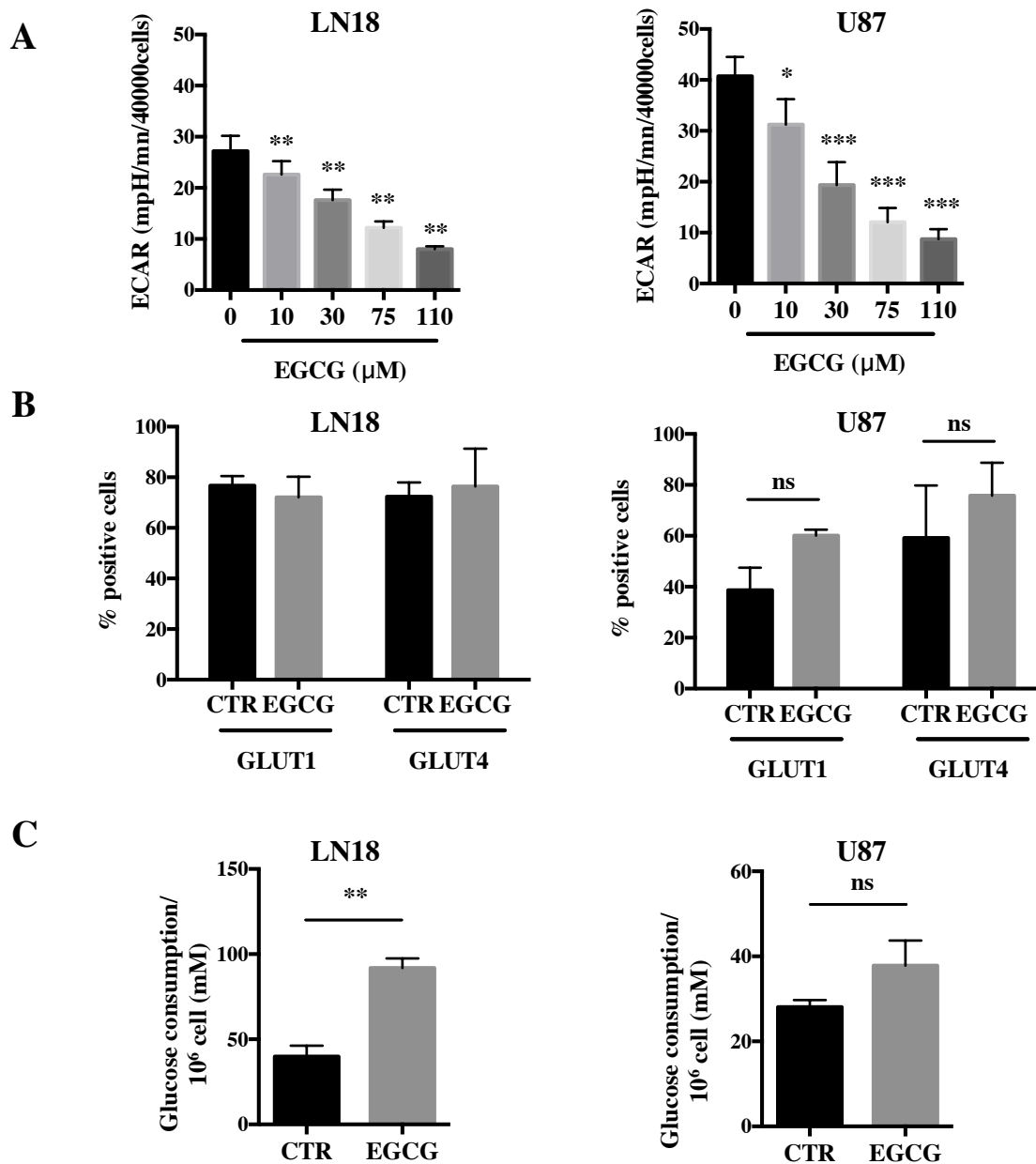
**Figure 2 : La déplétion en glutamine inhibe la prolifération des lignées de GBM**

- A)** Prolifération des lignées de GBM en présence ou non de glutamine par comptage cellulaire au bleu trypan.
- B)** Phases du cycle cellulaire des lignées après déplétion en glutamine à 72h par marquage au DAPI.
- C)** Nombre de cellules mortes après 72h de déplétion en glutamine par marquage à l'iodure de propidium.
- D)** Prolifération des cellules U87 par cytométrie en flux 72h après marquage au VPD450 des cellules contrôles (en rouge) et traitées à l'EGCG (en bleu). Les résultats représentent la médiane d'intensité de fluorescence (RFI) rapportée aux cellules avant traitement.



**Figure 3 : L'EGCG mime les effets d'une déplétion en glutamine**

A) L'oxydation de la glutamine par les mitochondries des cellules LN18 et U87 est mesurée en présence ou en absence d'EGCG après fixation des cellules au Cell Tak. L'utilisation du glutamate (B) et de la glutamine (C) par les cellules est déterminée après 72h de culture en présence ou en absence d'EGCG. Cette utilisation est la différence entre la quantité d'acides aminés dans le milieu en présence des cellules moins la quantité d'acides aminés présente dans le milieu rapportée à 10<sup>6</sup> cellules. D) La prolifération des cellules est mesurée en présence ou non de glutamine ou d'EGCG par comptage cellulaire au bleu trypan aux temps indiqués. E) Le nombre de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en présence ou non d'EGCG a été déterminé à différents temps par marquage au DAPI. F) Le nombre de cellules LN18 mortes en présence d'EGCG est déterminé en cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium. G) La vitesse de prolifération des cellules U87 en présence (bleu) ou en absence (rouge) d'EGCG est évaluée par cytométrie en flux 72h après marquage au VPD450. Les résultats représentent la médiane d'intensité de fluorescence (RFI) rapportée aux cellules avant traitement.



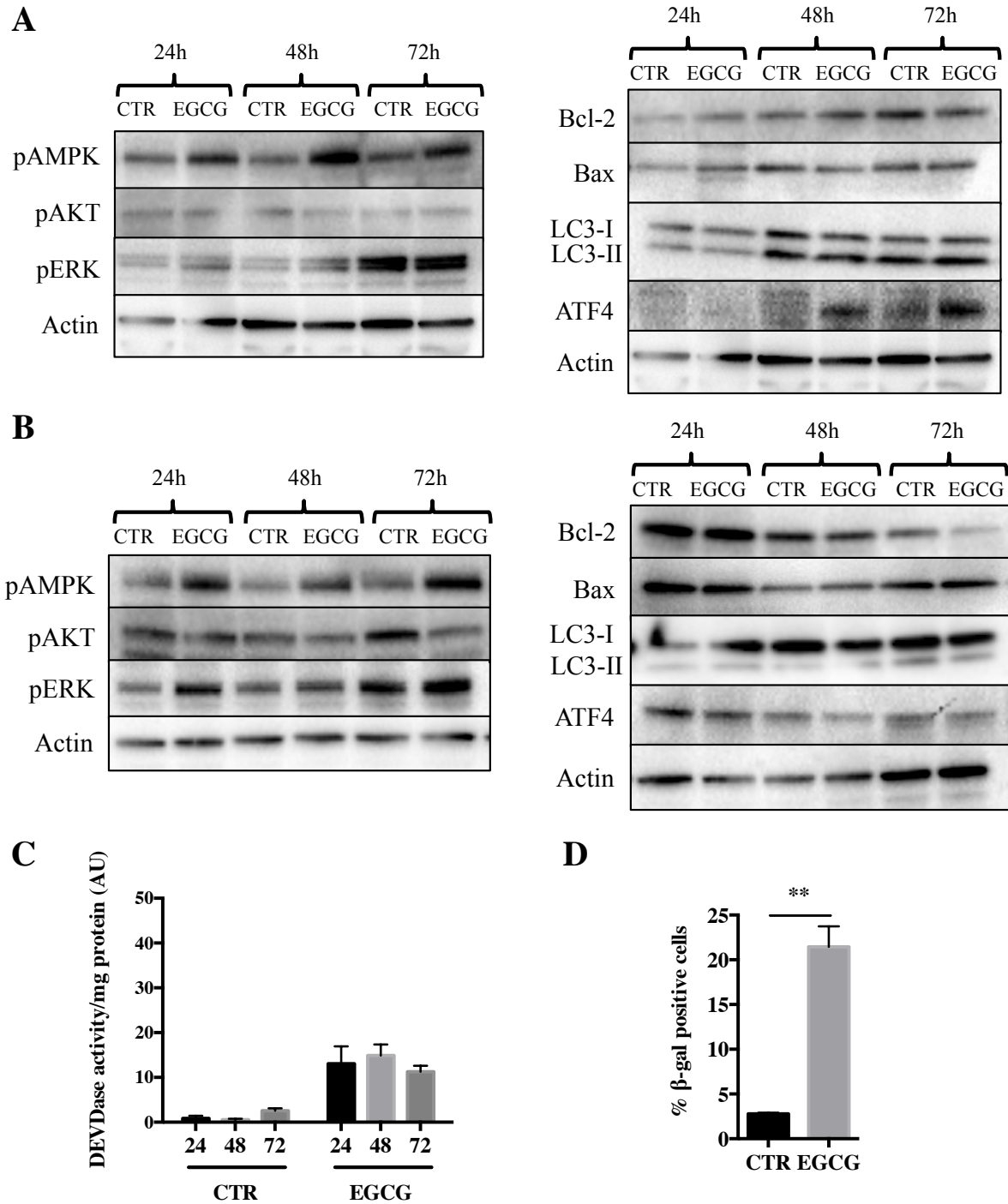
**Figure 4 : L'EGCG inhibe la glycolyse aérobie des lignées de GBM**

A) La vitesse d'acidification du milieu (ECAR) des lignées est mesurée après injections successives d'EGCG pour une concentration finale de 10, 30, 75 et 110 $\mu\text{M}$ .

B) L'expression des transporteurs au glucose GLUT1 et GLUT4 des lignées est déterminée par cytométrie en flux, 24h après traitement à l'EGCG (110 $\mu\text{M}$ ).

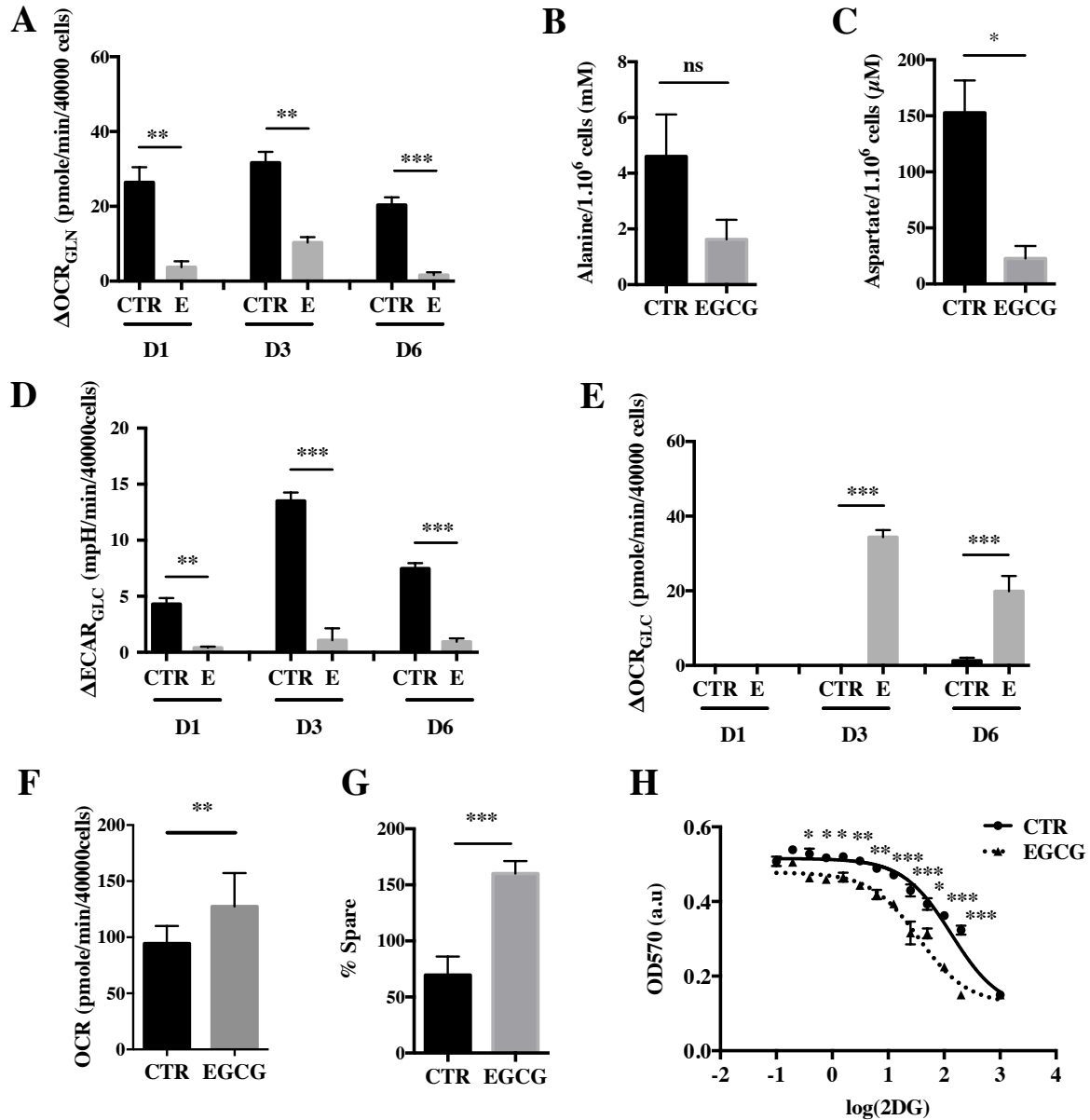
C) L'utilisation du glucose par les cellules est calculé 72h de culture en présence ou non d'EGCG (110 $\mu\text{M}$ ). Les résultats correspondent à la quantité de glucose dans le milieu en présence des cellules moins la quantité de glucose présente dans le milieu rapporté à 10<sup>6</sup> cellules.





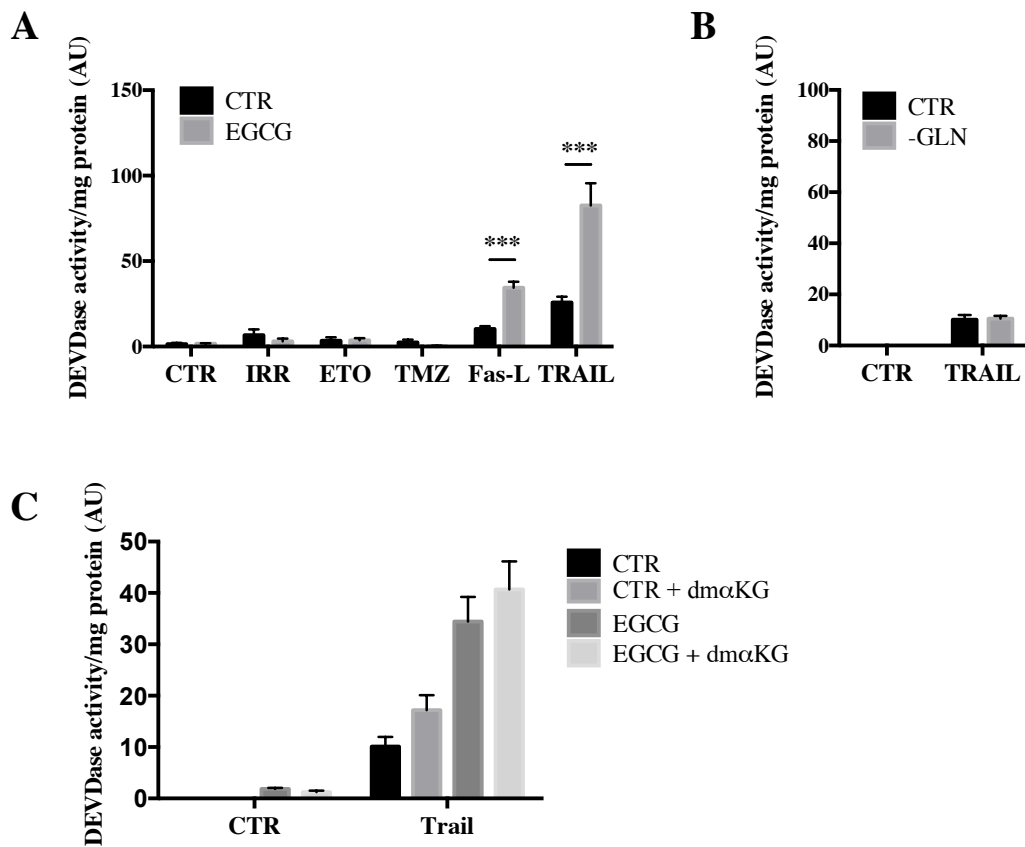
**Figure 5 : L'EGCG stimule la nécrose de la lignée LN18 et la sénescence de la lignée U87**

L'activation de différentes voies de signalisation est évaluée par western blot à partir de lysats cellulaires (50 $\mu$ g) des lignées LN18 (A) et U87 (B) après différents temps de traitements à l'EGCG (110 $\mu$ M). C) L'activité DEVDase est mesurée dans les lysats cellulaires des LN18 après différents temps de traitements à l'EGCG (110 $\mu$ M). D) La sénescence des cellules U87 est déterminée 72h après traitement à l'EGCG (110 $\mu$ M) après fixation et marquage  $\beta$ -Gal.



**Figure 6 : L'EGCG induit un shift métabolique de la lignée U87**

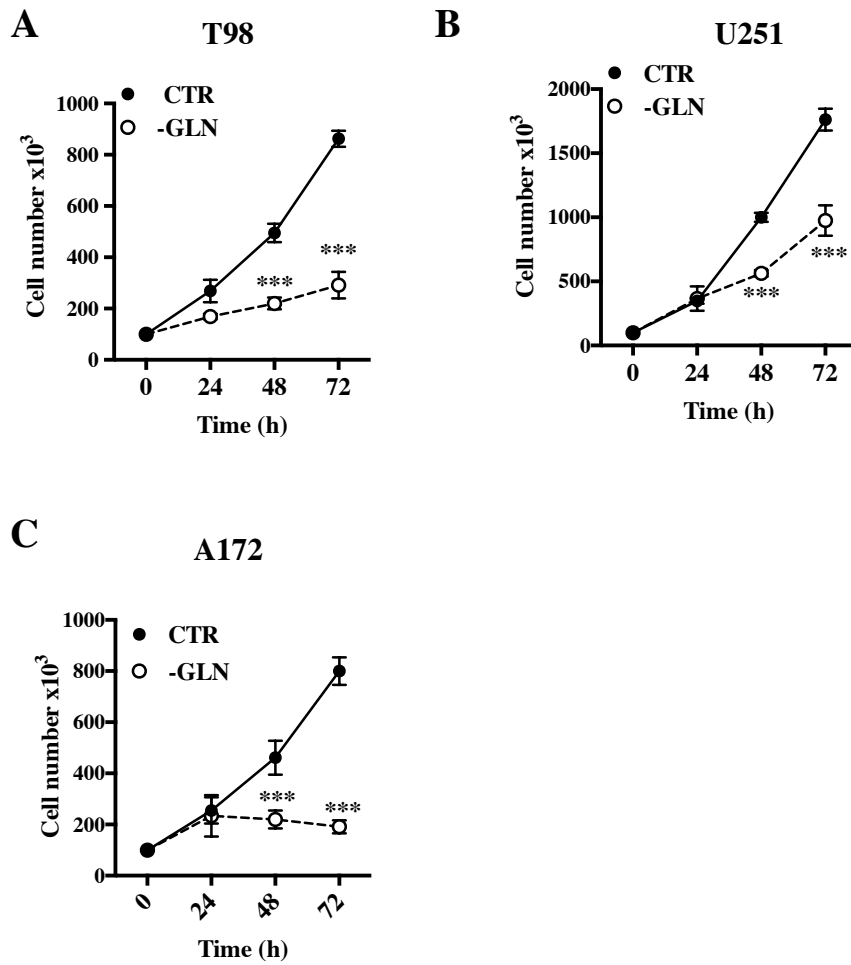
Les cellules U87 sont traitées à l'EGCG pendant différents temps. Après fixation des cellules au Cell Tak, l'oxydation de la glutamine par la mitochondrie ( $\Delta\text{OCR}_{\text{GLN}}$ ) est déterminée par la différence de OCR après injection de glutamine moins OCR avant injection (A). L'utilisation de l'alanine (B) et de l'aspartate (C) par les cellules est calculé après 72h de culture en présence ou non d'EGCG. Les résultats correspondent à la quantité d'acides aminés présente dans le milieu en présence des cellules moins la quantité de glucose présente dans le milieu seul rapporté à 10<sup>6</sup> cellules. L'oxydation du glucose en lactate (D) et mitochondriale (E) est déterminée par la différence d'OCR et d'ECAR avant et après injection de glucose (D) après différents temps de culture en présence ou non d'EGCG. La respiration mitochondriale basale (F) et la capacité respiratoire (G) sont mesurées après 6 jours de traitement à l'EGCG. La quantité de 2-Deoxyglucose (2DG) nécessaire à inhiber 50% de la prolifération des cellules (IC50) cultivées en présence ou non d'EGCG pendant 6 jours est calculée par MTT (H).



**Figure 7 : L'EGCG sensibilise la lignée U87 aux inducteurs extrinsèques de l'apoptose**

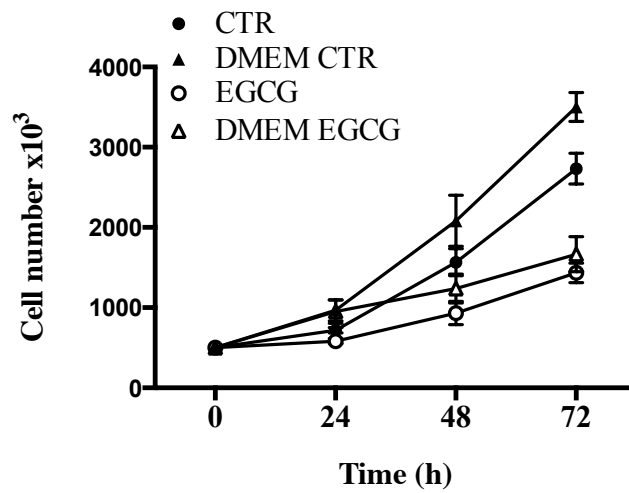
**A)** La lignée U87 est traitée 6 jours à l'EGCG. Les cellules sontensemencées ( $5 \times 10^5$ ) puis traitées avec différents inducteurs. L'activité DEVDase est mesurée dans les extraits cellulaires après 5h de traitement à TRAIL (200ng/ml), 6h de traitement FAS-L (60ng/ml), 24h de traitement à l'étoposide ( $50 \mu\text{g/ml}$ ), 72h de traitement TMZ ( $50 \mu\text{M}$ ) et 72h après irradiation (5Gy). **B)** La lignée U87 est cultivée 6 jours avec ou sans glutamine. L'activité DEVDase est mesurée dans les extraits cellulaires correspondants. **C)** La lignée U87 est traitée 6 jours à l'EGCG. Les cellules sont prétraitées 2h avec du dmαKG (3mM) avant le traitement de 5h à TRAIL (200ng/ml). L'activité DEVDase est mesurée dans les extraits cellulaires.

## Figures Supplémentaires



**Figure S1 : La déplétion en glutamine inhibe la prolifération des lignées de GBM**

Prolifération de la lignée T98 (A), U251 (B) et A172 (C) en présence ou non de glutamine par comptage cellulaire au bleu trypan à différents temps.



**Figure S2 : Prolifération de la lignée U87 selon le milieu de culture sous traitement EGCG**

La prolifération de la lignée U87 en présence ou non d'EGCG (110 $\mu$ M) dans le milieu glutamax (symboles noirs) ou en milieu DMEM complet (symboles blancs) est mesurée par comptage cellulaire au bleu trypan à différents temps.

### **3. Caractérisation des primocultures de GBM et sensibilité à la mort cellulaire**

Le glioblastome multiforme (GBM), astrocytome de grade IV, représente la forme la plus commune et la plus maligne des tumeurs primaires du système nerveux central avec une médiane de survie de 14 mois avec traitement (Stupp et al., 2005). Différentes caractéristiques cliniques, histopathologiques et moléculaires ont été rapportées mais leur association au pronostic vital des patients reste controversée. Seuls le jeune âge et l'hyperméthylation du promoteur MGMT sont associés à une meilleure survie des patients traités selon le protocole Stupp associant radiothérapie et chimiothérapie à base de témozolomide. Récemment, il a été mis en évidence la présence de cellules souches cancéreuses (CSCs) au sein des tumeurs de GBM (Singh et al., 2004). Ces CSCs présentent une résistance accrue aux traitements thérapeutiques et seraient responsables de la récurrence de la tumeur après la thérapie initiale. L'identification de marqueurs caractéristiques de ces cellules qui permettraient leur identification, leur isolement et leur ciblage thérapeutique est essentielle. En plus de la présence de ces CSCs, les GBM sont caractérisés par une forte hétérogénéité inter-tumorale qui contribue à l'échec des thérapies actuelles. Ce constat a mené à l'établissement de différents sous groupes de tumeurs établis selon leur expression génique (Phillips et al., 2006; Verhaak et al., 2010). L'objectif de notre étude était de caractériser des primocultures de GBM afin de mettre en évidence des différences moléculaires entre les sous-types de tumeurs pouvant être exploitées d'un point de vue thérapeutique.

#### **Principaux résultats :**

- Les primocultures de GBM sont très hétérogènes d'un point de vue cellulaire et moléculaire et reproduisent les caractéristiques morphologiques des tumeurs *in vitro*
- Les primocultures de GBM sont capables d'initier des tumeurs *in vivo* dans des modèles de xénogreffes orthotopiques chez la souris
- Le sous-type mésenchymal se différencie des autres sous groupes par un métabolisme glutaminergique couplé à l'OXPPOS
- Le sous-type mésenchymal peut être sensibilisé par l'EGCG, inhibiteur de la GDH, à la mort induite par l'étoposide

# **Mitochondrial glutamine oxidation is the Achilles' heel of CD133- mesenchymal glioma stem cells**

Running title : CD133<sup>-</sup> and glutamine metabolism, hallmarks of mesenchymal GBM cells

Lisa Oliver<sup>1,2,3\*</sup>, Kristell Oizel<sup>1,2\*</sup>, Emeline Brocard<sup>1,2</sup>, Cynthia Chauvin<sup>1,2</sup>, Ulrich Jarry<sup>1,2</sup>, Emmanuel Scottet<sup>1,2</sup>, Richard Redon<sup>5</sup>, Catherine Gratas<sup>1,2,3</sup>, Delphine Loussouarn<sup>4</sup>, François M. Vallette<sup>1,2,4</sup> & Claire Pecqueur<sup>1,2,6</sup>.

<sup>1</sup>CRCNA - INSERM UMR 892 - CNRS UMR 6299, Nantes 44007 France

<sup>2</sup>Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes 44007 France

<sup>3</sup>Centre Hospitalier-Universitaire (CHU) de Nantes, Nantes 44007 France

<sup>4</sup>Institut de Cancérologie de l'Ouest - René Gauducheau, St Herblain

<sup>5</sup>Institut du Thorax - Inserm UMR1087 CNRS UMR6291, Nantes 44007 France

<sup>6</sup>corresponding author [claire.pecqueur@univ-nantes.fr](mailto:claire.pecqueur@univ-nantes.fr)

\* These authors contribute equally to the work

## **Corresponding author**

**Claire Pecqueur,**

**INSERM UMR892/CNRS6299, CRCNA, Université de Nantes**

**8 quai Moncousu, 44007 Nantes, France**

**Phone : (33)2 2808 0325; Fax (33)2 2808 0204**

**email : [claire.pecqueur@univ-nantes.fr](mailto:claire.pecqueur@univ-nantes.fr)**

## **Abstract**

**Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common brain tumor in adults. Current treatment is resection (when possible) followed by radiotherapy and concomitant chemotherapy (temozolomide, TMZ). However, these tumors have been shown to be particularly resistant to therapy and refractory to cell death mechanisms. Consequently, the prognosis is very poor with a median survival with standard-of-care radiation and chemotherapy with TMZ of 15 months, and a 5-year survival inferior to 8%. Hence, the identification of predictive markers and development of more effective treatment strategies are urgently needed. Recent large-scale genomic analyses have identified distinct molecular signatures revealing subclasses within GBM. This molecular heterogeneity may underlie differences in patient sensitivity to therapy and prognosis. Tumor fragment from GBM patients were mechanically homogenized and the cells were grown under define media conditions maintaining the initial tumor cell heterogeneity. These primary cultures presented a gene-signature of the 3 GBM subtypes (proneural, proliferative and mesenchymal) and were phenotypically very diverse in terms of morphology, proliferation rate, and the expression of surface markers. All the primary cultures were resistant to cell death upon radiation (5 Gy), TMZ or etoposide treatment. Unexpectedly, the mesenchymal cultures were which are CD133-, are highly proliferative. In addition, these cultures also differ from the other subtypes based on the utilization of glutamine by the mitochondria. Finally, inhibition of mitochondrial glutamine metabolism specifically sensitizes these cells to etoposide-induced cell death.**

**In conclusion, the molecular classification of GBM might provide useful insights necessary for the development of more effective targeted therapeutics. Targeting tumoral metabolism might improve the outcome for specific subsets.**



## Introduction

Glioblastoma Multiforme (GBM), the highest grade of glioma are the most common and malignant type of primary brain tumor with an average survival at diagnosis of about 1 year (1). The current standard of care for patients with these tumor include resection followed by radiotherapy with concomitant and adjuvant chemotherapy with temozolomide (TMZ) as a first-line treatment (1) or with etoposide (VP16) for recurrent glioblastoma (2,3). However, the median overall survival of 14-16 months remains dramatically low. In addition to their diffuse and infiltrative nature making complete resection impossible, GBM are histologically and molecularly very diverse, exhibiting heterogeneity both between patients as well as within individual tumors. The only established GBM classification comprises *de novo* (primary) versus secondary GBM (derived from lower grade astrocytomas). Although both subtypes show characteristic genetic alterations, there are no clear-cut differences in terms of prognosis and response to therapy. However, the selection of patients based on reliable clinical, molecular and cell markers of the tumor may become a requisite in future trials/treatment regimens. For example, it has been shown that patients harboring a methylated O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) promoter, which would result in the silencing of this gene repair enzyme presented an increased survival after receiving the DNA alkylating agent TMZ compared to those with an unmethylated MGMT promoter (4–6). Interestingly, *in vitro* studies have shown that the MGMT methylation status might be altered with folate supplementation (7).

Despite the meaningful improvements in survival of GBM patients, emerging TMZ resistance is mediated through enhanced MGMT activity (8,9), acquired mismatch repair gene mutations (10,11) and the persistence of a rare population of cells harboring stem cell-like

properties, also called cancer stem cells (CSC) or tumor initiating cells (12). The CSC account for 1 to 30% of a given tumor and have been defined as CD133+ cells and are able to recapitulate the original *in vivo* tumor after orthotopic re-implantation, and even after serial transplantation. They also display the potential to differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes. In fact, these CSC have been implicated in the poor response to therapy (13) as well as GBM recurrence after standard therapy (14). Furthermore, the metabolic plasticity of CSC might drive GBM heterogeneity. Thus, understanding tumor heterogeneity and/or CSC biology will help design better therapies against GBM and may limit tumor recurrence. Recently, genomic and transcriptomic research efforts have delineated molecular subclasses of GBM associated with patient outcome along with response to therapy. A gene expression profile revealed that GBM can be subdivided into 3 subtypes based on patient prognosis and gene expression clustering: mesenchymal, proliferative and proneural (15). Subsequently, combined genomic and TCGA analysis by Verhaack *et al.* further subdivided the proliferative subtype in 2 distinct subclasses, classical and neural (16).

In the present work, we examine how the tumor molecular heterogeneity can be exploited to evaluate potential therapeutic targets. It has been shown that primary GBM cells cultured in serum-free medium were tumorigenic, presented multi-lineage differentiation potential and preserved the genotype of the original tumor while classical established cell lines exhibit phenotypic, genomic and molecular divergence from the initial tumors (17). Furthermore, this medium favors the growth and maintenance of CSC in contrast to medium supplemented with serum which causes irreversible differentiation of CSC (18). We confirmed that primary GBM cells cultured in serum-free medium exhibit a heterogeneity at both the cellular and the molecular level. We show that primary GBM cells cultured in serum-free medium growth as neurospheres presented a necrotic core, are tumorigenic and showed

multi-lineage differentiation potential. We validated the molecular heterogeneity at both the cellular and the molecular level of this model. Furthermore, we report that the mesenchymal glioma subtype characterized by the lack of CD133 expression exhibit a particular glutamine metabolism that can be targeted to induce cell death.

## **Materials and Methods**

### **Materials**

Unless stated otherwise, all cell culture material was obtained from Life Technologies (Cergy Pontoise, France) and chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Growth factors and cytokines were obtained from Peprotech (Neuilly-Sur-Seine, France).

### **Cell culture**

Human primary GBM cultures were derived from 16 patients diagnosed with high-grade GBM after informed consent of the patients (Table 1). GBM primary cultures were grown in defined medium (DMEM/Ham F12, 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) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. When needed, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (Sigma-Aldrich) was added at 110 µM or fetal calf serum at 10%. Culture media was changed every 2-3 days.

### **Cell treatments**

For cell death experiments, 0.5 x 10<sup>6</sup> cells were plated and treated the next day with 50 µg/mL etoposide (Mylan) for 24h, 500 ng/mL TRAIL (PreproTech) for 5h, 50µM témozolomide (Interchim) for 72h or with 5Gy irradiation. γ-Irradiation was carried out in a Faxitron CP160 irradiator (Faxitron X-ray Corporation). For inhibition of the glutaminolysis pathway, 0.5 x 10<sup>6</sup> cells were plated and treated the next day with 110µM EGCG for 6 days before cell death experiments.

### **Proliferation and cell death**

Cell number and viability were determined using the Countess optics and image automated cell counter (Life Technologies). Cells were mixed with trypan blue (1:1) and loaded into a Countess chamber slide. The image analysis software was used to automatically analyze the acquired cell images to give cell count and viability. Data were plotted either as the number of viable cells or as the percent of dead cells. Cell death by apoptosis was assessed either by measuring caspase 3 activity using the fluorogenic substrate Ac-DEVDAMC as described in (19) or by determining the percent of apoptotic cells using the NC-3000 (Chemometec).

### **Soft agar and limiting dilution assay**

For the soft agar assay, 800 primary GBM cells were resuspended in 0.35% soft agar and seeded on a 0.5% agar layer in a 6-well plate. EGCG was added in both the soft agar layer and the media, as indicated. After 3 weeks, the cultures were scanned using a Leica DMI6000B and the Metamorph program. Limiting dilution assay (LDA) were performed to determine the frequency of CSC. Final cell dilutions ranged from 200 cell per well to 1 cell per well. At day 7 and 14, the fraction of wells free of neurosphere for each cell plating density was determined. These results were plotted against the number of cells plated per well. The number of cells required to form one neurosphere, which reflects the frequency of CSC in the entire population, was determined as described in (20).

### **RT and qPCR**

Cells were washed twice in PBS, then total RNA was isolated using the Total RNA Nucleospin kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions including DNase I treatment. After RNA quantification using the Nano Drop (Nano Drop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), the RNA quality was checked using the Total RNA 6000 Nano kit and the Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent, CA, USA).

The RIN (RNA Integrity Number) was  $> 9$  in all cases. 1  $\mu\text{g}$  RNA was reverse transcribed using Maxima First strand cDNA synthesis kit (Fermentas, ThermoFischerScientific, MA, USA). Quantitative real-time PCR assays were performed using the qTOWER Quantitative PCR system (AnalyticJena AG, Jena, Germany). Reactions were performed in triplicate using the Perfecta Sybr Green FastMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD 20877), in a 10 $\mu\text{l}$  final volume with 10ng cDNA, and 0,3 $\mu\text{M}$  of each primer. A melting curve was performed in each experiment to insure the specificity of the reactions, and PCR efficiency, evaluated by standard curves, were  $>85\%$  in all cases. To normalize the data four housekeeping genes were used. The sequences of the primers are reported in supplementary data (Table S1). The data are reported as Ct normalized to the average expression of all housekeeping genes in all tested samples.

### **Flow cytometry and immunofluorescent staining**

GBM primary cells were dissociated, washed and either directly marked for surface marker, or fixed and permeabilized for intracellular protein staining. The cells were fixed 10 min with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.5% saponin.  $1 \times 10^5$  cells were labeled with SSEA1-Alexa488 (BD Pharmingen), CD133/1-APC (MACS, Myltenyi Biotec), CD90-PC5 (Beckman Coulter), CD44-APC (BD Pharmingen), DR4 (e-Bioscience), DR5 (e-Bioscience) antibody diluted in PBS-BSA 1% for 1 hour at 4°C. For non-coupled antibodies cells were incubated 1 hour at 4°C with Alexa-488-coupled secondary antibody (Life Technologies). Data acquisition was performed on a FACS calibur (Becton Dickinson). Data were analyzed using the Flow Jo software. For immunostaining, neurospheres were dissociated and spotted onto laminine-coated slides. The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized with 0.1% SDS for 10 minutes, blocked with 3% BSA for 20 min and incubated with primary antibody for 1 hour followed by Alexa-568-coupled secondary antibody incubation (Life Technologies) for 1 hour. Primary antibodies recognize GFAP

(Calbiochem, Darmstadt, Germany), Nestin (Millipore, Temecula, CA, USA), Olig2 (Abcam, Cambridge, UK) and  $\beta$ -Tubulin (Sigma-Aldrich). Cells were mounted in a medium containing Dapi (Life Technologies) to visualize nuclei. The staining was detected by epitome microscopy (Zeus Ax overt 200-M inverted microscope and Univision 4.6 program).

### **Biochemical analysis**

To evaluate the consumption of aminoacids (AA), their concentration in culture medium was measured by LC/MS/MS using the aTraq kit (ABSciex, MA, USA). This kit enable to label 45 AA with a mass tag. The AA were separated on 1220 Infinity HPLC system (Agilent, CA, USA) and analyzed with the 3200 QTrap system (AB-Sciex, MA, USA). The quantification of each AA was done using the Analyst software. Each AA has an internal standard labelled with a different mass tag therefore the concentration of the amino acid in the sample was easily calculated :  $(\text{area AA sample}/\text{area AA internal standard}) \times \text{concentration internal standard}$ . Internal and external quality controls were included during the process. Glutamine consumption was determined as the substraction of glutamine after 72 hours cultures to the amount of glutamine initially present in the medium. For glutamine utilization with BIOLOG analysis, cells ( $30 \times 10^3$ /well) were plated on the BIOLOG microarray PMM2 for 24 hours in IFM1 medium supplemented with glutamine (0.3mM) and glucose 0.5mM) if indicated. Cell growth was the recorded for 24 hours using a MTT-based reagent (Dye A).

### **Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular consumption rate (ECAR)**

Cells were plated at 40000 cells/well in 24-well XF (Extracellular Flux) cell culture microplate (Seahorse Bioscience, Copenhagen, Denmark) coated with laminin (1 $\mu$ g/ml) or with Cell Tak (1 $\mu$ g/ml). Oxygen consumption (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR), reflecting respectively mitochondrial oxidative metabolism and glycolysis, were measured using a XF24 Analyzer (Seahorse Bioscience) as described in (19). Determination of maximal OCR after oligomycin and CCCP injections allowed the calculation of the

mitochondrial spare capacity. Coupling efficiency corresponded to OCR inhibition by oligomycin. Mitochondrial respiration coupled to mitochondrial glutamine utilization was calculated as the difference between basal OCR and OCR after glutamine injection (2mM).

### **Orthotopic injections in NSG mice**

Six to twelve-week-old NSG mice were purchased from Charles River laboratories (Wilmington, MA). Mice were bred in the animal facility of the University of Nantes under specific pathogen-free status and manipulated according to institutional guidelines. The protocols were approved by the regional ethics committee of the Pays de la Loire (France). For orthotopic injections, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (10 µg/g) and xylazine (1 µg/g) and were placed in a stereotactic frame (Stoelting, Dublin, Ireland). The animals underwent an injection (0.5 µL/min) of 10 to 100 × 10<sup>3</sup> tumoral cells in 3 µL sterile PBS with a Hamilton syringe, 2 mm on the right of the medial suture and 0.5 mm in front of the Bregma, at a depth of 2.5 mm. Syringe was held in place for an additional minute and was slowly removed to avoid backfilling of the solution. Animals were daily observed and euthanized when characteristic symptoms occurred, such as reduced mobility and significant weight loss.

## **Results**

### ***GBM neurosphere retains tumor cellular heterogeneity***

Cells derived from 16 GBM were cultured under define medium condition and subsequently analyzed to validate these cells as suitable and relevant *in vitro* GBM models (Table 1). Under these conditions, half of the primary GBM cells grew as neurospheres in suspension. The other half of GBM cells grew as a mixture of adherent cells and neurospheres. These neurospheres were either in suspension or adherent (Fig. 1A). Phase contrast analyses of the

neurospheres showed a central and necrotic core (Fig. 1B). Expression of the neural progenitor marker Nestin, the astrocyte marker GFAP, the oligodendrocytic marker Olig2 and the neuronal marker Tuj was analyzed by immunofluorescence (Fig. 1C), FACS (Fig. 1D) and Western blot (data not shown) and revealed a cellular heterogeneity within these GBM primary cultures. All GBM primary cultures exhibit cytoplasmic Nestin expression. However, the respective proportion of GFAP, Olig2 and Tuj expressing cells varied from one GBM primary culture to another. Furthermore, GBM primary cells grown in presence of serum exhibited morphological changes characteristic of differentiated cells such as adherence, extension and loss of stemness marker expression (Fig. 1E and 1F). Expression of astrocyte (GFAP), oligodendrocyte (Olig2) and neuronal (Tuj) markers was significantly increased in cells cultured in the presence of serum compared to those in defined medium (GFAP  $p < 0.01$  ; Tuj  $p < 0.05$ ). Finally, global metabolism has been analyzed in GBM primary cells under these two conditions. All primary GBM cells analyzed exhibit a significant oxidative shift in presence of serum.

Finally, the tumorigenic potential of these primary cultures was assessed *in vivo* using an orthotopic mouse model. After intracranial injection of GBM primary cells in immunodeficient mice, the mice were monitored over a 6-months period. Several mice survival profiles have been observed depending on the GBM-primary cultures (Fig. 2A and Table 1). Some GBM cells were highly tumorigenic and led to a rapid loss of appetite and subsequent sacrifice of the mice within 50 days (GBM-1, GBM-10). Other mice presented neurological symptoms after a longer post intracranial-injection period and some mice were asymptomatic up to the end of the experiment. However, immune-staining using an MHC class I antibody to detect tumor cells in the brain 6-months following tumor cells injection showed the presence of a tumor even in asymptomatic mice (Fig. 2B, GBM-11 and GBM-13).



Thus, GBM primary cells maintained in define medium recapitulate several histopathological key features/hallmarks of solid tumor such as a cellular heterogeneity, a necrotic core and are highly tumorigenic.

### ***GBM neurospheres are resistant to various cell death inducers***

Besides cellular heterogeneity, GBM are also characterized by a molecular heterogeneity. In order to identify different molecular subtypes, transcriptomic analyses were performed on our GBM collection (Fig. 3A) and showed the presence of the 3 subtypes defined by Phillips et al., mesenchymal (n=5), proliferative (n=7) and proneural (n=4) (Table 1). Gene expression differences of BCAN, Olig2, CD133 and GFAP between subtypes were confirmed using qPCR analysis (Fig. 3B). All these genes were more expressed in the mesenchymal subtype compared to the other subtypes. However, whereas this analysis allowed the discrimination between the mesenchymal subtype from the other subtypes, it did not allow the discrimination between proliferative and proneural cells. Several parameters such as proliferation and sensitivity to various cell death inducers were measured to determine if this molecular classification reflected functional differences. The proliferative GBM subtype proliferated significantly slower than mesenchymal and proneural subtypes (Fig. 3C). Patients with GBM are usually treated with radiation and chemotherapy with temozolomide. However, only one proneural subtype (GBM-7) was sensitive to radiation but insensitive to TMZ. All the other primary GBM cells were resistant to both treatments (Fig. 3D and 3E). Other cell death inducers were also tested such as etoposide and TNFa-Related Apoptosis Ligand (TRAIL). Most of the primary GBM cells were resistant to etoposide-induced apoptosis except 2 GBM primary cells belonging to the mesenchymal subtype (Fig. 3F). The treatment leading to the highest number of sensitive GBM primary cells was obtained with TRAIL (Fig. 3G). Primary GBM cells expressed both Death Receptor 4 (DR4) and DR5. However, while all GBM

primary cells exhibited very strong DR5 expression, DR4 expression varied from a few percent to nearly 70% of DR4 expressing cells (data not shown). Furthermore, there was a significant correlation between DR4 expression and TRAIL sensitivity, independently of the GBM subtypes (Fig. 3G).

### ***Mesenchymal GBM cells are CD133<sup>-</sup>***

We previously showed that GBM primary cells expressed the stemness marker Nestin. To characterize more precisely the presence of CSC, limiting dilution assay (LDA) and analyses of GBM stem cell surface markers were performed such as CD90, CD44, CD133 and CD15. LDA showed that all GBM primary cultures contained in average 40% of stem cells, independently of the subtype (Fig. 4A). A single GBM primary culture exhibited expression of CD15 (GBM10 ; data not shown). In contrast, all the GBM primary cultures contained around 60% of CD44+ cells, with no significant differences in median fluorescence intensity (MFI) or between subtypes (Fig. 4B). Every cells of the proliferative GBM subtype expressed CD90 while both the proliferative and mesenchymal subtypes contains various amount of CD90+ cells (Fig. 4C). Finally, a striking difference was observed with expression of CD133 between the different subtypes. Indeed, while the proliferative and proneural subtypes contained a percent of CD133+ cells ranging from a few percent to 50%, all of the mesenchymal GBM primary cells expressed very few or no CD133+ cells (Fig. 4D).

### ***Glutamine sustains mitochondrial respiration in mesenchymal GBM cells***

The metabolism of GBM primary cells were characterized using the Seahorse technology. Most of the GBM primary cultures exhibited an overall slow metabolism (Fig. 5A). Indeed, both oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR), reflecting respectively mitochondrial oxidative phosphorylation and glycolysis, were below 200

pmoles/min/40000 cells for OCR and 10mpH/min/40000cells for ECAR. However, a few GBM primary cells exhibited a singular metabolism with one GBM culture presenting a very high mitochondrial metabolism and 3 other GBM cultures exhibiting both a high mitochondrial metabolism and a high glycolytic rate. However, despite these particularities, there was no correlation between metabolism and the subtype or the morphology of the cultures (adherent versus neurospheres) (Fig. 5A and 5B). Of note, similar results were observed when measurements were recorded from cells plated on laminin or directly from neurospheres (data not shown). In addition to basal OCR and ECAR parameters, the coupling efficiency as well as the maximal respiration rate were calculated after addition of oligomycin, an ATP synthase inhibitor, and CCCP, a mitochondrial uncoupler, respectively (Supplementary Fig. 1A and B). Mitochondrial coupling efficiency reflects the efficiency of mitochondria to convert oxygen in ATP whereas determination of maximal respiration rate allows the calculation of mitochondrial spare capacity. No difference in coupling efficiency nor in mitochondrial spare capacity was observed between GBM primary subtypes. However, it was quite surprising to observe that a very weak mitochondria spare capacity was observed in all GBM primary cells. Next, we investigated if the cells were consuming any particular amino acids by LC/MS-MS analysis. Interestingly, mesenchymal GBM cells consumed 3-times more glutamine than the other subtypes (Fig. 5D). These results were confirmed with the Biolog technology which allowed a metabolic profiling of the cells. Indeed, mesenchymal GBM cells were able to metabolized glutamine unlike the other subtypes, in presence or in absence of glucose (Fig. 5D and Supplementary Fig. 1C). Expression of several proteins involved in cellular glutamine metabolism were analyzed by western blot including glutamine transporters SLC1A5 and ASCT2, glutaminase (GLS), glutamate dehydrogenase (GDH) and glutamine oxalate transaminase (GOT2). However, no difference was observed in the expression of all these proteins except a slight increased in GLS expression in mesenchymal

primary cells compared to other cell subtypes (Fig. 5E). In order to characterize further glutamine metabolism in these cells, oxidative phosphorylation coupled to glutamine metabolism was measured in the various subtypes (Fig. 5F). Interestingly, all mesenchymal GBM cells increased OCR when glutamine was added in the medium in contrast to other subtypes. Altogether, these results showed that mesenchymal subtype is characterized by a singular mitochondrial metabolism based on glutamine utilization.

### ***Inhibition of mitochondrial glutamine metabolism sensitizes GBM cells to cell death***

The next question was to determine if this particular metabolism could be targeted in order to either reduce tumor cell progression or induce tumor cell death. Since mesenchymal GBM cells can be discriminated from the other subtypes through mitochondrial glutamine utilization, we treated the cells with EGCG, a polyphenol previously described as an inhibitor of GDH (21). These cells were treated with EGCG for 24 hours and glutamine coupled OCR was determined. The presence of EGCG in the medium prevented an increase in OCR after glutamine addition as shown in Fig. 6A. The effect of EGCG on cell proliferation and cell death was then evaluated. No difference in global cell proliferation was noted after 3 days of EGCG treatment (data not shown). Cells at low density were then plated on soft agar, grown for 3 weeks in the presence or in the absence of EGCG and the number and the size of colonies were measured (Fig. 6B, left panel GBM-1). Colonies size distribution was unchanged between the 2 conditions in all the primary GBM tested. However, the number of colonies were significantly decreased in presence of EGCG in the mesenchymal GBM cells (Fig. 6B) whereas EGCG had no effect on other subtypes. In order to determine if the decreased number of colonies could be explained by a decreased in stem cells abundance, Nestin and differentiation markers expression was analysed by FACS in presence of EGCG for 3 days. No difference was observed between EGCG treated cells and control cell (Fig.

6C). Finally, several cell death inducers were tested. Interestingly, while EGCG did not affect cell death sensitivity of non-mesenchymal GBM primary cells, a significant increase of etoposide-induced DEVDase activity was observed in all mesenchymal GBM primary cells (Fig. 6D).

## **Discussion**

GBM is a devastating disease for which there is no curative treatment. A better understanding of tumor biology is crucial for the progress and improvement of current treatments. Tumor cell heterogeneity is a well-recognized hallmark of solid tumor including glioblastoma, and plays a crucial role in tumor growth, metastasis, angiogenesis and tumor resistance. In our studies, we showed that primary cultures derived from patient tumor fragment and grown in defined medium retain tumor heterogeneity at both the cellular and the molecular level. Furthermore, cell organization in neurosphere recapitulates, at least in part, the complex architecture of a solid tumor with interaction with adjacent cells, and several histo-morphological properties of solid tumor such as a central necrotic core. Development of these cellular pseudo 3D models represent an interesting alternative to the *in vivo* model and might improve clinical and research studies in the cancer field.

Numerous publications report that the poor response of patients to the actual treatment, namely the Stupp protocol based on radiation and chemotherapy with TMZ, as well as the recurrence of the tumor after therapy can be mediated by the persistence of a rare population of cells harboring stem cells-like properties. Besides being involved in tumor heterogeneity, these cells are known for their enhanced mismatch repair system, expression of ABC efflux pumps and their resistance to various cell death inducers. Survival after GBM might then involve complete eradication of this population. In GBM, these cells have been mostly defined as CD133+ cells. In our models, mesenchymal GBM primary cells contain a

subpopulation of cells with stem cells-like properties as the other subtypes. However, the cells of this subtype did not express the CD133 marker. This result is in agreement with a previous report showing the lack of CD133 expression in some GBM (22). Furthermore, recent publications have shown that CD133- cells exhibit stem cells-like properties similar to CD133+ cells (23–25).

In addition to glucose addiction, the involvement of glutamine metabolism in tumor cells has received increasing attention in the past years. Several studies have shown that inhibiting one of the two key enzymes involved in glutaminolysis, glutaminase or GDH, suppresses cancer cell proliferation and growth (26–28). Consequently inhibiting glutamine metabolism is an attractive target to improve therapeutic strategy. In this study, we investigate the link between metabolism and resistance to cell death. We show that in cells where glutamine metabolism is coupled to mitochondrial oxidative metabolism, pharmacological impairment of glutamine metabolism promotes apoptosis. However, a recent metabolic flux analysis of <sup>13</sup>C-labeled nutrients in human orthotopic tumor models challenge both aerobic glycolysis and glutamine catabolism by cancer cells (29). In this study, glutamine catabolism was undetectable in orthotopic GBM or in primary cells isolated from these tumors. However, the fact that only 3 orthotopic tumors were tested in this study might be a limitation. Indeed, among the 16 GBM primary cultures tested in our study, only 5 of them exhibited glutamine catabolism coupled to mitochondrial respiration, each of which belong to the mesenchymal subtype. This proportion of mesenchymal subtypes accounts for roughly 30% of all GBM is consistent with other studies (15,16,30). Thus, only a restrictive number of tumors might exhibit an oxidative metabolism sustained by glutamine.

Subtype assignment of our GBM primary cultures based on the molecular classification proposed by Phillips *et al.* highlights some functional differences between the subtypes. Mesenchymal subtype is characterized by a high proliferation rate, in agreement

with its known aggressiveness in patient, presence of stem-like cells lacking CD133 expression and glutamine catabolism coupled to mitochondrial oxidative phosphorylation. In clinic, PET imaging using  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose is routinely used to detect tumors. Recently, PET imaging using a fluoro glutamine analogue reveal the presence of tumor in a mouse model of glioma xenograft (31). Thus, glutamine metabolism could be used to discriminate mesenchymal subtypes from the other subtypes. Since this metabolism can be targeted to promote tumor cell death. This opens a new window toward a personalized medicine where metabolic inhibitors could be combined to current treatment in order to improve survival outcome. Another study shows that a compensatory glutamine metabolism regulated through mTORC1 might be associated with a resistance to treatment (32). These results combined with our studies might shed some light onto why mesenchymal cells are refractive to treatment. The mesenchymal profile has been associated with an increased susceptibility to oxidative stress in lung (33) and clinical outcome in GBM (15). Metabolic fingerprints have also been associated with cell survival in lymphoma (34) as well as drug sensitivity to metabolic inhibitors in pancreatic adenocarcinomas (35). However, whether these classifications reflect different types of tumors (one tumor = one subtype or mix of different subtypes within the same tumor) remains an open question. In fact, a recent study showed that different samples obtained from the same tumor can be classified into different subtypes (36). In addition, other factors such as tumor microenvironment (stroma, hypoxia) influence sensitivity and adaptation of tumor cells. The surviving cell population after therapy probably corresponds to an heterogeneous populations of malignant cells with various genetic aberrations and metabolic adaptations that allow them to survive the initial treatment. Thus, if the establishment of tumor molecular classification provides an unique opportunity to evaluate potential therapeutic drugs in relation to functional and molecular features of tumor cells, the development of personalized treatment needs to be based on multimodal approaches.

## **Acknowledgements**

We thank Philippe Hulin from the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) for expert technical assistance in the acquisition of imaging data.

## **Funding**

This work was supported by grants from “La Ligue contre le Cancer”, “Region-Pays de la Loire” and LABEX IGO.

## **Conflict of interest.**

The authors declare no conflict of interest.



## References

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987–96.
2. Terasaki M, Bouffet E, Katsuki H, Fukushima S, Shigemori M. Pilot trial of the rate of response, safety, and tolerability of temozolomide and oral VP-16 in patients with recurrent or treatment-induced malignant central nervous system tumors. *Surg Neurol*. 2008 Jan;69(1):46–50.
3. Jeremic B, Grujicic D, Jevremovic S, Stanisavljevic B, Milojevic L, Djuric L, et al. Carboplatin and etoposide chemotherapy regimen for recurrent malignant glioma: a phase II study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1992 Jul;10(7):1074–7.
4. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):997–1003.
5. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009 May;10(5):459–66.
6. Martinez R, Schackert G, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Herman JG, Esteller M. Frequent hypermethylation of the DNA repair gene MGMT in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2007 May;83(1):91–3.
7. Hervouet E, Debien E, Champion L, Charbord J, Menanteau J, Vallette FM, et al. Folate supplementation limits the aggressiveness of glioma via the remethylation of DNA repeats element and genes governing apoptosis and proliferation. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009 May 15;15(10):3519–29.
8. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000 Nov 9;343(19):1350–4.
9. Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, et al. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Aug 1;10(15):4933–8.
10. Friedman HS, Johnson SP, Dong Q, Schold SC, Rasheed BK, Bigner SH, et al. Methylator resistance mediated by mismatch repair deficiency in a glioblastoma multiforme xenograft. *Cancer Res*. 1997 Jul 15;57(14):2933–6.
11. Liu L, Taverna P, Whitacre CM, Chatterjee S, Gerson SL. Pharmacologic disruption of base excision repair sensitizes mismatch repair-deficient and -proficient colon cancer cells to methylating agents. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1999 Oct;5(10):2908–17.

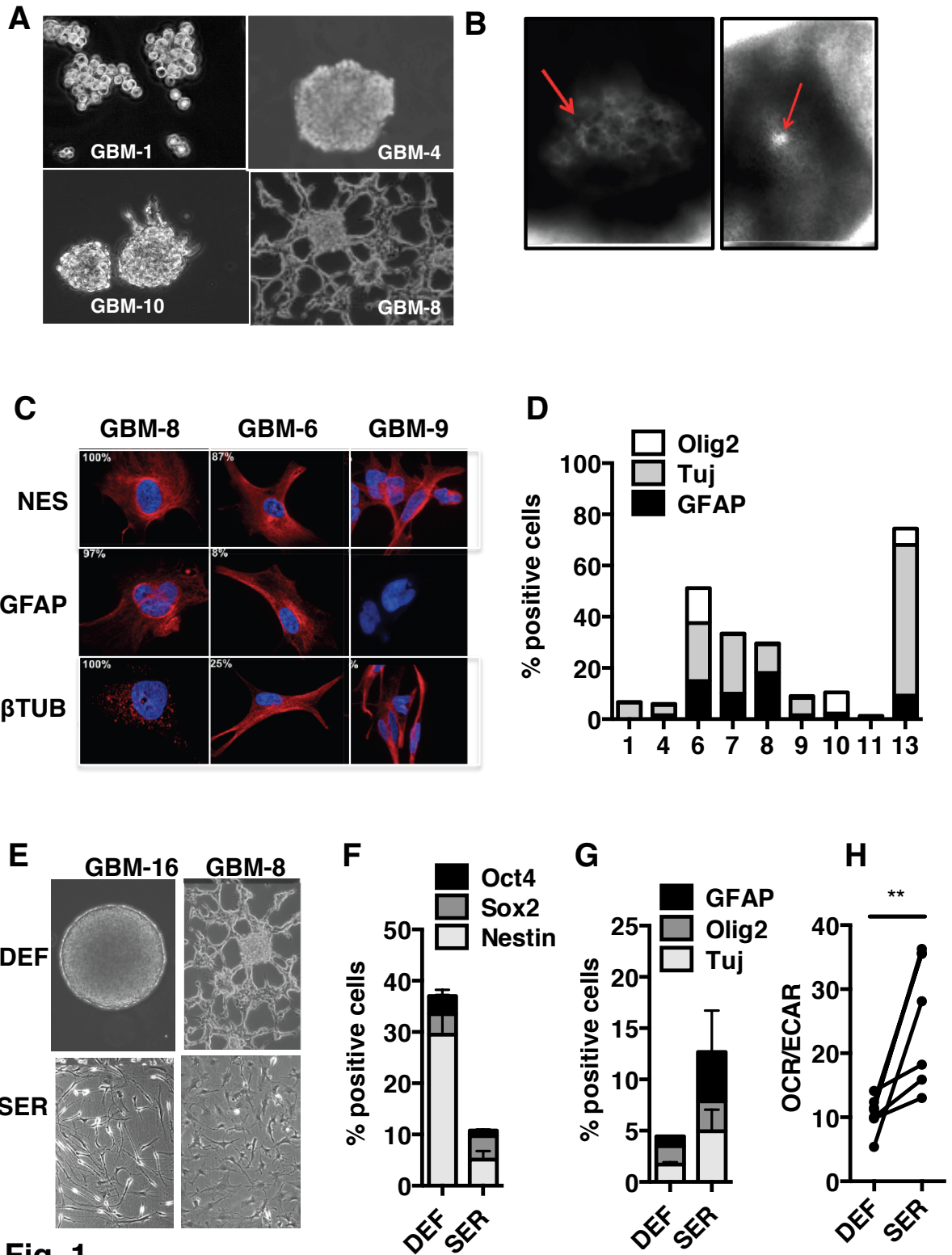
12. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):396–401.
13. Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, et al. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ*. 2006 Jul;13(7):1238–41.
14. Chen J, Li Y, Yu T-S, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*. 2012 Aug 23;488(7412):522–6.
15. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*. 2006 Mar;9(3):157–73.
16. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98–110.
17. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, et al. 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*. 2006 May;9(5):391–403.
18. McKay R. Stem Cells in the Central Nervous System. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):66–71.
19. Oizel K, Gratas C, Nadaradjane A, Oliver L, Vallette FM, Pecqueur C. D-2-Hydroxyglutarate does not mimic all the IDH mutation effects, in particular the reduced etoposide-triggered apoptosis mediated by an alteration in mitochondrial NADH. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1704.
20. Hu Y, Smyth GK. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J Immunol Methods*. 2009 Aug 15;347(1-2):70–8.
21. Li M, Allen A, Smith TJ. High throughput screening reveals several new classes of glutamate dehydrogenase inhibitors. *Biochemistry (Mosc)*. 2007 Dec 25;46(51):15089–102.
22. Zarkoob H, Taube JH, Singh SK, Mani SA, Kohandel M. Investigating the Link between Molecular Subtypes of Glioblastoma, Epithelial-Mesenchymal Transition, and CD133 Cell Surface Protein. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 May 29 [cited 2015 Aug 6];8(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3667082/>
23. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res*. 2007 May 1;67(9):4010–5.
24. Wang J, Sakariassen PØ, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Bøe SO, Svendsen A, et al.

CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2008 Feb 15;122(4):761–8.

25. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2010 Apr 13;17(4):362–75.
26. Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV, et al. Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res*. 2010 Nov 15;70(22):8981–7.
27. Yang C, Sudderth J, Dang T, Bachoo RM, Bachoo RG, McDonald JG, et al. Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Res*. 2009 Oct 15;69(20):7986–93.
28. Wang J-B, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, et al. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*. 2010 Sep 14;18(3):207–19.
29. Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T, Cho S, Baek H, Yang X-L, et al. Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell Metab*. 2012 Jun 6;15(6):827–37.
30. Kim Y-W, Koul D, Kim SH, Lucio-Eterovic AK, Freire PR, Yao J, et al. Identification of prognostic gene signatures of glioblastoma: a study based on TCGA data analysis. *Neuro-Oncol*. 2013 Jul;15(7):829–39.
31. Venneti S, Dunphy MP, Zhang H, Pitter KL, Zanzonico P, Campos C, et al. Glutamine-based PET imaging facilitates enhanced metabolic evaluation of gliomas in vivo. *Sci Transl Med*. 2015 Feb 11;7(274):274ra17.
32. Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Takata K, Nagashima H, Satoh N, et al. Compensatory glutamine metabolism promotes glioblastoma resistance to mTOR inhibitor treatment. *J Clin Invest*. 2015 Apr;125(4):1591–602.
33. Ulanet DB, Couto K, Jha A, Choe S, Wang A, Woo H-K, et al. Mesenchymal phenotype predisposes lung cancer cells to impaired proliferation and redox stress in response to glutaminase inhibition. *PloS One*. 2014;9(12):e115144.
34. Caro P, Kishan AU, Norberg E, Stanley IA, Chapuy B, Ficarro SB, et al. Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2012 Oct 16;22(4):547–60.
35. Daemen A, Peterson D, Sahu N, McCord R, Du X, Liu B, et al. Metabolite profiling stratifies pancreatic ductal adenocarcinomas into subtypes with distinct sensitivities to metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jul 27;
36. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 5;110(10):4009–14.

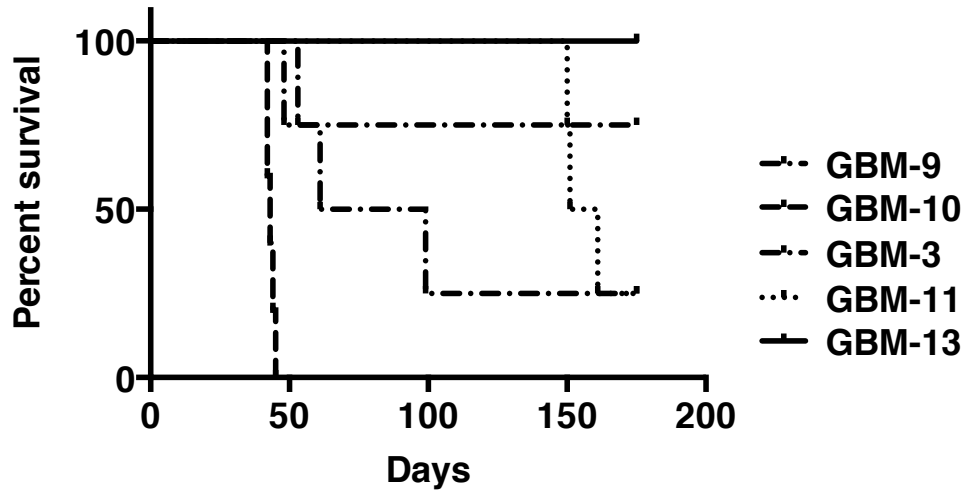
<b>Tumor</b>	<b>Age</b>	<b>Grade</b>	<b>Treatment</b>	<b>IDH<sup>mt</sup></b>	<b>MGMT</b>	<b>Survival</b>
GBM1		GBM IV				
GBM4	68	GBM IV		WT	Me	
GBM8	35	GBM IV		WT	no	
GBM11	70	GBM IV		WT		
GBM12	49	GBM IV			no	
GBM3	79	GBM IV		WT		
GBM6	72	GBM IV	RT+TMZ		Me	
GBM10		GBM IV				
GBM16	63	GBM IV	RT+TMZ		Me	
GBM14	68	GBM IV			no	
GBM2	73	GBM IV		WT		
GBM13	59	GBM IV		WT		
GBM5	66	GBM IV	RT+TMZ		no	
GBM7	64	GBM IV	RT+TMZ		no	
GBM9	67	GBM IV	RT+TMZ		Me	
GBM15	49	GBM IV	RT+TMZ			

**Table 1**

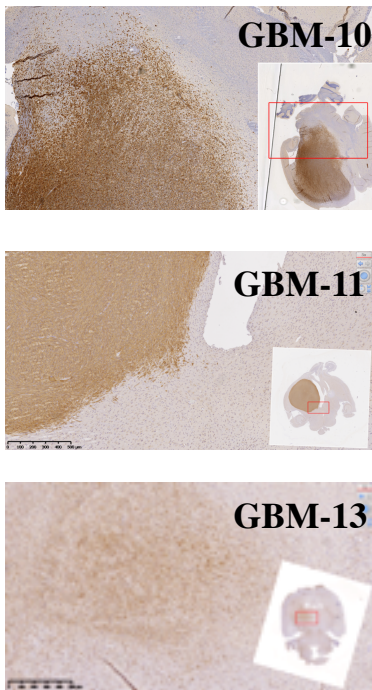


**Fig. 1**

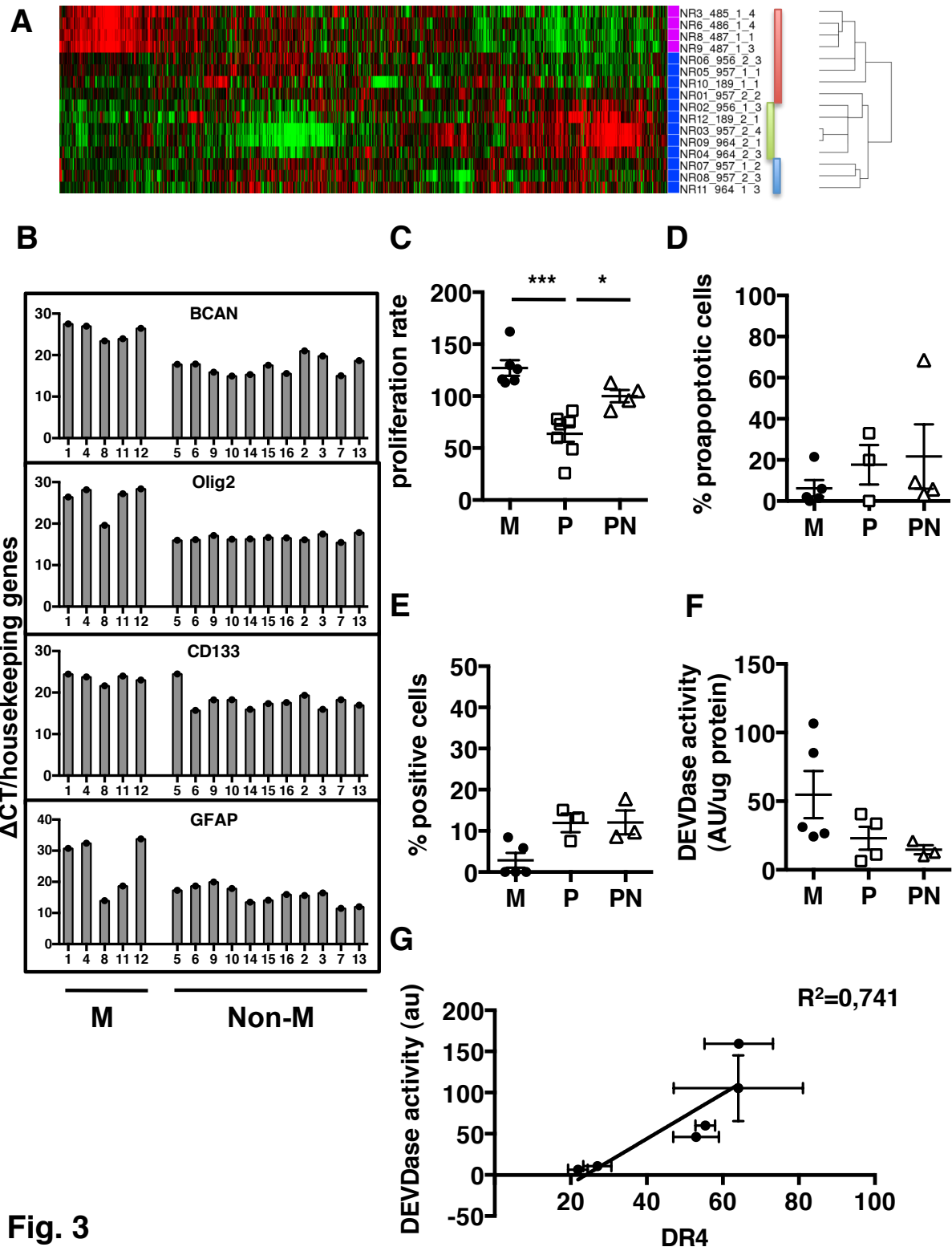
**A**



**B**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

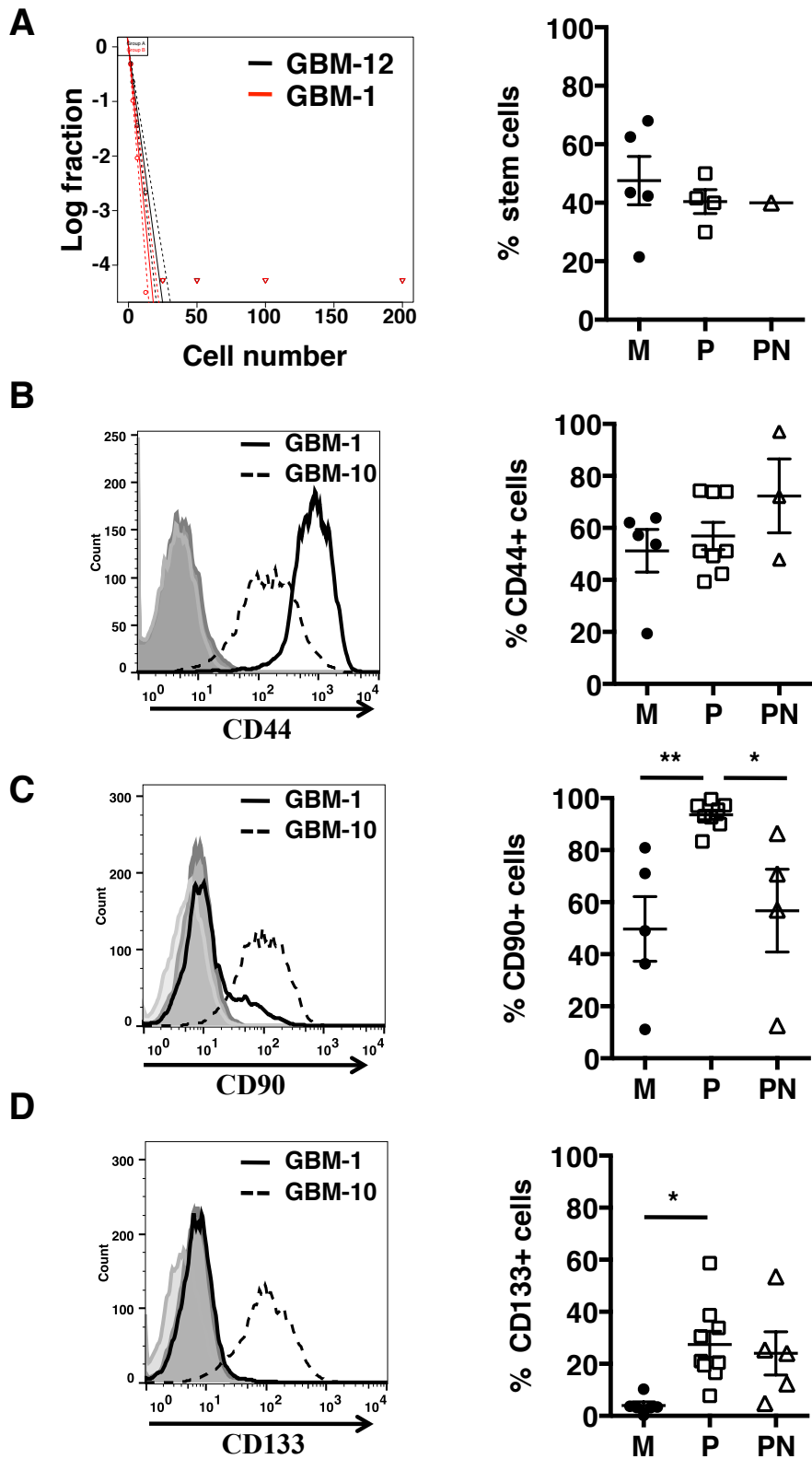


Fig. 4



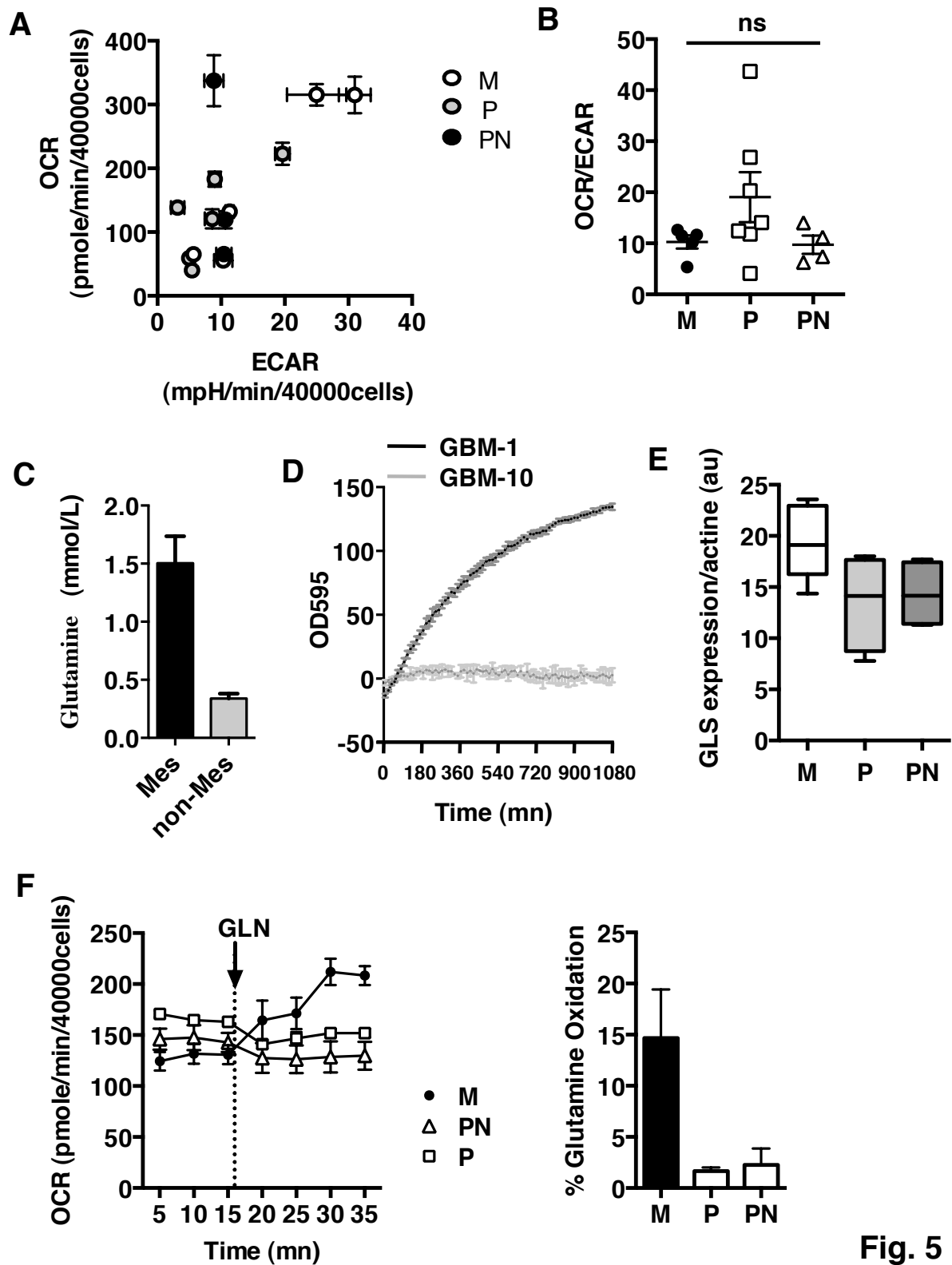
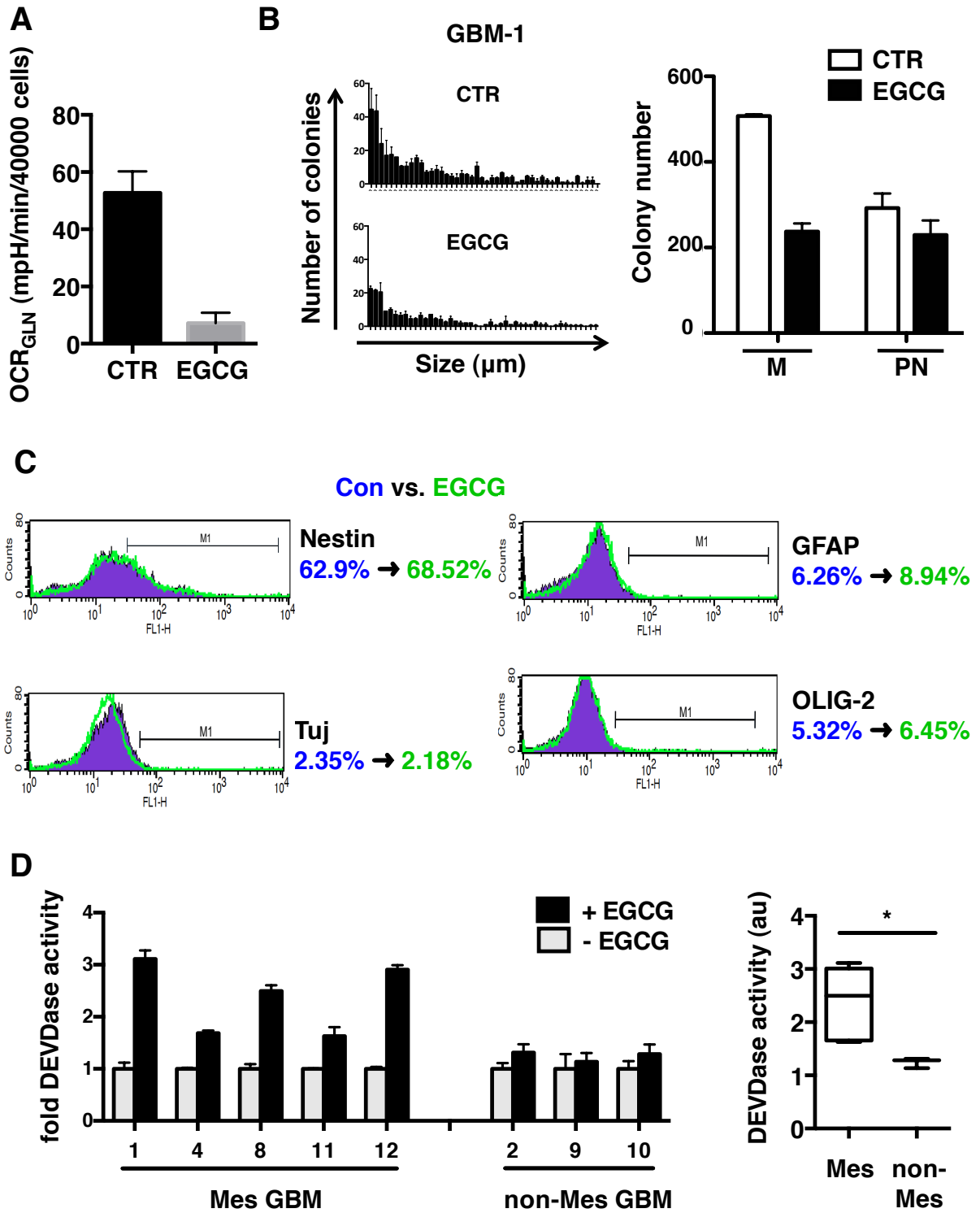
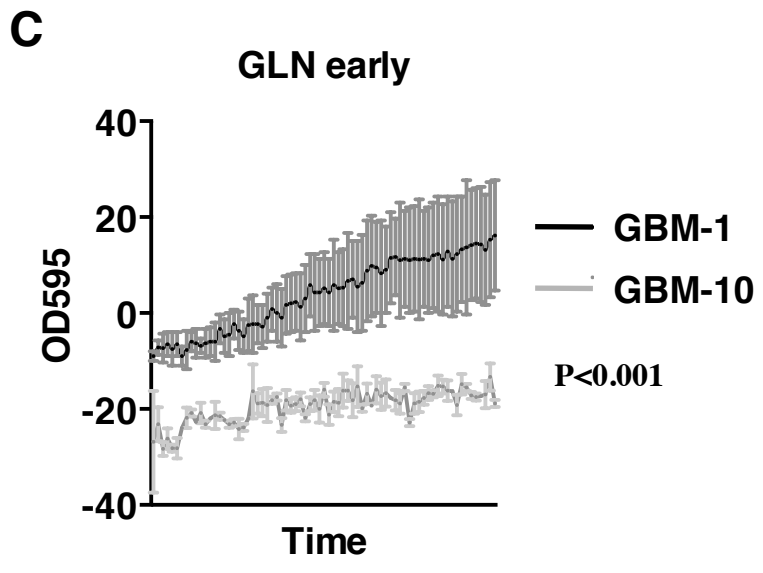
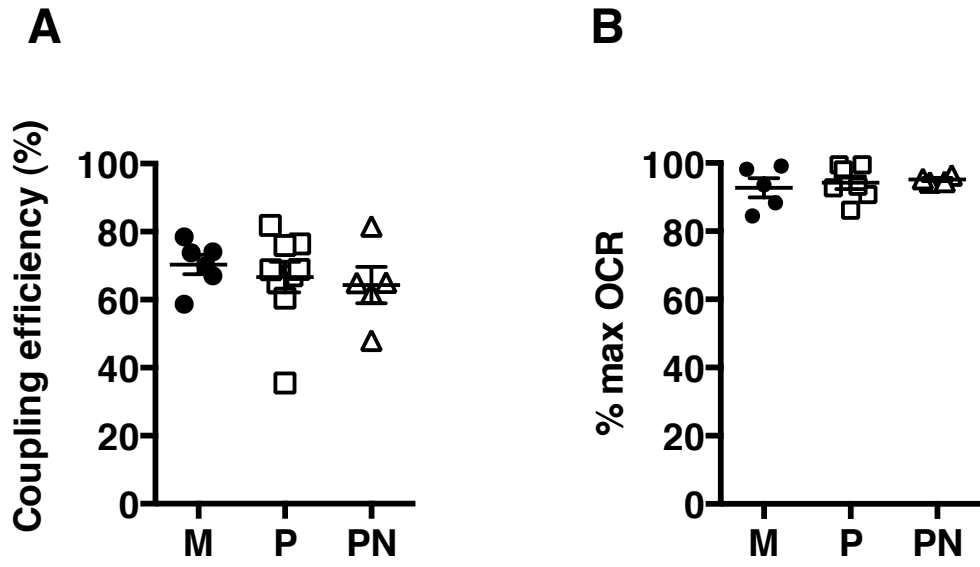


Fig. 5



**Fig. 6**



Supplementary 1

BCAN	For : GGACGCTCCTAGAATTTGAAACAC Rev : CACAGAGCCTCATCCTCCAC
CD133	For : AGACCCAACATCATCCCTGT Rev : TTTGTTGGTGCAAGCTCTTC
OLIG 2	For : ACAGAACCCCCAAATAACCC Rev : GAAACTACCCACCGACTCA
GFAP	For : CGATCAACTCACCGCCAACAG Rev : ACTCAATCTTCCTCTCCAGATCCA
S28	For : TTGTGACAGACCATTCCC Rev : TTTTGGAGTCAGAGCGAG
RPLPO	For : GATTACACCTTCCCCTTGCT Rev : TAGTCAAAGAGACCAAATCCCA
TATA	For : CAAGAGTGAAGAACAGTCCAG Rev : ACAAGGCCTTCTAACCTTATAGG
GAPDH	For : GAAGGTGAAGGTCGGAGTC Rev : GAAGATGGTGATGGGATTC

**Table S1 Primers listing**

## Tables and Figure legends

### Table 1 : Patient characteristics and corresponding GBP primary cells

The morphology of cells was annotated after the first passage in defined medium.

### Fig. 1 : Primary cultures of GBM in define media retains initial tumor heterogeneity

**A/** Non-adherent and Adherent neurosphere with phase-contrast microscopy of primary cultures (white field images x20). **B/** Images of neurospheres using phase contrast microscopy. **C/** Immunostaining of Nestin (NES), GFAP and Tuj (bTUB) in primary cultures plated on laminin (left panel). **D/** FACS analysis of primary cultures is shown on the right after GFAP, Olig2 and Tuj staining. **E/** Images with phase-contrast microscopy of primary cells in defined medium (DEF) and in presence of 10% sérum (SER). **F/** Quantification of high-throughput imaging (HTS) after immunofluorescence staining for the stemness markers Oct4, Sox2 and Nestin in define media or after serum exposure (3 weeks). Results were significantly different for Nestin ( $p < 0.0001$ ). Statistics were performed using one-way Anova. **G/** Quantification as in (F) after immunfluorescent staining for the neuronal marker Tuj, the oligodendrocyte marker Olig-2 and for the astrocyte marker (GFAP) in defined medium (DEF) or after serum exposure (SER) (3 weeks). Results were significantly different for GFAP ( $p < 0.01$ ) and Tuj ( $p < 0.05$ ). Statistics were performed using one-way Anova. **H/** Global metabolism shown as the ratio OCR/ECAR using Seahorse technology.

### Fig. 2 : Orthotopic injection of primary GBM cells

**A/** Mice survival after intracranial injection of primary cells cultures. **B/** Immunochemistry of GBM tumors after resection using an antibody against humanMHC-I.

### **Fig. 3 : Molecular characterization and cell death sensitivity of primary GBM cell**

**A/** Molecular subtypes of primary GBM cultures were determined using transcriptomic analysis. **B/** Expression levels determined by q-PCR of BCAN, Olig2, CD133 and GFAP in our primary GBM cultures. **C/** Proliferation was assessed using MTT on laminin-coated plates. **D/** Cell death was measured 72 hours after irradiation (5Gy). Results are presented as percent of positive cells in pro-G0 phase. **E/** Cell death was measured 72 hours after TMZ (50 $\mu$ M) exposure. Results are presented as percent of positive cells using Trypan blue exclusion. **F/** Apoptosis was measured 24 hours after etoposide (50 $\mu$ g/mL) exposure. DEVDase activity was analyzed using a DEVD-AMC substrate. **G/** Correlation between DR4 expression and TRAIL (500ng/mL) sensitivity ( $r^2=0,741$ )

### **Fig. 4 : Mesenchymal GBM stem cells are CD133<sup>+</sup>**

**A/** Stem cells enrichment in the different subtypes was determined using the limiting dilution assay (LDA). FACS analysis of CD44 (**B**), CD90 (**C**) and CD133 (**D**) expression in the different molecular subtypes of primary GBM cultures.

### **Fig. 5 : Increased glutamine metabolism in mesenchymal GBM cells**

**A/** Balance between mitochondrial oxidative phosphorylation (OCR) and glycolysis (ECAR) using Seahorse technology. **B/** Global metabolism determined as the ration OCR/ECAR determined in (A). **C/** Glutamine consumption of primary GBM cells was calculated from glutamine measurement from media after 72h of culture compared to media without cells. **D/** Glutamine utilization was recorded over time using the Biolog technology. **E/** Expression of glutaminase (GLS) was measured based on western blot after normalization with actin. **F/** Mitochondrial respiration coupled to glutamine utilization ( $OCR_{GLN}$ ) was measured in primary

GBM cells using Seahorse technology.  $OCR_{GLN}$  was calculated from the subtraction of basal OCR to OCR after glutamine injection.

**Fig. 6 : Inhibition of  $OCR_{GLN}$  sensitizes mesenchymal GBM cells to etoposide-induced cell death**

**A/** EGCG inhibits mitochondrial respiration fueled with glutamine.  $OCR_{GLN}$  was calculated as described in Fig.5F 24 hours after EGCG (110 $\mu$ M) exposure. **B/** Inhibition of colony formation with EGCG. Cells were plated in soft agar and treated for 3 weeks with EGCG (110 $\mu$ M). The number of colony was calculated by time lapse analysis. **C/** Differentiation profile after 5 days of EGCG (110 $\mu$ M) treatment. Expression of the stemness marker Nestin and differentiation markers GFAP, Olig2 and Tuj was analyzed by FACS. **D/** Etoposide-induced apoptosis was assessed 6 days after EGCG (110 $\mu$ M) treatment by measuring the DEVDase activity.

**Supplementary 1 :**

Coupling efficiency (A) and mitochondrial respiration expressed as % of maximal respiration (B) of primary GBM cells. Glutamine utilization in absence of glucose recorded over time using the Biolog technology (C).

# **DISCUSSION GENERALE**



## **IV. Discussion Générale**

Les GBM sont la forme la plus fréquente et la plus agressive des tumeurs cérébrales chez l'adulte. En 2005, le témozolomide a été inclus dans le protocole de thérapie des GBM en traitement concomitant et adjuvant à la radiothérapie ce qui a permis une augmentation de la survie des patients à 2 ans (Stupp et al., 2005). Cependant, ce gain de survie reste très faible avec moins de 11% des patients survivants à 5 ans (Preusser et al., 2011). Ce faible pronostic pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité tumorale entre patients ainsi qu'au sein d'une même tumeur. Ainsi entre patients, les différences d'expression d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs induisent une hétérogénéité de réponse à un même traitement. Par exemple, les patients présentant une hyperméthylation du promoteur de la MGMT sont plus sensibles au témozolomide et ont un meilleur pronostic de survie (Stupp et al., 2009). De plus, au sein d'une même tumeur, coexistent des cellules plus ou moins différenciées et notamment des cellules souches cancéreuses très résistantes au traitement. Cette population serait, au moins en partie, responsable de la récurrence de la tumeur après la thérapie initiale.

Lors de ma thèse, je me suis intéressée à la relation entre le métabolisme et la sensibilité à la mort cellulaire dans le GBM. Nous avons étudié différentes voies métaboliques via la mutation d'enzymes comme IDH et via des inhibiteurs de la glutaminolyse. Ces études ont été menées à la fois à partir de lignées humaines de gliome mais également de primocultures établies à partir de prélèvements tumoraux issus de patients. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une corrélation étroite entre métabolisme et sensibilité à différents inducteurs de mort dans ces deux modèles cellulaires.

### **Pertinence des modèles d'étude**

Les différents projets menés au cours de ma thèse ont fait appel à l'utilisation de lignées et de primocultures de GBM. L'utilisation de primocultures cultivées en milieu défini, c'est à dire en absence de sérum mais en présence de facteurs de croissance, permettent de conserver les différents types cellulaires initialement présents au sein de la tumeur. Nous avons ainsi montré, au sein de nos primocultures, la présence de cellules à caractère souche capables de s'autorenouveler sous forme de neurosphères et de se différencier en différents sous-types cellulaires lorsqu'elles sont cultivées en présence de sérum. De plus, ces

neurophères recréent *in vitro* un modèle pseudo-3D reproduisant les caractéristiques morphologiques de la tumeur comme le cœur nécrotique. Enfin, ces cellules sont également capables d'initier des tumeurs lorsqu'elles sont implantées chez des souris immunodéficientes. Il a été montré que les primocultures conservent un génotype très proche de celui de la tumeur dont elles sont issues et ce même après plusieurs passages (Lee et al., 2006). De plus, elles sont capables de reproduire une tumeur *in vivo* présentant le même phénotype que la tumeur originale. Cependant, nous avons observé dans l'équipe la perte de la mutation *IDH* présente chez le patient après mise en culture des cellules *in vitro*. Cette observation a d'ailleurs été observée par d'autres équipes qui montraient que cette mutation n'était conservée que dans de rares cas de xénogreffes chez la souris sans mise en culture *in vitro* préalable (Navis et al., 2013). Si l'hétérogénéité cellulaire des primocultures est un avantage puisqu'elle reflète au mieux la tumeur des patients, elle constitue également une limite. La compréhension des voies de signalisation et de sensibilité aux traitements est compliquée par la diversité de réponses des différentes sous-populations cellulaires présentes dans la primoculture. De plus, ces primocultures forment des neurosphères *in vitro* les rendant plus difficiles à manipuler que les lignées cellulaires. En effet, la dissociation de ces neurosphères fragilise les cellules et entraîne un faible pourcentage de mort.

Si contrairement aux primocultures, les lignées possèdent un génome très instable, acquérant de nouvelles mutations au cours des passages cellulaires successifs, elles permettent de s'affranchir de l'hétérogénéité des primocultures (Lee et al., 2006). Les lignées cellulaires, établies en milieu supplémenté en sérum, sont un bon modèle pour étudier précisément les mécanismes cellulaires mis en place par les cellules cancéreuses et les effets biologiques de nouveaux traitements. De plus, ces lignées sont facilement transfectables et permettent de palier à l'absence de modèle exprimant la mutation *IDH*. Ainsi nous avons étudié l'effet de la mutation *IDH* dans des lignées après transfection stable.

Enfin, si le modèle des primocultures permet de se rapprocher phénotypiquement de la tumeur du patient, celles-ci ne sont plus sous l'influence du microenvironnement. En effet, au sein de la tumeur, l'hypoxie et les signaux générés par les cellules du microenvironnement tumoral telles que les cellules endothéliales contrôlent l'expression génique des cellules cancéreuses. Notamment ces facteurs permettent le maintien du phénotype souche des CSCs via l'activation par exemple des voies Notch et Sonic Hedgehog. Des échanges de substrats entre les cellules cancéreuses et les cellules du microenvironnement existent également. Les

cellules stromales peuvent par exemple excréter du lactate qui sera incorporé par les cellules tumorales en tant que source d'énergie (Pavlides et al., 2009). Afin de recréer ce microenvironnement *in vitro*, des modèles de cocultures ont été développés associant par exemple des cellules cancéreuses à des cellules endothéliales ou immunitaires. De plus, il est possible de cultiver ces cellules dans des conditions hypoxiques. Cependant ces modèles ne permettent pas aujourd'hui de se substituer aux modèles d'étude *in vivo*.

### **Les cellules souches cancéreuses**

Tout d'abord mise en évidence dans les leucémies myéloïdes aiguës par l'équipe de Dick, la présence d'une population de cellules présentant des caractères de cellules souches a été démontrée dans les tumeurs solides dont le gliome (Lapidot et al., 1994; Singh et al., 2004). Ces cellules, nommées cellules souches cancéreuses, sont capables de s'autorenouveler et de se différencier en tous les sous-types présents dans la tumeur ainsi que d'initier une tumeur identique à celle dont elles sont issues lorsqu'elles sont injectées dans des souris immuno-déprimées. L'hypothèse actuelle est que ces cellules seraient responsables de l'initiation, de la progression et de la récurrence de la tumeur. En effet, elles surexpriment des protéines anti-apoptotiques, des transporteurs ABC et des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, les rendant très résistantes aux traitements que ce soit la radiothérapie ou la chimiothérapie (Liu et al., 2006). Cibler plus précisément ces cellules semble donc être une des clés pour augmenter l'efficacité des traitements.

L'utilisation de milieux définis pour cultiver les primocultures permet de conserver le phénotype souche des CSCs. Cependant leur étude plus approfondie est limitée par l'absence de marqueurs spécifiques permettant d'isoler ces cellules. En effet, les marqueurs de surface actuellement utilisés pour les isoler sont exprimés par les cellules normales. Dans les GBM, l'isolation des CSCs repose principalement sur l'expression du CD133. L'utilisation de ce marqueur est très controversée puisqu'il a été montré que des cellules ne l'exprimant pas étaient capables de former des neurosphères *in vitro*, d'initier des tumeurs *in vivo*, voire de réexprimer CD133 (Chen et al., 2010a; Joo et al., 2008; Wang et al., 2008). De plus, son expression peut être modulée par l'hypoxie et le stress cellulaire (Griguer et al., 2008; Platet et al., 2007). Dans notre étude nous montrons que ce marqueur n'est pas exprimé par les primocultures appartenant au sous-type mésenchymal, alors que ce dernier possède la même capacité à former des neurosphères *in vitro* et le même potentiel tumorigénique *in vivo* que les autres sous-types de GBM. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études qui montrent

également une absence d'expression de CD133 dans le sous-type mésenchymal (Zarkoob et al., 2013). D'autres marqueurs de surface ont également été exploités pour différencier les CSCs, comme la Nestine, SSEA1, CD44 ou CD90. Tous ces marqueurs sont exprimés plus ou moins fortement dans nos primocultures et ne permettent pas la différenciation des différents sous-types de GBM. De plus, ils ne sont pas non plus spécifiques des CSCs puisque par exemple, toutes les cellules des primocultures du sous-type prolifératif expriment le CD90 alors que seulement 40% d'entre elles sont capables d'initier des neurosphères *in vitro*. De plus, d'un point de vue clinique, même si ces marqueurs sont fortement exprimés dans les tumeurs, aucune corrélation au grade des GBM ou de fonction pronostique ne leur est clairement attribuée. Les CSCs pouvant être issues de cellules souches neurales, de progéniteurs ou de cellules gliales ayant acquis des mutations leur conférant des propriétés de cellules souches, l'utilisation de plusieurs marqueurs semble la manière la plus adaptée à la caractérisation des CSCs.

### **Classification des GBM**

Afin de déterminer s'il existe une corrélation entre les réponses aux traitements et les profils génétiques, une classification transcriptomique des GBM a été établie permettant de définir des sous-groupes de tumeurs (Phillips et al., 2006; Verhaak et al., 2010). Cette classification est associée à des données cliniques comme l'agressivité et la progression de la tumeur. Ces études transcriptomiques ont permis de mettre en évidence des voies de signalisation impliquées dans la gliomagenèse. Le sous-type prolifératif se caractérise par exemple par la mutation et la surexpression de l'*EGFR* et par une absence de mutation de *TP53*. Le sous-type mésenchymal est le plus agressif et la perte ou la mutation de plusieurs gènes comme *NF*, *TP53* et *PTEN* est fréquemment retrouvée. Enfin, le sous-type proneural, se caractérisant entre autres par l'expression très fréquente de la mutation *IDH*, de *TP53* et de *PDGFR*, est retrouvé plus fréquemment chez des patients plus jeunes, de moyenne d'âge 40 ans. Si ce sous-type est de meilleur pronostic que les deux autres sous-types, il est cependant plus résistant aux traitements.

Cette classification moléculaire a pour objectif de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques et des marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements afin d'adapter au mieux le traitement du patient selon le sous-type de tumeur qu'il possède. Ainsi, la caractérisation des primocultures que nous avons réalisée dans notre laboratoire a permis de mettre en évidence une différence fondamentale au niveau du métabolisme entre les différents

sous-types de tumeur. En effet, nous avons montré que le sous-type mésenchymal est caractérisé par un métabolisme glutaminergique couplé à l'OXPPOS comparé aux sous-types prolifératifs et proneuraux incapables d'oxyder la glutamine dans leurs mitochondries. Cette différence est d'autant plus intéressante qu'elle peut être exploitée pour sensibiliser ces cellules à la mort grâce un inhibiteur de la glutaminolyse. Une autre différence de métabolisme permettant de différencier le sous-type mésenchymal dans les GBM est leur forte glycolyse associée à leur forte expression de l'ALDH1 (aldehyde dehydrogenase) (Mao et al., 2013). Le métabolisme fortement glycolytique du sous-type mésenchymal est également retrouvé dans d'autres types de cancer comme celui du pancréas (Daemen et al., 2015). Ces données peuvent être en accord avec nos résultats. En effet, si nos primocultures mésenchymales sont capables d'oxyder la glutamine, certaines d'entre elles possèdent également un métabolisme glycolytique plus important que les primocultures des autres sous-types. De plus, des données de notre laboratoire montrent que ces cellules possèdent une forte capacité de plasticité métabolique leur permettant de proliférer aussi bien dans un milieu déplété en glutamine que dans un milieu déplété en glucose. De manière générale, notre travail ainsi que celui de la littérature montre que le sous-type mésenchymal se différencie en de nombreux points des autres sous-types que ce soit d'un point de vue génomique ou « fonctionnel » par leur métabolisme. Au contraire, les sous-types prolifératifs et proneuraux sont difficilement différenciables. Cibler plus particulièrement le sous-type mésenchymal est d'autant plus intéressant qu'il s'agit du sous-type le plus agressif (Phillips et al., 2006).

L'utilisation de cette classification dans le développement de traitements personnalisés pourrait être remise en question puisqu'elle ne tient pas compte de l'hétérogénéité moléculaire intra-tumorale, récemment mise en évidence dans les GBM (Aubry et al., 2015; Sottoriva et al., 2013). En effet, chez certains patients il existerait plusieurs clones de cellules cancéreuses au sein d'une même tumeur, présentant un profil moléculaire différent et donc une réponse différente à un même traitement. Aubry *et al.*, ont par exemple montré que le sous-type mésenchymal est retrouvé dans des prélèvements effectués dans des zones nécrotiques et tumorales alors que le sous-type proneural est plus fréquemment retrouvé dans les zones périphériques et d'interface avec la tumeur (Aubry et al., 2015). Si l'existence de ces différents clones est confirmée, elle complique la prise en charge thérapeutique des patients puisque si certains clones sont sensibles à un traitement particulier d'autres y seront résistants et pourront induire la récurrence de la tumeur. Toutefois, cette coexistence de différents clones au sein d'une même tumeur n'est pas retrouvée chez tous les patients. L'étude de

Sottoriva montre par exemple une signature moléculaire différente au sein d'une même tumeur pour 6 patients sur 10. De plus, étant donné la corrélation établie entre le sous-type de GBM et le pronostic des patients, la prédominance d'un clone n'est pas à exclure.

Même si elle peut être discutée, la classification moléculaire reste essentielle pour mieux comprendre l'évolution des GBM et les mécanismes de résistance au traitement. Elle permet également de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques d'un sous-type particulier. Cependant d'un point de vue clinique, l'efficacité des traitements visant ces nouvelles cibles est à prendre avec précaution de part l'existence potentielle de différents clones au sein de la tumeur. Effectuer plusieurs prélèvements à différentes zones d'une même tumeur pourrait être une stratégie pour cibler plusieurs clones voire les plus résistants par une combinaison de traitements.

### **Dérégulations du métabolisme : causes ou conséquences du cancer?**

Otto Warburg fut le premier à avoir postulé que le cancer était une maladie métabolique. En effet, il avait mis en évidence que les cellules cancéreuses présentaient un métabolisme fortement glycolytique comparé aux cellules normales. Selon lui, cette propriété des cellules cancéreuses était due à un dysfonctionnement des mitochondries responsable de la transformation oncogénique des cellules. Toutefois, de nombreuses études ont démontré depuis que les mitochondries étaient toujours fonctionnelles dans la plupart des cellules cancéreuses. Le rôle des dérégulations du métabolisme dans l'initiation tumorale est supporté par la mise en évidence de mutations des enzymes du TCA dans de nombreux cancers. Des mutations de la FH et de la SDH seraient la principale cause des cancers héréditaires des reins et des paragangliomes respectivement (Baysal, 2008; Tomlinson et al., 2002). Plus récemment des mutations d'*IDH* ont été retrouvées dans des gliomes de bas grade sans autre altération génétique classiquement retrouvée de manière précoce au cours de la progression tumorale. Ces données suggèrent que les mutations d'*IDH* apparaissent très tôt dans la gliomagenèse et joueraient un rôle dans la tumorigénicité. Losman *et al.* ont d'ailleurs démontré que le D-2HG, oncométabolite résultant de cette mutation, est suffisant pour induire la transformation des cellules leucémiques à savoir leur indépendance vis à vis des facteurs de croissance et l'inhibition de leur différenciation via l'inhibition de la dioxygénase TET2 (Losman et al., 2013).

Les mutations d'*IDH* modulent l'expression génique des cellules notamment via la diminution du pool d' $\alpha$ KG. Dans le cytoplasme, l' $\alpha$ KG est le substrat des dioxygénases telles que les PHD permettant la dégradation de HIF-1. La diminution du pool d' $\alpha$ KG induit par la mutation *IDH* permet donc la stabilisation de HIF-1 et la transcription de ses gènes cibles impliqués notamment dans l'angiogénèse, l'invasion et le maintien du phénotype des CSCs au sein de la tumeur. L' $\alpha$ KG est également le substrat de certaines enzymes permettant la déméthylation de l'ADN et des histones appartenant à la famille des TET et JMJ. De plus, il a été démontré une similarité structurelle du D-2HG avec l' $\alpha$ KG menant à l'hypothèse que le D-2HG pourrait également inhiber de manière compétitive l'activité des enzymes dépendantes de l' $\alpha$ KG (Xu et al., 2011).

Si l'origine des cancers reste discutée et est très certainement multifactorielle, il est indéniable que les adaptations métaboliques des cellules tumorales jouent un rôle dans la progression tumorale et participent à la résistance aux traitements. La reprogrammation du métabolisme permet aux cellules cancéreuses de soutenir une prolifération rapide, de résister à la pression du microenvironnement tumoral comme l'hypoxie et d'influer sur ce microenvironnement. En effet, les cellules cancéreuses produisent par exemple de grandes quantités de lactate qui peut être utilisé comme source d'énergie par les cellules du microenvironnement ou les cellules tumorales avoisinantes (Pavlides et al., 2009; Sonveaux et al., 2008). Ce lactate, via l'acidification du microenvironnement peut également promouvoir l'invasion et l'immunosuppression. De plus, les enzymes de la glycolyse possèdent des fonctions de résistance à la mort cellulaire. C'est le cas par exemple de l'hexokinase II qui peut interagir avec VDAC et ainsi empêcher la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et le relargage du cytochrome C (Pastorino et al., 2002).

### **Importance de la glutamine pour les cellules cancéreuses ?**

Les études du métabolisme des cellules cancéreuses se sont longtemps concentrées sur leur dépendance au glucose. Cette caractéristique est d'ailleurs utilisée pour diagnostiquer les tumeurs solides et leurs métastases en PET-scan. Cependant, cette technique est moins efficace dans les gliomes à cause du métabolisme fortement glycolytique du tissu cérébral sain (Venneti et al., 2015). De plus, elle peut être dans certains cas responsable de résultats faussement négatifs reflétant le fait que toutes les cellules cancéreuses ne se conforment pas à

l'effet Warburg. Récemment, l'intérêt s'est porté sur une autre source d'énergie utilisée par les cellules cancéreuses, la glutamine. Cet acide aminé est essentiel pour maintenir le pool des intermédiaires du TCA ainsi que comme donneur d'azote pour la synthèse des acides aminés non essentiels et des nucléotides. Nous avons montré que la déplétion de cet acide aminé dans le milieu de culture de nos lignées de GBM diminue fortement la prolifération de ces cellules. La dépendance à la glutamine est fréquemment retrouvée dans les cellules en conditions hypoxiques et dans les cellules présentant des mutations des enzymes du TCA (Mullen et al., 2012; Wise et al., 2011). En effet, ces cellules utilisent la glutamine comme source anaplérotique du TCA pour reformer du citrate via la carboxylation réductrice de l' $\alpha$ KG. D'ailleurs, la prolifération des cellules de gliomes portant la mutation IDH est ralentie par un inhibiteur synthétique de la glutaminase, le BPTES (Seltzer et al., 2010). Toutefois ces cellules augmentent leur flux glycolytique soulignant que l'utilisation du glucose et de la glutamine ne sont pas exclusives et que les cellules cancéreuses peuvent utiliser un substrat énergétique pour compenser le déficit en apport d'un autre.

### **Capacité de plasticité des cellules cancéreuses**

Si certaines études ont montré que les cellules mutées pour IDH étaient dépendantes de la glutamine, d'autres ont montré que la mutation *IDH* pouvait être associée à l'augmentation de la glycolyse (Izquierdo-Garcia et al., 2014; Seltzer et al., 2010). En effet, les cellules mutées pour IDH peuvent maintenir leur TCA en augmentant le flux de pyruvate à la mitochondrie. Le pyruvate sera transformé en oxaloacétate (OAA) via la formation de citrate et sa conversion en acetylCoA pour la synthèse des lipides ou via la pyruvate carboxylase. Il a d'ailleurs été montré que les cellules mutées pour IDH présentent une augmentation de l'expression et de l'activité de la pyruvate carboxylase, données confirmées par analyse des données du TCGA (The Cancer Genome Atlas) de patients atteints de gliome (Izquierdo-Garcia et al., 2014). La lignée U251 utilisée au cours de notre étude sur les mutations d'IDH, possède un métabolisme fortement glycolytique et est capable de continuer à proliférer sous une déplétion en glutamine. Nous avons montré que cette lignée n'est pas sensible aux inhibiteurs de la glutaminolyse tels que le BPTES et l'EGCG. Le métabolisme des cellules cancéreuses et leur capacité de plasticité métabolique sont donc des facteurs très importants à prendre en compte. En effet, l'augmentation de la résistance des cellules mutées pour IDH dans notre modèle est due à leur adaptation métabolique engendrée par la déplétion en  $\alpha$ KG. Afin de reformer de l' $\alpha$ KG, ces cellules utilisent l'aspartate aminotransférase (AAT)



indépendamment de la navette malate-aspartate probablement à cause de la diminution du pool de malate qui n'est pas maintenu par la glutaminolyse. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la mutation IDH est souvent retrouvée associée à une diminution des pools de fumarate et de malate (Thornburg et al., 2008). Si le métabolisme fortement glycolytique de la lignée U251 mutée pour IDH la rend insensible à l'inhibition de la glutaminolyse elle pourrait être sensibilisée à la mort cellulaire par un inhibiteur de l'AAT ou un inhibiteur de la pyruvate carboxylase.

L'importance de la plasticité métabolique des cellules cancéreuses a également été démontrée lors de l'étude de l'effet de l'EGCG sur les lignées de GBM. En effet, nous avons montré que l'inhibition du métabolisme de la glutamine couplé à l'OXPPOS peut induire directement la mort de la lignée LN18. Cependant cette inhibition n'est pas suffisante pour induire la mort de la lignée U87. En effet, si l'inhibition de la glutaminolyse diminue significativement la prolifération de ces cellules, elles sont capables d'adapter leur métabolisme pour survivre notamment via l'augmentation de l'oxydation mitochondriale du glucose. De même, comme nous l'avons évoqué précédemment, la déplétion en glutamine n'a pas d'effet sur la prolifération des primocultures quelque soit le sous-type auquel elles appartiennent. Les primocultures du sous-type mésenchymal, capables d'oxyder la glutamine, sont les seules capables de continuer à proliférer en absence de glucose. Elles sont également beaucoup moins sensibles à un inhibiteur de la glycolyse comme le 2DG que les deux autres sous-types de primocultures. Ces données montrent que les primocultures sont également capables de plasticité métabolique. Cette adaptation métabolique pourrait expliquer le manque d'effet du 2DG dans de nombreux protocoles cliniques.

Ainsi, les voies de compensations métaboliques permettent d'échapper à la mort induite par des molécules inhibant le métabolisme. Une stratégie pour pallier à ces mécanismes de résistance peut être d'utiliser plusieurs inhibiteurs métaboliques. Il a par exemple été montré qu'un traitement concomittant d'EGCG et d'un inhibiteur de la MPC (mitochondrial pyruvate carrier), permettant l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie, diminue fortement la croissance tumorale comparé à l'utilisation de ces drogues seules (Yang et al., 2014). Toutefois, ce traitement ne sera efficace que dans les cellules ayant un métabolisme oxydatif puisque dans les cellules cancéreuses possédant un métabolisme reposant sur une forte glycolyse aérobie, l'activité de la MPC est faible (Compan et al., 2015).

L'expression génique est importante à prendre en compte dans la reprogrammation métabolique. En effet, les cellules présentent des altérations des voies de signalisation qui contrôlent l'utilisation des substrats énergétiques. Ces altérations aboutissent à l'utilisation de substrats spécifiques et peuvent limiter les capacités de compensation métabolique des cellules. Par exemple, la perte de p53 diminue la capacité d'autophagie et d'oxydation des acides gras des cellules de cancer du colon (Buzzai et al., 2007). La déplétion en glutamine entraîne la mort spécifique des cellules surexprimant c-myc dans le gliome (Wise et al., 2008). Ainsi la surexpression de c-Myc pourrait être un marqueur prédictif de réponse aux traitements ciblant la glutaminolyse. Toutefois, des marqueurs prédictifs de la plasticité métabolique des cellules cancéreuses semblent plus difficiles à établir de part les nombreuses voies de signalisation pouvant être impliquées et de part la diversité des substrats pouvant être utilisés. En effet, en plus du glucose et de la glutamine, les cellules cancéreuses peuvent également utiliser d'autres acides aminés non essentiels ou bien encore les acides gras comme substrats énergétiques.

### **Modulation du métabolisme et sensibilité à la mort cellulaire**

Dans certains types de cancers, des modulateurs du métabolisme sont capables d'induire directement la mort des cellules cancéreuses. De plus, si les inhibiteurs du métabolisme peuvent ne pas avoir d'effet en monothérapie, ils peuvent sensibiliser les cellules cancéreuses à la chimio- ou radiothérapie. Il a par exemple été montré que le 2DG, inhibiteur de la glycolyse, sensibilise les cellules à la mort induite par les irradiations et par des agents chimiothérapeutiques (Zhang et al., 2014). Dans notre laboratoire, il a été montré que le DCA, molécule inhibant la pyruvate dehydrogenase kinase, permet d'induire un shift de la glycolyse aérobie vers la respiration mitochondriale des CSCs de gliomes (Morfouace et al., 2012). Cette modulation du métabolisme induit la différenciation des CSCs et les sensibilise à la mort induite par l'étoposide et les irradiations.

Dans notre étude nous avons également mis en évidence un lien étroit entre le métabolisme et la sensibilité à la mort cellulaire. La modulation du métabolisme mitochondrial des cellules de GBM modifie leur sensibilité à la mort cellulaire. Nous avons démontré que la mutation IDH diminue la sensibilité à la mort cellulaire via la diminution du pool mitochondrial de NADH. Nous avons également montré que l'EGCG inhibe l'oxydation mitochondriale de la glutamine, induit directement la mort de la lignée LN18 et peut

sensibiliser la lignée U87 ou les primocultures de GBM à la mort induite par TRAIL et par l'étoposide respectivement. Toutefois, en plus d'inhiber la GDH, l'EGCG est connu pour avoir de nombreux effets. Il est notamment capable d'inhiber la production de ROS, d'inhiber l'expression des transporteurs ABC, ou bien encore d'inhiber des enzymes impliquées dans les modifications épigénétiques comme les DNMT (DNA methyltransférases) ou les HDAC (Histone deacetylases) (Fang et al., 2003; Farabegoli et al., 2010; Khan et al., 2015). Ainsi, il est difficile de déterminer si la sensibilisation à la mort dans nos modèles est uniquement due à l'inhibition de la GDH et à l'adaptation du métabolisme des cellules qui s'en suit. En effet, le silencing de la GDH est indispensable pour valider nos résultats. Plusieurs indices peuvent suggérer l'implication d'autres propriétés de l'EGCG dans les effets observés dans nos modèles. En effet, nous avons montré que la déplétion en glutamine ou qu'un prétraitement au BPTES ne sensibilise pas la lignée U87 à TRAIL. Toutefois, ces deux traitements n'entraînent pas le switch métabolique observé avec l'EGCG à savoir l'induction de l'oxydation mitochondriale du glucose et l'augmentation de la respiration mitochondriale. De plus, un traitement concomitant EGCG et TRAIL ne sensibilise pas à la mort la lignée U87 (données non montrées), suggérant l'implication de mécanismes à plus long terme. L'impact de l'EGCG sur les marqueurs épigénétiques sera donc évalué et des études actuellement en cours ont pour but d'évaluer la part due à l'inhibition de la glutaminolyse et du switch métabolique dans la sensibilité à la mort cellulaire des lignées en utilisant d'autres modulateurs du métabolisme comme le BPTES ou un siRNA dirigé contre la GDH.

### **Dépendance à la glutamine *in vitro* vérifiée *in vivo* ?**

L'étude du métabolisme des cellules *in vitro* dans des milieux de culture supplémentés en nutriments comme la glutamine pose la question de la pertinence de cette utilisation *in vivo* où les apports en nutriments peuvent être variables selon le niveau d'angiogénèse et de fonctionnalité des vaisseaux au sein des tumeurs. De plus, comme nous l'avons évoqué précédemment, le métabolisme est également modulé par le microenvironnement comme l'hypoxie et les cellules stromales. Récemment, Marin-Valencia *et al.* ont étudié les flux métaboliques, en utilisant des nutriments marqués au  $^{13}\text{C}$ , dans des xénogreffes orthotopiques de GBM humain chez la souris (Marin-Valencia et al., 2012). Cette étude montre que la glutamine n'est pas utilisée par ces tumeurs et qu'elle est en partie synthétisée *de novo* à partir du glucose. Cependant cette étude n'utilise que 3 primocultures qui ont été caractérisées pour seulement quelques gènes ne permettant pas de les associer à un sous-type de GBM. Les

primocultures utilisées dans cette étude n'appartiennent donc peut être pas au sous-type mésenchymal et ne sont peut-être pas capables d'oxyder la glutamine dans leurs mitochondries. De plus, l'importance de la glutamine pour la croissance tumorale est supportée par des études de l'effet d'inhibiteurs de la glutaminolyse *in vivo* dans des modèles animaux. En effet, l'inhibition de l'expression du transporteur à la glutamine ASCT2, diminue fortement la croissance tumorale et le développement de métastases de xénogreffes de cancer de la prostate chez la souris (Wang et al., 2015). L'inhibition de la glutaminase par le BPTES ou par un ARN antisens, diminue la croissance tumorale *in vivo* chez la souris (Lobo et al., 2000; Xiang et al., 2015). Enfin, l'inhibition de l'expression de l'aspartate aminotransférase inhibe la croissance tumorale de tumeurs du pancréas *in vivo* (Son et al., 2013).

Dans notre modèle de GBM, nous avons réalisé des expériences préliminaires d'injection orthotopique de cellules mésenchymales prétraitées à l'EGCG. Les données préliminaires ne montrent pas d'effet du prétraitement de ces cellules sur la survie des souris. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'il n'y ait plus de pression de sélection exercée par l'EGCG au sein du microenvironnement. L'EGCG étant capable de diffuser à travers la barrière hémato-encéphalique, d'autres études *in vivo* seront réalisées en alimentant quotidiennement les souris en EGCG et l'effet de l'étoposide sera également étudié. De plus, il serait intéressant d'étudier la dépendance à la glutamine des cellules mésenchymales *in vivo*. Aujourd'hui des méthodes d'analyse des flux métaboliques *in vivo* par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN), utilisant des carbones marqués hyperpolarisés, sont développées (Dutta et al., 2013). Ces techniques permettront de mieux comprendre les voies métaboliques au cours de la progression tumorale et de la réponse aux traitements.

### **Application en clinique ?**

Différentes stratégies ciblant le métabolisme ont montré des effets antitumoraux significatifs *in vitro* et *in vivo* et sont en phase d'essai clinique. L'étude préclinique de Michelakis étudiant l'effet du DCA sur 5 patients atteints de GBM a montré une régression de la tumeur et une stabilité clinique à 15 mois chez 4 de ces patients (Michelakis et al., 2010). De plus, cette molécule n'a pas montré de signes toxiques majeurs. Le 2-DG est également en phase I/II d'essai clinique dans les GBM qui a permis de déterminer les doses pour lesquelles

il n'engendre pas de toxicité (Singh et al., 2005). D'autres études sont en cours pour évaluer l'efficacité du 2-DG associé à la radiothérapie.

En plus de limiter au maximum les effets toxiques engendrés par les traitements, un point crucial à prendre en compte dans le traitement du gliome est le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Si la proportion d'EGCG à franchir la BHE peut être faible (Lin et al., 2007), certaines études ont mis en évidence son efficacité de sensibilisation à des agents chimiothérapeutiques dans des modèles murins de xénogreffes de GBM orthotopiques (Chen et al., 2011). De plus, il existe plusieurs stratégies permettant d'améliorer ou de s'affranchir du passage de la BHE. En effet, il est possible lors de l'opération du patient de placer un polymère dans la cavité formée par la résection de la tumeur qui permettra de libérer progressivement les drogues qu'il contient. La diffusion des drogues à travers la BHE peut être également améliorée en les couplant à des nanoparticules permettant d'augmenter leur solubilité et leur stabilité. Ces nanoparticules peuvent être couplées à des peptides reconnus par les cellules tumorales. Ainsi, il a par exemple été montré que des nanoparticules portant du paclitaxel couplées à un peptide reconnu par le récepteur Neuroglia 2, protéoglycane de la membrane cellulaire fortement exprimé par les cellules de gliome, augmente la distribution de la drogue au cerveau et la survie des souris (Chi et al., 2015). Nous avons montré que TRAIL sensibilise à la mort la lignée U87 traitée à l'EGCG. Cependant cette molécule possède une très faible solubilité et une demi-vie très courte. Le couplage de cette molécule à des nanoparticules pourrait permettre son utilisation *in vivo* (Perlstein et al., 2013).

## **Conclusion générale**

L'échec des thérapies actuelles et l'hétérogénéité génétique et moléculaire montre bien l'importance d'orienter les stratégies thérapeutiques vers des traitements personnalisés dans le traitement des cancers. Déterminer des marqueurs prédictifs de réponse aux traitements est donc crucial. Cette notion de médecine personnalisée commence à être admise par le corps médical. En 2011, en France, 55000 personnes ont bénéficié d'un examen des caractéristiques moléculaires de leur tumeur afin de bénéficier de thérapies ciblées (Source Inserm, « Médecine personnalisée du cancer à portée de mains »). La plupart de ces traitements ciblaient une mutation de l'EGFR dans le cancer du poumon.

Si le ciblage du métabolisme semble être une stratégie thérapeutique très prometteuse, l'identification des besoins et des capacités de plasticité métaboliques de chaque sous-type de tumeur est nécessaire. En effet, la capacité de mise en place de voies alternatives pour

répondre à un manque d'apport d'un substrat énergétique peut être une caractéristique cruciale mise en place pendant la tumorigénèse. Ainsi, la complexité des voies métaboliques engagées pour permettre la croissance et la résistance de la tumeur aux traitements pourra être mieux comprise par des approches *in vivo*. En effet, des différences de métabolisme peuvent être observées entre les cellules de part leur localisation au sein de la tumeur qui module la disponibilité en substrats et en oxygène, soit par la proximité des vaisseaux sanguins soit par les contacts avec les cellules du microenvironnement. De plus, le rôle de l'hétérogénéité génétique dans la régulation et l'adaptation des voies métaboliques des cellules cancéreuses est à prendre en compte. Associer la connaissance des voies métaboliques aux données moléculaires pourrait permettre de mettre au point des combinaisons de traitements pour outrepasser les résistances mises en place par les cellules.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## V. Bibliographie

- Abshire, T.C., Pollock, B.H., Billett, A.L., Bradley, P., and Buchanan, G.R. (2000). Weekly polyethylene glycol conjugated L-asparaginase compared with biweekly dosing produces superior induction remission rates in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 96, 1709–1715.
- Aldape, K., Burger, P.C., and Perry, A. (2007). Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 131, 242–251.
- Amary, M.F., Bacsi, K., Maggiani, F., Damato, S., Halai, D., Berisha, F., Pollock, R., O'Donnell, P., Grigoriadis, A., Diss, T., et al. (2011). IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *J. Pathol.* 224, 334–343.
- Amatya, V.J., Naumann, U., Weller, M., and Ohgaki, H. (2005). TP53 promoter methylation in human gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 110, 178–184.
- Anastasiou, D., Poulogiannis, G., Asara, J.M., Boxer, M.B., Jiang, J., Shen, M., Bellinger, G., Sasaki, A.T., Locasale, J.W., Auld, D.S., et al. (2011). Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* 334, 1278–1283.
- Anastasiou, D., Yu, Y., Israelsen, W.J., Jiang, J., Boxer, M.B., Hong, B.S., Tempel, W., Dimov, S., Shen, M., Jha, A., et al. (2012). Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nat. Chem. Biol.* 8, 839–847.
- Angelastro, J.M., and Lamé, M.W. (2010). Overexpression Of CD133 Promotes Drug Resistance In C6 Glioma Cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 8, 1105–1115.
- Anido, J., Sáez-Borderías, A., González-Juncà, A., Rodón, L., Folch, G., Carmona, M.A., Prieto-Sánchez, R.M., Barba, I., Martínez-Sáez, E., Prudkin, L., et al. (2010). TGF- $\beta$  Receptor Inhibitors Target the CD44<sup>high</sup>/Id1<sup>high</sup> Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* 18, 655–668.
- Arai, H., Ikota, H., Sugawara, K., Nobusawa, S., Hirato, J., and Nakazato, Y. (2012). Nestin expression in brain tumors: its utility for pathological diagnosis and correlation with the prognosis of high-grade gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 29, 160–167.
- Aubry, M., de Tayrac, M., Etcheverry, A., Clavreul, A., Saikali, S., Menei, P., and Mosser, J. (2015). From the core to beyond the margin: a genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget* 6, 12094–12109.
- 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.



- Baeza, N., Weller, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2003). PTEN methylation and expression in glioblastomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 106, 479–485.
- Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., and von Deimling, A. (2008). Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 116, 597–602.
- 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.
- 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.
- Bar, E.E., Chaudhry, A., Lin, A., Fan, X., Schreck, K., Matsui, W., Piccirillo, S., Vescovi, A.L., DiMeco, F., Olivi, A., et al. (2007). Cycloamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 2524–2533.
- Barbano, R., Palumbo, O., Pasculli, B., Galasso, M., Volinia, S., D’Angelo, V., Icolaro, N., Coco, M., Dimitri, L., Graziano, P., et al. (2014). A MiRNA Signature for Defining Aggressive Phenotype and Prognosis in Gliomas. *PLoS ONE* 9, e108950.
- Baysal, B.E. (2008). Clinical and molecular progress in hereditary paraganglioma. *J. Med. Genet.* 45, 689–694.
- Beier, D., Röhrl, S., Pillai, D.R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L.A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., et al. (2008). Temozolomide Preferentially Depletes Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Cancer Res.* 68, 5706–5715.
- Ben-Porath, I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, 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.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N.C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* 126, 107–120.
- van den Bent, M.J., Gravendeel, L.A., Gorlia, T., Kros, J.M., Lapre, L., Wesseling, P., Teepen, J.L., Idbaih, A., Sanson, M., Smitt, P.A.E.S., et al. (2011). A Hypermethylated Phenotype Is a Better Predictor of Survival than MGMT Methylation in Anaplastic Oligodendroglial Brain Tumors: A Report from EORTC Study 26951. *Clin. Cancer Res.* 17, 7148–7155.
- Blouin, M.-J., Zhao, Y., Zakikhani, M., Algire, C., Piura, E., and Pollak, M. (2010). Loss of function of PTEN alters the relationship between glucose concentration and cell proliferation, increases glycolysis, and sensitizes cells to 2-deoxyglucose. *Cancer Lett.* 289, 246–253.
- Bobrovnikova-Marjon, E., and Hurov, J.B. (2014). Targeting metabolic changes in cancer:

novel therapeutic approaches. *Annu. Rev. Med.* 65, 157–170.

Bolden, J.E., Peart, M.J., and Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 769–784.

Bonnet, S., Archer, S.L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C.T., Lopaschuk, G.D., Puttagunta, L., Bonnet, S., et al. (2007). A Mitochondria-K<sup>+</sup> Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell* 11, 37–51.

Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* 155, 462–477.

Brocard, E., Oizel, K., Lalier, L., Pecqueur, C., Paris, F., Vallette, F.M., and Oliver, L. (2015). Radiation-induced PGE<sub>2</sub> sustains human glioma cells growth and survival through EGF signaling. *Oncotarget* 6, 6840–6849.

Brown, P.D., Krishnan, S., Sarkaria, J.N., Wu, W., Jaeckle, K.A., Uhm, J.H., Geoffroy, F.J., Arusell, R., Kitange, G., Jenkins, R.B., et al. (2008). Phase I/II trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 5603–5609.

Buccoliero, A.M., Caldarella, A., Arganini, L., Mennonna, P., Ammanati, F., Taddei, A., and Taddei, G.L. (2003). Oligodendroglioma: CD44 as a possible prognostic opportunity. *Clin. Neuropathol.* 22, 169–175.

Bustamante, E., Morris, H.P., and Pedersen, P.L. (1981). Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J. Biol. Chem.* 256, 8699–8704.

Buzzai, M., Jones, R.G., Amaravadi, R.K., Lum, J.J., DeBerardinis, R.J., Zhao, F., Viollet, B., and Thompson, C.B. (2007). Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res.* 67, 6745–6752.

Cairncross, J.G., Ueki, K., Zlatescu, M.C., Lisle, D.K., Finkelstein, D.M., Hammond, R.R., Silver, J.S., Stark, P.C., Macdonald, D.R., Ino, Y., et al. (1998). Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1473–1479.

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.

Cancer Genome Atlas Research Network, Brat, D.J., Verhaak, R.G.W., Aldape, K.D., Yung, W.K.A., Salama, S.R., Cooper, L.A.D., Rheinbay, E., Miller, C.R., Vitucci, M., et al. (2015). Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N. Engl. J. Med.* 372, 2481–2498.

- Capela, A., and Temple, S. (2002). LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35, 865–875.
- Capela, A., and Temple, S. (2006). LeX is expressed by principle progenitor cells in the embryonic nervous system, is secreted into their environment and binds Wnt-1. *Dev. Biol.* 291, 300–313.
- Cárdenas-Navia, L.I., Mace, D., Richardson, R.A., Wilson, D.F., Shan, S., and Dewhirst, M.W. (2008). The pervasive presence of fluctuating oxygenation in tumors. *Cancer Res.* 68, 5812–5819.
- Charles, N., Ozawa, T., Squatrito, M., Bleau, A.-M., Brennan, C.W., Hambardzumyan, D., and Holland, E.C. (2010). Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells. *Cell Stem Cell* 6, 141–152.
- Chen, C.-T., Shih, Y.-R.V., Kuo, T.K., Lee, O.K., and Wei, Y.-H. (2008). Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26, 960–968.
- Chen, R., Nishimura, M.C., Bumbaca, S.M., Kharbanda, S., Forrest, W.F., Kasman, I.M., Greve, J.M., Soriano, R.H., Gilmour, L.L., Rivers, C.S., et al. (2010a). A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17, 362–375.
- Chen, T.C., Wang, W., Golden, E.B., Thomas, S., Sivakumar, W., Hofman, F.M., Louie, S.G., and Schönthal, A.H. (2011). Green tea epigallocatechin gallate enhances therapeutic efficacy of temozolomide in orthotopic mouse glioblastoma models. *Cancer Lett.* 302, 100–108.
- Chen, Z., Li, Y., Zhang, H., Huang, P., and Luthra, R. (2010b). Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. *Oncogene* 29, 4362–4368.
- Cheng, L., Bao, S., and Rich, J.N. (2010). Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem. Pharmacol.* 80, 654–665.
- Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J.K., Fang, X., Sloan, A.E., Mao, Y., Lathia, J.D., et al. (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 153, 139–152.
- Chetty, C., Vanamala, S.K., Gondi, C.S., Dinh, D.H., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2012). MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in glioblastoma xenograft cells. *Cell. Signal.* 24, 549–559.
- Chi, Y., Zhu, S., Wang, C., Zhou, L., Zhang, L., Li, Z., and Dai, Y. (2015). Glioma homing peptide-modified PEG-PCL nanoparticles for enhanced anti-glioma therapy. *J. Drug Target.* 1–9.
- Chinnaiyan, P., Wang, M., Rojiani, A.M., Tofilon, P.J., Chakravarti, A., Ang, K.K., Zhang, H.-Z., Hammond, E., Curran, W., and Mehta, M.P. (2008). The prognostic value of nestin expression in newly diagnosed glioblastoma: Report from the Radiation Therapy Oncology

Group. *Radiat. Oncol.* 3, 32.

Cho, Y.M., Kwon, S., Pak, Y.K., Seol, H.W., Choi, Y.M., Park, D.J., Park, K.S., and Lee, H.K. (2006). Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 1472–1478.

Christensen, B.C., Smith, A.A., Zheng, S., Koestler, D.C., Houseman, E.A., Marsit, C.J., Wiemels, J.L., Nelson, H.H., Karagas, M.R., Wrensch, M.R., et al. (2011). DNA Methylation, Isocitrate Dehydrogenase Mutation, and Survival in Glioma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 103, 143–153.

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

Chung, S., Dzeja, P.P., Faustino, R.S., Perez-Terzic, C., Behfar, A., and Terzic, A. (2007). Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 4, S60–S67.

Ciavardelli, D., Rossi, C., Barcaroli, D., Volpe, S., Consalvo, A., Zucchelli, M., De Cola, A., Scavo, E., Carollo, R., D'Agostino, D., et al. (2014). Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment. *Cell Death Dis.* 5, e1336.

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., 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.

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. CB* 17, 165–172.

Cohen, M.H., Shen, Y.L., Keegan, P., and Pazdur, R. (2009). FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin(R)) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *The Oncologist* 14, 1131–1138.

Colak, S., Zimmerlin, C.D., Fessler, E., Hogdal, L., Prasetyanti, P.R., Grandela, C.M., Letai, A., and Medema, J.P. (2014). Decreased mitochondrial priming determines chemoresistance of colon cancer stem cells. *Cell Death Differ.* 21, 1170–1177.

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.

Compan, V., Pierredon, S., Vanderperre, B., Krznar, P., Marchiq, I., Zamboni, N., Pouyssegur, J., and Martinou, J.-C. (2015). Monitoring Mitochondrial Pyruvate Carrier Activity in Real Time Using a BRET-Based Biosensor: Investigation of the Warburg Effect. *Mol. Cell* 59, 491–501.

Corbeil, D., Röper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S.M., Simmons, P.J., Peault, B., Buck, D.W., and Huttner, W.B. (2000). The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J. Biol. Chem.* 275, 5512–5520.

Corbeil, D., Marzesco, A.-M., Wilsch-Bräuninger, M., and Huttner, W.B. (2010). The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. *FEBS Lett.* 584, 1659–1664.

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-2 $\alpha$  regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 20, 557–570.

Daemen, A., Peterson, D., Sahu, N., McCord, R., Du, X., Liu, B., Kowanetz, K., Hong, R., Moffat, J., Gao, M., et al. (2015). Metabolite profiling stratifies pancreatic ductal adenocarcinomas into subtypes with distinct sensitivities to metabolic inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E4410–E4417.

Dahan, P., Martinez Gala, J., Delmas, C., Monferran, S., Malric, L., Zentkowski, D., Lubrano, V., Toulas, C., Cohen-Jonathan Moyal, E., and Lemarie, A. (2014). Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis.* 5, e1543.

Dahlrot, R.H., Hansen, S., Jensen, S.S., Schröder, H.D., Hjelmberg, J., and Kristensen, B.W. (2014). Clinical value of CD133 and nestin in patients with glioma: a population-based study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 3739.

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.

Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., et al. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462, 739–744.

Dang, L., Jin, S., and Su, S.M. (2010). IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends Mol. Med.* 16, 387–397.

Darmaun, D., Welch, S., Rini, A., Sager, B.K., Altomare, A., and Haymond, M.W. (1998). Phenylbutyrate-induced glutamine depletion in humans: effect on leucine metabolism. *Am. J. Physiol.* 274, E801–E807.

Daumas-Duport, C., Tucker, M.-L., Kolles, H., Cervera, P., Beuvon, F., Varlet, P., Udo, N., Koziak, M., and Chodkiewicz, J.-P. (1997). Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. *J. Neurooncol.* 34, 61–78.

Daumas-Duport, C., Beuvon, F., Varlet, P., and Fallet-Bianco, C. (2000). [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann. Pathol.* 20, 413–428.

DeBerardinis, R.J., and Cheng, T. (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in

metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 29, 313–324.

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.* 104, 19345–19350.

Doherty, J.R., and Cleveland, J.L. (2013). Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J. Clin. Invest.* 123, 3685–3692.

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.

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

Durand, E.M., and Zon, L.I. (2010). Newly emerging roles for prostaglandin E2 regulation of hematopoiesis and hematopoietic stem cell engraftment. *Curr. Opin. Hematol.* 17, 308–312.

Dutta, P., Le, A., Vander Jagt, D.L., Tsukamoto, T., Martinez, G.V., Dang, C.V., and Gillies, R.J. (2013). Evaluation of LDH-A and glutaminase inhibition in vivo by hyperpolarized <sup>13</sup>C-pyruvate magnetic resonance spectroscopy of tumors. *Cancer Res.* 73, 4190–4195.

Düvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., et al. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* 39, 171–183.

Eckel-Passow, J.E., Lachance, D.H., Molinaro, A.M., Walsh, K.M., Decker, P.A., Sicotte, H., Pekmezci, M., Rice, T., Kosel, M.L., Smirnov, I.V., et al. (2015). Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N. Engl. J. Med.* 372, 2499–2508.

Ehtesham, M., Mapara, K.Y., Stevenson, C.B., and Thompson, R.C. (2009). CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer Lett.* 274, 305–312.

El Mjiyad, N., Caro-Maldonado, A., Ramírez-Peinado, S., and Muñoz-Pinedo, C. (2011). Sugar-free approaches to cancer cell killing. *Oncogene* 30, 253–264.

Elsir, T., Edqvist, P.-H., Carlson, J., Ribom, D., Bergqvist, M., Ekman, S., Popova, S.N., Alafuzoff, I., Ponten, F., Nistér, M., et al. (2014). A study of embryonic stem cell-related proteins in human astrocytomas: identification of Nanog as a predictor of survival. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 134, 1123–1131.

Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., et al. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 64, 3892–3899.

Emadi, A., Jun, S.A., Tsukamoto, T., Fathi, A.T., Minden, M.D., and Dang, C.V. (2014). Inhibition of glutaminase selectively suppresses the growth of primary acute myeloid

leukemia cells with IDH mutations. *Exp. Hematol.* *42*, 247–251.

Endersby, R., and Baker, S.J. (2008). PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. *Oncogene* *27*, 5416–5430.

Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* *343*, 1350–1354.

Evans, S.M., Jenkins, K.W., Jenkins, W.T., Dilling, T., Judy, K.D., Schrlau, A., Judkins, A., Hahn, S.M., and Koch, C.J. (2008). Imaging and analytical methods as applied to the evaluation of vasculature and hypoxia in human brain tumors. *Radiat. Res.* *170*, 677–690.

Fang, M.Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., Welsh, W., and Yang, C.S. (2003). Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* *63*, 7563–7570.

Fang, R., Xiao, T., Fang, Z., Sun, Y., Li, F., Gao, Y., Feng, Y., Li, L., Wang, Y., Liu, X., et al. (2012). MicroRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene. *J. Biol. Chem.* *287*, 23227–23235.

Fantin, V.R., St-Pierre, J., and Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* *9*, 425–434.

Farabegoli, F., Papi, A., Bartolini, G., Ostan, R., and Orlandi, M. (2010). (-)-Epigallocatechin-3-gallate downregulates Pg-P and BCRP in a tamoxifen resistant MCF-7 cell line. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* *17*, 356–362.

Fendt, S.-M., Bell, E.L., Keibler, M.A., Olenchock, B.A., Mayers, J.R., Wasylenko, T.M., Vokes, N.I., Guarente, L., Vander Heiden, M.G., and Stephanopoulos, G. (2013). Reductive glutamine metabolism is a function of the  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nat. Commun.* *4*, 2236.

Feng, W., Gentles, A., Nair, R.V., Huang, M., Lin, Y., Lee, C.Y., Cai, S., Scheeren, F.A., Kuo, A.H., and Diehn, M. (2014). Targeting Unique Metabolic Properties of Breast Tumor Initiating Cells. *STEM CELLS* *32*, 1734–1745.

Figarella-Branger, D., and Bouvier, C. (2005). [Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]. *Bull. Cancer (Paris)* *92*, 301–309.

Filatova, A., Acker, T., and Garvalov, B.K. (2013). The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta* *1830*, 2496–2508.

Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., et al. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* *109*, 3812–3819.

Folkins, C., Shaked, Y., Man, S., Tang, T., Lee, C.R., Zhu, Z., Hoffman, R.M., and Kerbel,

- R.S. (2009). Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Res.* *69*, 7243–7251.
- Folmes, C.D.L., Nelson, T.J., Martinez-Fernandez, A., Arrell, D.K., Lindor, J.Z., Dzeja, P.P., Ikeda, Y., Perez-Terzic, C., and Terzic, A. (2011). Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* *14*, 264–271.
- Franceschi, E., Cavallo, G., Lonardi, S., Magrini, E., Tosoni, A., Grosso, D., Scopece, L., Blatt, V., Urbini, B., Pession, A., et al. (2007). Gefitinib in patients with progressive high-grade gliomas: a multicentre phase II study by Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia (GICNO). *Br. J. Cancer* *96*, 1047–1051.
- Freije, W.A., Castro-Vargas, F.E., Fang, Z., Horvath, S., Cloughesy, T., Liau, L.M., Mischel, P.S., and Nelson, S.F. (2004). Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. *Cancer Res.* *64*, 6503–6510.
- Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K.A., Paleologos, N., Nicholas, M.K., Jensen, R., et al. (2009). Bevacizumab Alone and in Combination With Irinotecan in Recurrent Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* *27*, 4733–4740.
- Fukumura, D., Xu, L., Chen, Y., Gohongi, T., Seed, B., and Jain, R.K. (2001). Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res.* *61*, 6020–6024.
- Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon, K.L., Louis, D.N., Brennan, C., et al. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* *21*, 2683–2710.
- Furnari, F.B., Cloughesy, T.F., Cavenee, W.K., and Mischel, P.S. (2015). Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 302–310.
- Galan-Moya, E.M., Le Guelte, A., Lima Fernandes, E., Thirant, C., Dwyer, J., Bidere, N., Couraud, P.-O., Scott, M.G.H., Junier, M.-P., Chneiweiss, H., et al. (2011). Secreted factors from brain endothelial cells maintain glioblastoma stem-like cell expansion through the mTOR pathway. *EMBO Rep.* *12*, 470–476.
- Gangemi, R.M.R., 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 Dayt. Ohio* *27*, 40–48.
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.-C., Lee, Y.-S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., et al. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* *458*, 762–765.
- Garcia-Cao, I., Song, M.S., Hobbs, R.M., Laurent, G., Giorgi, C., de Boer, V.C.J.,



- Anastasiou, D., Ito, K., Sasaki, A.T., Rameh, L., et al. (2012). Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state. *Cell* *149*, 49–62.
- Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., et al. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *370*, 699–708.
- Goldberg, M.S., and Sharp, P.A. (2012). Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression. *J. Exp. Med.* *209*, 217–224.
- Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* *183*, 1797–1806.
- Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, R.B., and Hay, N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev.* *15*, 1406–1418.
- Grigoryan, R.S., Panosyan, E.H., Seibel, N.L., Gaynon, P.S., Avramis, I.A., and Avramis, V.I. (2004). Changes of Amino Acid Serum Levels in Pediatric Patients with Higher-risk Acute Lymphoblastic Leukemia (CCG-1961). *In Vivo* *18*, 107–112.
- Griguer, C.E., Oliva, C.R., Gobin, E., Marcorelles, P., Benos, D.J., Lancaster, J.R., and Gillespie, G.Y. (2008). CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PloS One* *3*, e3655.
- Guo, Y., Liu, S., Wang, P., Zhao, S., Wang, F., Bing, L., Zhang, Y., Ling, E.-A., Gao, J., and Hao, A. (2011). Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology* *59*, 763–775.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hart, A.H., Hartley, L., Ibrahim, M., and Robb, L. (2004). Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *230*, 187–198.
- Hassanein, M., Hoeksema, M.D., Shiota, M., Qian, J., Harris, B.K., Chen, H., Clark, J.E., Alborn, W.E., Eisenberg, R., and Massion, P.P. (2013). SLC1A5 mediates glutamine transport required for lung cancer cell growth and survival. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 560–570.
- Hastak, K., Gupta, S., Ahmad, N., Agarwal, M.K., Agarwal, M.L., and Mukhtar, H. (2003). Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells. *Oncogene* *22*, 4851–4859.
- He, J., Liu, Y., Zhu, T., Zhu, J., Dimeco, F., Vescovi, A.L., Heth, J.A., Muraszko, K.M., Fan, X., and Lubman, D.M. (2012). CD90 is identified as a candidate marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *11*, M111.010744.

- 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 Georget. Tex* 8, 3274–3284.
- Hegi, M.E., Liu, L., Herman, J.G., Stupp, R., Wick, W., Weller, M., Mehta, M.P., and Gilbert, M.R. (2008). Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 4189–4199.
- Heimberger, A.B., Hlatky, R., Suki, D., Yang, D., Weinberg, J., Gilbert, M., Sawaya, R., and Aldape, K. (2005). Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin. Cancer Res.* 11, 1462–1466.
- Helczynska, K., Kronblad, Å., Jögi, A., Nilsson, E., Beckman, S., Landberg, G., and Pählman, S. (2003). Hypoxia Promotes a Dedifferentiated Phenotype in Ductal Breast Carcinoma in Situ. *Cancer Res.* 63, 1441–1444.
- Hennen, E., and Faissner, A. (2012). LewisX: a neural stem cell specific glycan? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 830–833.
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., and Feng, Z. (2010). Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7455–7460.
- Hu, W., Lu, S.-X., Li, M., Zhang, C., Liu, L.-L., Fu, J., Jin, J.-T., Luo, R.-Z., Zhang, C.Z., and Yun, J.-P. (2015). Pyruvate kinase M2 prevents apoptosis via modulating Bim stability and associates with poor outcome in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 6, 6570–6583.
- Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F.-F., O’Sullivan, B., He, Z., Peng, Y., Tan, A.-C., et al. (2011). Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat. Med.* 17, 860–866.
- Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2009). Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 5, 504–514.
- Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Saito, N., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2011). Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *J. Biol. Chem.* 286, 41434–41441.
- Ishitani, R., and Chuang, D.M. (1996). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antisense oligodeoxynucleotides protect against cytosine arabinonucleoside-induced apoptosis in cultured cerebellar neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9937–9941.
- Izquierdo-Garcia, J.L., Cai, L.M., Chaumeil, M.M., Eriksson, P., Robinson, A.E., Pieper, R.O., Phillips, J.J., and Ronen, S.M. (2014). Glioma cells with the IDH1 mutation modulate metabolic fractional flux through pyruvate carboxylase. *PloS One* 9, e108289.
- Jacquín, M.A., Chiche, J., Zunino, B., Bénétéau, M., Meynet, O., Pradelli, L.A., Marchetti, S., Cornille, A., Carles, M., and Ricci, J.-E. (2013). GAPDH binds to active Akt, leading to Bcl-

xL increase and escape from caspase-independent cell death. *Cell Death Differ.* 20, 1043–1054.

Jain, R.K., di Tomaso, E., Duda, D.G., Loeffler, J.S., Sorensen, A.G., and Batchelor, T.T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 610–622.

Jamal, M., Rath, B.H., Williams, E.S., Camphausen, K., and Tofilon, P.J. (2010). Microenvironmental Regulation of Glioblastoma Radioresponse. *Clin. Cancer Res.* 16, 6049–6059.

Jamal, M., Rath, B.H., Tsang, P.S., Camphausen, K., and Tofilon, P.J. (2012). The brain microenvironment preferentially enhances the radioresistance of CD133(+) glioblastoma stem-like cells. *Neoplasia N. Y. N* 14, 150–158.

Jijiwa, M., Demir, H., Gupta, S., Leung, C., Joshi, K., Orozco, N., Huang, T., Yildiz, V.O., Shibahara, I., de Jesus, J.A., et al. (2011). CD44v6 Regulates Growth of Brain Tumor Stem Cells Partially through the AKT-Mediated Pathway. *PLoS ONE* 6, e24217.

Jin, X., Jin, X., Jung, J.-E., Beck, S., and Kim, H. (2013). Cell surface Nestin is a biomarker for glioma stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 433, 496–501.

Jin, Y., Bin, Z.Q., Qiang, H., Liang, C., Hua, C., Jun, D., Dong, W.A., and Qing, L. (2009). ABCG2 is related with the grade of glioma and resistance to mitoxantone, a chemotherapeutic drug for glioma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135, 1369–1376.

Jirmanova, L., Pacholikova, J., Krejci, P., Hampl, A., and Dvorak, P. (1999). O-linked carbohydrates are required for FGF-2-mediated proliferation of mouse embryonic cells. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 555–562.

Jögi, A., Øra, I., Nilsson, H., Lindeheim, Å., Makino, Y., Poellinger, L., Axelson, H., and Pålman, S. (2002). Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7021–7026.

Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683–692.

Joo, K.M., Kim, S.Y., Jin, X., Song, S.Y., Kong, D.-S., Lee, J.-I., Jeon, J.W., Kim, M.H., Kang, B.G., Jung, Y., et al. (2008). Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 88, 808–815.

Kaadige, M.R., Looper, R.E., Kamalanaadhan, S., and Ayer, D.E. (2009). Glutamine-dependent anapleurosis dictates glucose uptake and cell growth by regulating MondoA transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14878–14883.

Kamachi, Y., Uchikawa, M., and Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet. TIG* 16, 182–187.

Kang, M.-K., and Kang, S.-K. (2007). Tumorigenesis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem-like cells in brain glioma. *Stem Cells Dev.* 16, 837–847.

Khan, M.A., Hussain, A., Sundaram, M.K., Alalami, U., Gunasekera, D., Ramesh, L., Hamza, A., and Quraishi, U. (2015). (-)-Epigallocatechin-3-gallate reverses the expression of various tumor-suppressor genes by inhibiting DNA methyltransferases and histone deacetylases in human cervical cancer cells. *Oncol. Rep.* *33*, 1976–1984.

Kim, D.J., Park, Y.S., Kang, M.G., You, Y.-M., Jung, Y., Koo, H., Kim, J.-A., Kim, M.-J., Hong, S.-M., Lee, K.B., et al. (2015). Pyruvate kinase isoenzyme M2 is a therapeutic target of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Exp. Cell Res.*

Kim, E.J., Sahai, V., Abel, E.V., Griffith, K.A., Greenson, J.K., Takebe, N., Khan, G.N., Blau, J.L., Craig, R., Balis, U.G., et al. (2014). Pilot clinical trial of hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 (vismodegib) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 5937–5945.

Kim, H.-R., Roe, J.-S., Lee, J.-E., Cho, E.-J., and Youn, H.-D. (2013). p53 regulates glucose metabolism by miR-34a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *437*, 225–231.

Kim, J.B., Greber, B., Araúzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Schöler, H.R. (2009). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* *461*, 649–643.

Kim, K.-J., Lee, K.-H., Kim, H.-S., Moon, K.-S., Jung, T.-Y., Jung, S., and Lee, M.-C. (2011). The presence of stem cell marker-expressing cells is not prognostically significant in glioblastomas: Stem cell marker and glioblastoma. *Neuropathology* *31*, 494–502.

Kim, S.-J., Jeong, H.-J., Lee, K.-M., Myung, N.-Y., An, N.-H., Yang, W.M., Park, S.K., Lee, H.-J., Hong, S.-H., Kim, H.-M., et al. (2007). Epigallocatechin-3-gallate suppresses NF- $\kappa$ B activation and phosphorylation of p38 MAPK and JNK in human astrocytoma U373MG cells. *J. Nutr. Biochem.* *18*, 587–596.

Krop, I., Demuth, T., Guthrie, T., Wen, P.Y., Mason, W.P., Chinnaiyan, P., Butowski, N., Groves, M.D., Kesari, S., Freedman, S.J., et al. (2012). Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the gamma secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 2307–2313.

Kuo, Y.-C., Su, C.-H., Liu, C.-Y., Chen, T.-H., Chen, C.-P., and Wang, H.-S. (2009). Transforming growth factor- $\beta$  induces CD44 cleavage that promotes migration of MDA-MB-435s cells through the up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Int. J. Cancer* *124*, 2568–2576.

Kurtoglu, M., Gao, N., Shang, J., Maher, J.C., Lehrman, M.A., Wangpaichitr, M., Savaraj, N., Lane, A.N., and Lampidis, T.J. (2007). Under normoxia, 2-deoxy-d-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Mol. Cancer Ther.* *6*, 3049–3058.

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.

- Lavallard, V.J., Pradelli, L.A., Paul, A., Bénétteau, M., Jacquell, A., Auberger, P., and Ricci, J.-E. (2009). Modulation of Caspase-Independent Cell Death Leads to Resensitization of Imatinib Mesylate-Resistant Cells. *Cancer Res.* *69*, 3013–3020.
- Le, A., Cooper, C.R., Gouw, A.M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L.M., Royer, R.E., Vander Jagt, D.L., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 2037–2042.
- 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.-H., Jeyapalan, J.N., Appleby, V., Mohamed Noor, D.A., Sottile, V., and Scotting, P.J. (2010). Dynamic methylation and expression of Oct4 in early neural stem cells. *J. Anat.* *217*, 203–213.
- Li, C., Allen, A., Kwagh, J., Doliba, N.M., Qin, W., Najafi, H., Collins, H.W., Matschinsky, F.M., Stanley, C.A., and Smith, T.J. (2006). Green Tea Polyphenols Modulate Insulin Secretion by Inhibiting Glutamate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* *281*, 10214–10221.
- Li, F., Huang, Q., Chen, J., Peng, Y., Roop, D., Bedford, J.S., and Li, C.-Y. (2010). Apoptotic Cells Activate the “Phoenix Rising” Pathway to Promote Wound Healing and Tissue Regeneration. *Sci. Signal.* *3*, ra13.
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., et al. (2009). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* *15*, 501–513.
- Lim, S.-K., Llaguno, S.R.A., McKay, R.M., and Parada, L.F. (2011). Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models. *BMB Rep.* *44*, 158–164.
- Lin, L.-C., Wang, M.-N., Tseng, T.-Y., Sung, J.-S., and Tsai, T.-H. (2007). Pharmacokinetics of (-)-epigallocatechin-3-gallate in conscious and freely moving rats and its brain regional distribution. *J. Agric. Food Chem.* *55*, 1517–1524.
- Liu, B. -l., Cheng, J. -x., Zhang, X., Wang, R., Zhang, W., Lin, H., Xiao, X., Cai, S., Chen, X. -y., and Cheng, H. (2010). Global Histone Modification Patterns as Prognostic Markers to Classify Glioma Patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *19*, 2888–2896.
- 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.
- Lobo, C., Ruiz-Bellido, M.A., Aledo, J.C., Márquez, J., Núñez De Castro, I., and Alonso, F.J. (2000). Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. *Biochem. J.* *348 Pt 2*, 257–261.

Losman, J.-A., Looper, R.E., Koivunen, P., Lee, S., Schneider, R.K., McMahon, C., Cowley, G.S., Root, D.E., Ebert, B.L., and Kaelin, W.G. (2013). (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science* 339, 1621–1625.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 97–109.

Lu, W.J., Lan, F., He, Q., Lee, A., Tang, C.Z., Dong, L., Lan, B., Ma, X., Wu, J.C., and Shen, L. (2011). Inducible expression of stem cell associated intermediate filament nestin reveals an important role in glioblastoma carcinogenesis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 128, 343–351.

Maher, E.A., Furnari, F.B., Bachoo, R.M., Rowitch, D.H., Louis, D.N., Cavenee, W.K., and DePinho, R.A. (2001). Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 15, 1311–1333.

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.

Mao, P., Joshi, K., Li, J., Kim, S.-H., Li, P., Santana-Santos, L., Luthra, S., Chandran, U.R., Benos, P.V., Smith, L., et al. (2013). Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 8644–8649.

Marie, S.K.N., and Shinjo, S.M.O. (2011). Metabolism and brain cancer. *Clinics* 66, 33–43.

Marin-Valencia, I., Yang, C., Mashimo, T., Cho, S., Baek, H., Yang, X.-L., Rajagopalan, K.N., Maddie, M., Vemireddy, V., Zhao, Z., et al. (2012). Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell Metab.* 15, 827–837.

Maschek, G., Savaraj, N., Priebe, W., Braunschweiger, P., Hamilton, K., Tidmarsh, G.F., Young, L.R.D., and Lampidis, T.J. (2004). 2-Deoxy-d-glucose Increases the Efficacy of Adriamycin and Paclitaxel in Human Osteosarcoma and Non-Small Cell Lung Cancers In Vivo. *Cancer Res.* 64, 31–34.

Masuda, M., Suzui, M., and Weinstein, I.B. (2001). Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 4220–4229.

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., Williams, E.S., Camphausen, K., and Tofilon, P.J. (2009). CD133+ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 5145–5153.

- McFate, T., Mohyeldin, A., Lu, H., Thakar, J., Henriques, J., Halim, N.D., Wu, H., Schell, M.J., Tsang, T.M., Teahan, O., et al. (2008). Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 22700–22708.
- McGivan, J.D., and Bungard, C.I. (2007). The transport of glutamine into mammalian cells. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *12*, 874–882.
- Mendler, A.N., Hu, B., Prinz, P.U., Kreutz, M., Gottfried, E., and Noessner, E. (2012). Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *131*, 633–640.
- Meng, M.-B., Wang, H.-H., Guo, W.-H., Wu, Z.-Q., Zeng, X.-L., Zaorsky, N.G., Shi, H.-S., Qian, D., Niu, Z.-M., Jiang, B., et al. (2015). Targeting pyruvate kinase M2 contributes to radiosensitivity of non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* *356*, 985–993.
- Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C.M., Johnson, Z.R., Irvine, D.J., Guarente, L., et al. (2012). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* *481*, 380–384.
- Meyer, M., Reimand, J., Lan, X., Head, R., Zhu, X., Kushida, M., Bayani, J., Pressey, J.C., Lionel, A.C., Clarke, I.D., et al. (2015). Single cell-derived clonal analysis of human glioblastoma links functional and genomic heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 851–856.
- 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*, 31ra34–31ra34.
- Milligan, S.A., Burke, P., Coleman, D.T., Bigelow, R.L., Steffan, J.J., Carroll, J.L., Williams, B.J., and Cardelli, J.A. (2009). The green tea polyphenol EGCG potentiates the antiproliferative activity of c-Met and epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 4885–4894.
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K., and Buck, D.W. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* *90*, 5013–5021.
- Morfouace, M., Lalier, L., Bahut, M., Bonnamain, V., Naveilhan, P., Guette, C., Oliver, L., Gueguen, N., Reynier, P., and Vallette, F.M. (2012). Comparison of Spheroids Formed by Rat Glioma Stem Cells and Neural Stem Cells Reveals Differences in Glucose Metabolism and Promising Therapeutic Applications. *J. Biol. Chem.* *287*, 33664–33674.
- Morfouace, M., Lalier, L., Oliver, L., Cheray, M., Pecqueur, C., Cartron, P.-F., and Vallette, F.M. (2014). Control of glioma cell death and differentiation by PKM2-Oct4 interaction. *Cell Death Dis.* *5*, e1036.
- Mullen, A.R., Wheaton, W.W., Jin, E.S., Chen, P.-H., Sullivan, L.B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W.M., Chandel, N.S., and DeBerardinis, R.J. (2012). Reductive carboxylation

- supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* *481*, 385–388.
- Murugan, A.K., Bojdani, E., and Xing, M. (2010). Identification and functional characterization of isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) mutations in thyroid cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *393*, 555–559.
- Najy, A.J., Day, K.C., and Day, M.L. (2008). ADAM15 Supports Prostate Cancer Metastasis by Modulating Tumor Cell-Endothelial Cell Interaction. *Cancer Res.* *68*, 1092–1099.
- Nakamura, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2001a). Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *81*, 77–82.
- Nakamura, M., Watanabe, T., Klangby, U., Asker, C., Wiman, K., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2001b). p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *11*, 159–168.
- Navis, A.C., Niclou, S.P., Fack, F., Stieber, D., van Lith, S., Verrijp, K., Wright, A., Stauber, J., Tops, B., Otte-Holler, I., et al. (2013). Increased mitochondrial activity in a novel IDH1-R132H mutant human oligodendroglioma xenograft model: in situ detection of 2-HG and  $\alpha$ -KG. *Acta Neuropathol Commun* *1*, 18–29.
- Nduom, E.K.-E., Hadjipanayis, C.G., and Van Meir, E.G. (2012). Glioblastoma Cancer Stem-Like Cells: Implications for Pathogenesis and Treatment. *Cancer J.* *18*, 100–106.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, 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.
- Niu, C.-S., Li, D.-X., Liu, Y.-H., Fu, X.-M., Tang, S.-F., and Li, J. (2011). Expression of NANOG in human gliomas and its relationship with undifferentiated glioma cells. *Oncol. Rep.* *26*, 593–601.
- Noushmehr, H., Weisenberger, D.J., Diefes, K., Phillips, H.S., Pujara, K., Berman, B.P., Pan, F., Pelloski, C.E., Sulman, E.P., Bhat, K.P., et al. (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* *17*, 510–522.
- Nutt, C.L., Mani, D.R., Betensky, R.A., Tamayo, P., Cairncross, J.G., Ladd, C., Pohl, U., Hartmann, C., McLaughlin, M.E., Batchelor, T.T., et al. (2003). Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res.* *63*, 1602–1607.
- O'Brien, C.A., Kreso, A., and Jamieson, C.H.M. (2010). Cancer Stem Cells and Self-renewal. *Clin. Cancer Res.* *16*, 3113–3120.
- 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 514–515.



- Oh, S., Gwak, J., Park, S., and Yang, C.S. (2014). Green tea polyphenol EGCG suppresses Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by promoting GSK-3 $\beta$ - and PP2A-independent  $\beta$ -catenin phosphorylation/degradation. *BioFactors Oxf. Engl.* *40*, 586–595.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci.* *100*, 2235–2241.
- Okamoto, I. (2001). Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *J. Cell Biol.* *155*, 755–762.
- Okamoto, Y., Di Patre, P.-L., Burkhard, C., Horstmann, S., Jourde, B., Fahey, M., Schüler, D., Probst-Hensch, N.M., Yasargil, M.G., Yonekawa, Y., et al. (2004). Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *108*, 49–56.
- Olmez, I., Shen, W., McDonald, H., and Ozpolat, B. (2015). Dedifferentiation of patient-derived glioblastoma multiforme cell lines results in a cancer stem cell-like state with mitogen-independent growth. *J. Cell. Mol. Med.* *19*, 1262–1272.
- Osada, T., Nagashima, I., Tsuno, N.H., Kitayama, J., and Nagawa, H. (2000). Prognostic significance of glutamine synthetase expression in unifocal advanced hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* *33*, 247–253.
- Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L.A., and Dang, C.V. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* *275*, 21797–21800.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., 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. (2005). Activation of Glycogen Synthase Kinase 3 Disrupts the Binding of Hexokinase II to Mitochondria by Phosphorylating Voltage-Dependent Anion Channel and Potentiates Chemotherapy-Induced Cytotoxicity. *Cancer Res.* *65*, 10545–10554.
- 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.
- Patel, A.P., Tirosh, I., Trombetta, J.J., Shalek, A.K., Gillespie, S.M., Wakimoto, H., Cahill, D.P., Nahed, B.V., Curry, W.T., Martuza, R.L., et al. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* *344*, 1396–1401.
- 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 glioma-neuronal tumors. *BMC Cancer* *10*, 66.
- Pavlidis, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Frank, P.G., Casimiro, M.C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., et al. (2009). The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma.

Cell Cycle 8, 3984–4001.

Pavon, L.F., Marti, L.C., Sibov, T.T., Malheiros, S.M.F., Brandt, R.A., Cavalheiro, S., and Gamarra, L.F. (2014). In vitro Analysis of Neurospheres Derived from Glioblastoma Primary Culture: A Novel Methodology Paradigm. *Front. Neurol.* 4, 214.

Pecqueur, C., Oliver, L., Oizel, K., Lalier, L., and Vallette, F.M. (2013). Targeting metabolism to induce cell death in cancer cells and cancer stem cells. *Int. J. Cell Biol.* 2013, 805975.

Peereboom, D.M., Shepard, D.R., Ahluwalia, M.S., Brewer, C.J., Agarwal, N., Stevens, G.H.J., Suh, J.H., Toms, S.A., Vogelbaum, M.A., Weil, R.J., et al. (2010). Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* 98, 93–99.

Perlstein, B., Finnis, S.A., Miller, C., Okhrimenko, H., Kazimirsky, G., Cazacu, S., Lee, H.K., Lemke, N., Brodie, S., Umansky, F., et al. (2013). TRAIL conjugated to nanoparticles exhibits increased anti-tumor activities in glioma cells and glioma stem cells in vitro and in vivo. *Neuro-Oncol.* 15, 29–40.

Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., et al. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157–173.

Pietras, A., Katz, A.M., Ekström, E.J., Wee, B., Halliday, J.J., Pitter, K.L., Werbeck, J.L., Amankolor, N.M., Huse, J.T., and Holland, E.C. (2014). Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell* 14, 357–369.

Pistollato, F., Abbadi, S., Rampazzo, E., Persano, L., Della Puppa, A., Frasson, C., Sarto, E., Scienza, R., D'avella, D., and Basso, G. (2010). Intratumoral Hypoxic Gradient Drives Stem Cells Distribution and MGMT Expression in Glioblastoma. *STEM CELLS* 28, 851–862.

Platet, N., Liu, S.Y., Atifi, M.E., Oliver, L., Vallette, F.M., Berger, F., and Wion, D. (2007). Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett.* 258, 286–290.

Pochini, L., Scalise, M., Galluccio, M., and Indiveri, C. (2014). Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. *Cell. Biochem.* 2, 61.

Pouysségur, J., Dayan, F., and Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437–443.

Preusser, M., de Ribaupierre, S., Wöhrer, A., Erridge, S.C., Hegi, M., Weller, M., and Stupp, R. (2011). Current concepts and management of glioblastoma. *Ann. Neurol.* 70, 9–21.

Prigione, A., Fauler, B., Lurz, R., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2010). The Senescence-Related Mitochondrial/Oxidative Stress Pathway is Repressed in Human Induced Pluripotent

Stem Cells. *STEM CELLS* 28, 721–733.

Puisségur, M.-P., Mazure, N.M., Bertero, T., Pradelli, L., Grosso, S., Robbe-Sermesant, K., Maurin, T., Lebrigand, K., Cardinaud, B., Hofman, V., et al. (2011). miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. *Cell Death Differ.* 18, 465–478.

Qiu, Z.-K., Shen, D., Chen, Y.-S., Yang, Q.-Y., Guo, C.-C., Feng, B.-H., and Chen, Z.-P. (2014). Enhanced MGMT expression contributes to temozolomide resistance in glioma stem-like cells. *Chin. J. Cancer* 33, 115–122.

Raez, L.E., Papadopoulos, K., Ricart, A.D., Chiorean, E.G., Dipaola, R.S., Stein, M.N., Rocha Lima, C.M., Schlesselman, J.J., Tolba, K., Langmuir, V.K., et al. (2013). A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71, 523–530.

Rao, S.A., Santosh, V., and Somasundaram, K. (2010). Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma. *Mod. Pathol.* 23, 1404–1417.

Reitzer, L.J., Wice, B.M., and Kennell, D. (1979). Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 254, 2669–2676.

Ren, P., Yue, M., Xiao, D., Xiu, R., Gan, L., Liu, H., and Qing, G. (2015). ATF4 and N-Myc coordinate glutamine metabolism in MYCN-amplified neuroblastoma cells through ASCT2 activation. *J. Pathol.* 235, 90–100.

Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M., et al. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468, 824–828.

Riemenschneider, M.J., Jeuken, J.W.M., Wesseling, P., and Reifenberger, G. (2010). Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 120, 567–584.

Roberts, D.J., Tan-Sah, V.P., Ding, E.Y., Smith, J.M., and Miyamoto, S. (2014). Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition. *Mol. Cell* 53, 521–533.

Rofstad, E.K. (2006). Acidic Extracellular pH Promotes Experimental Metastasis of Human Melanoma Cells in Athymic Nude Mice. *Cancer Res.* 66, 6699–6707.

Ropolo, M., Daga, A., Griffero, F., Foresta, M., Casartelli, G., Zunino, A., Poggi, A., Cappelli, E., Zona, G., Spaziante, R., et al. (2009). Comparative Analysis of DNA Repair in Stem and Nonstem Glioma Cell Cultures. *Mol. Cancer Res.* 7, 383–392.

Rosati, A., Poliani, P.L., Todeschini, A., Cominelli, M., Medicina, D., Cenzato, M., Simoncini, E.L., Magrini, S.M., Buglione, M., Grisanti, S., et al. (2013). Glutamine synthetase expression as a valuable marker of epilepsy and longer survival in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncol.* 15, 618–625.

Sawamoto, K., Nakao, N., Kakishita, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Yamamoto, A.,

- Yamaguchi, M., Mori, K., Goldman, S.A., Itakura, T., et al. (2001). Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 3895–3903.
- Schonberg, D.L., Lubelski, D., Miller, T.E., and Rich, J.N. (2014). Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. *Mol. Aspects Med.* *39*, 82–101.
- Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M., and Karnieli, E. (2004). The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res.* *64*, 2627–2633.
- Seidel, S., Garvalov, B.K., Wirta, V., von Stechow, L., Schänzer, A., Meletis, K., Wolter, M., Sommerlad, D., Henze, A.-T., Nistér, M., et al. (2010). A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain J. Neurol.* *133*, 983–995.
- Seltzer, M.J., Bennett, B.D., Joshi, A.D., Gao, P., Thomas, A.G., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., Rojas, C.J., Slusher, B.S., Rabinowitz, J.D., et al. (2010). Inhibition of glutaminase preferentially slows growth of glioma cells with mutant IDH1. *Cancer Res.* *70*, 8981–8987.
- Shankar, S., Kumar, D., and Srivastava, R.K. (2013). Epigenetic modifications by dietary phytochemicals: implications for personalized nutrition. *Pharmacol. Ther.* *138*, 1–17.
- Shelton, L.M., Huysentruyt, L.C., and Seyfried, T.N. (2010). Glutamine targeting inhibits systemic metastasis in the VM-M3 murine tumor model. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *127*, 2478–2485.
- Sheng, S.L., Liu, J.J., Dai, Y.H., Sun, X.G., Xiong, X.P., and Huang, G. (2012). Knockdown of lactate dehydrogenase A suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *FEBS J.* *279*, 3898–3910.
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B.C., Wu, C.S., Dang, G., Jungmann, R.A., Dalla-Favera, R., and Dang, C.V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 6658–6663.
- Shime, H., Yabu, M., Akazawa, T., Kodama, K., Matsumoto, M., Seya, T., and Inoue, N. (2008). Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 7175–7183.
- Simpson, N.E., Tryndyak, V.P., Pogribna, M., Beland, F.A., and Pogribny, I.P. (2012). Modifying metabolically sensitive histone marks by inhibiting glutamine metabolism affects gene expression and alters cancer cell phenotype. *Epigenetics* *7*, 1413–1420.
- 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-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Röntgenes. Al* *181*, 507–514.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Hide, T., and Dirks, P.B. (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* *23*, 7267–7273.

- Skrtić, M., Sriskanthadevan, S., Jhas, B., Gebbia, M., Wang, X., Wang, Z., Hurren, R., Jitkova, Y., Gronda, M., Maclean, N., et al. (2011). Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 20, 674–688.
- Son, J., Lyssiotis, C.A., Ying, H., Wang, X., Hua, S., Ligorio, M., Perera, R.M., Ferrone, C.R., Mullarky, E., Shyh-Chang, N., et al. (2013). Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature* 496, 101–105.
- 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.
- Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M.C., Verrax, J., Rabbani, Z.N., De Saedeleer, C.J., Kennedy, K.M., Diepart, C., Jordan, B.F., et al. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 3930–3942.
- Sonveaux, P., Copetti, T., De Saedeleer, C.J., Végran, F., Verrax, J., Kennedy, K.M., Moon, E.J., Dhup, S., Danhier, P., Frérart, F., et al. (2012). Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One* 7, e33418.
- Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S.G.M., Touloumis, A., Collins, V.P., Marioni, J.C., Curtis, C., Watts, C., and Tavaré, S. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 4009–4014.
- Srinivasan, S., Patric, I.R.P., and Somasundaram, K. (2011). A Ten-microRNA Expression Signature Predicts Survival in Glioblastoma. *PLoS ONE* 6, e17438.
- Stacpoole, P.W., Lorenz, A.C., Thomas, R.G., and Harman, E.M. (1988). Dichloroacetate in the treatment of lactic acidosis. *Ann. Intern. Med.* 108, 58–63.
- Steták, A., Veress, R., Ovádi, J., Csermely, P., Kéri, G., and Ullrich, A. (2007). Nuclear Translocation of the Tumor Marker Pyruvate Kinase M2 Induces Programmed Cell Death. *Cancer Res.* 67, 1602–1608.
- Strojnjk, T., Røsland, G.V., Sakariassen, P.O., Kavalari, R., and Lah, T. (2007). Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surg. Neurol.* 68, 133–143; discussion 143–144.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459–466.
- Sunaga, K., Takahashi, H., Chuang, D.M., and Ishitani, R. (1995). Glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase is over-expressed during apoptotic death of neuronal cultures and is recognized by a monoclonal antibody against amyloid plaques from Alzheimer's brain. *Neurosci. Lett.* *200*, 133–136.

Suzuki, A., Maeda, T., Baba, Y., Shimamura, K., and Kato, Y. (2014). Acidic extracellular pH promotes epithelial mesenchymal transition in Lewis lung carcinoma model. *Cancer Cell Int.* *14*, 129.

Tamura, K., Aoyagi, M., Wakimoto, H., Ando, N., Nariai, T., Yamamoto, M., and Ohno, K. (2010). Accumulation of CD133-positive glioma cells after high-dose irradiation by Gamma Knife surgery plus external beam radiation. *J. Neurosurg.* *113*, 310–318.

Thangapazham, R.L., Passi, N., and Maheshwari, R.K. (2007). Green tea polyphenol and epigallocatechin gallate induce apoptosis and inhibit invasion in human breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* *6*, 1938–1943.

Thibault, A., Cooper, M.R., Figg, W.D., Venzon, D.J., Sartor, A.O., Tompkins, A.C., Weinberger, M.S., Headlee, D.J., McCall, N.A., and Samid, D. (1994). A phase I and pharmacokinetic study of intravenous phenylacetate in patients with cancer. *Cancer Res.* *54*, 1690–1694.

Thornburg, J.M., Nelson, K.K., Clem, B.F., Lane, A.N., Arumugam, S., Simmons, A., Eaton, J.W., Telang, S., and Chesney, J. (2008). Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* *10*, R84.

Tomlinson, I.P.M., Alam, N.A., Rowan, A.J., Barclay, E., Jaeger, E.E.M., Kelsell, D., Leigh, I., Gorman, P., Lamlum, H., Rahman, S., et al. (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat. Genet.* *30*, 406–410.

Ulasov, I.V., Nandi, S., Dey, M., Sonabend, A.M., and Lesniak, M.S. (2011). Inhibition of Sonic Hedgehog and Notch Pathways Enhances Sensitivity of CD133+ Glioma Stem Cells to Temozolomide Therapy. *Mol. Med.* *17*, 103–112.

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., Christofk, H.R., Schuman, E., Subtelny, A.O., Sharfi, H., Harlow, E.E., Xian, J., and Cantley, L.C. (2010). Identification of small molecule inhibitors of pyruvate kinase M2. *Biochem. Pharmacol.* *79*, 1118–1124.

Végran, F., Boidot, R., Michiels, C., Sonveaux, P., and Feron, O. (2011). Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF- $\kappa$ B/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res.* *71*, 2550–2560.

Venneti, S., Dunphy, M.P., Zhang, H., Pitter, K.L., Zanzonico, P., Campos, C., Carlin, S.D., La Rocca, G., Lyashchenko, S., Ploessl, K., et al. (2015). Glutamine-based PET imaging facilitates enhanced metabolic evaluation of gliomas in vivo. *Sci. Transl. Med.* *7*, 274ra17–ra274ra17.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.

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.

Vlashi, E., Lagadec, C., Vergnes, L., Matsutani, T., Masui, K., Poulou, M., Popescu, R., Della Donna, L., Evers, P., Dekmezian, C., et al. (2011). Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16062–16067.

Wan, F., Herold-Mende, C., Campos, B., Centner, F.-S., Dictus, C., Becker, N., Devens, F., Mogler, C., Felsberg, J., Grabe, N., et al. (2011). Association of stem cell-related markers and survival in astrocytic gliomas. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 16, 136–143.

Wang, J., Sakariassen, P.Ø., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Bøe, S.O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Røsland, 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 J. Int. Cancer* 122, 761–768.

Wang, J., Wakeman, T.P., Lathia, J.D., Hjelmeland, A.B., Wang, X.-F., White, R.R., Rich, J.N., and Sullenger, B.A. (2010a). Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 17–28.

Wang, J.-B., Erickson, J.W., Fujii, R., Ramachandran, S., Gao, P., Dinavahi, R., Wilson, K.F., Ambrosio, A.L.B., Dias, S.M.G., Dang, C.V., et al. (2010b). Targeting Mitochondrial Glutaminase Activity Inhibits Oncogenic Transformation. *Cancer Cell* 18, 207–219.

Wang, Q., Beaumont, K.A., Otte, N.J., Font, J., Bailey, C.G., van Geldermalsen, M., Sharp, D.M., Tiffen, J.C., Ryan, R.M., Jormakka, M., et al. (2014). Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 135, 1060–1071.

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

Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K.E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C., and Tabar, V. (2010c). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468, 829–833.

Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270.

Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* 8, 519–530.

Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009). IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas. *Am. J. Pathol.* 174,

1149–1153.

Wei, K.-C., Huang, C.-Y., Chen, P.-Y., Feng, L.-Y., Wu, T.-W.E., Chen, S.-M., Tsai, H.-C., Lu, Y.-J., Tsang, N.-M., Tseng, C.-K., et al. (2010). Evaluation of the prognostic value of CD44 in glioblastoma multiforme. *Anticancer Res.* *30*, 253–259.

Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., and Huttner, W.B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 12425–12430.

Weller, M., Berger, H., Hartmann, C., Schramm, J., Westphal, M., Simon, M., Goldbrunner, R., Krex, D., Steinbach, J.P., Ostertag, C.B., et al. (2007). Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker? *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 6933–6937.

Wen, P.Y., and Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* *359*, 492–507.

Wick, A.N., Drury, D.R., Nakada, H.I., Wolfe, J.B., and Grabowski, W. the technical assistance of B.B. and R. (1957). Localization of the Primary Metabolic Block Produced by 2-Deoxyglucose. *J. Biol. Chem.* *224*, 963–969.

Willems, L., Jacque, N., Jacquet, A., Neveux, N., Maciel, T.T., Lambert, M., Schmitt, A., Poulain, L., Green, A.S., Uzunov, M., et al. (2013). Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood* *122*, 3521–3532.

Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., et al. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 18782–18787.

Wise, D.R., Ward, P.S., Shay, J.E.S., Cross, J.R., Gruber, J.J., Sachdeva, U.M., Platt, J.M., DeMatteo, R.G., Simon, M.C., and Thompson, C.B. (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 19611–19616.

Wong, H.-K.A., Fatimy, R.E., Onodera, C., Wei, Z., Yi, M., Mohan, A., Gowrisankaran, S., Karmali, P., Marcusson, E., Wakimoto, H., et al. (2015). The Cancer Genome Atlas Analysis Predicts MicroRNA for Targeting Cancer Growth and Vascularization in Glioblastoma. *Mol. Ther.*

Xian, Z.-Y., Liu, J.-M., Chen, Q.-K., Chen, H.-Z., Ye, C.-J., Xue, J., Yang, H.-Q., Li, J.-L., Liu, X.-F., and Kuang, S.-J. (2015). Inhibition of LDHA suppresses tumor progression in prostate cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*

Xiang, Y., Stine, Z.E., Xia, J., Lu, Y., O'Connor, R.S., Altman, B.J., Hsieh, A.L., Gouw, A.M., Thomas, A.G., Gao, P., et al. (2015). Targeted inhibition of tumor-specific glutaminase diminishes cell-autonomous tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* *125*, 2293–2306.



Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.-H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M.-T., et al. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* *19*, 17–30.

Yalcin, A., Clem, B.F., Simmons, A., Lane, A., Nelson, K., Clem, A.L., Brock, E., Siow, D., Wattenberg, B., Telang, S., et al. (2009). Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* *284*, 24223–24232.

Yalcin, A., Clem, B.F., Imbert-Fernandez, Y., Ozcan, S.C., Peker, S., O’Neal, J., Klarer, A.C., Clem, A.L., Telang, S., and Chesney, J. (2014). 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death Dis.* *5*, e1337.

Yan, G.-N., Yang, L., Lv, Y.-F., Shi, Y., Shen, L.-L., Yao, X.-H., Guo, Q.-N., Zhang, P., Cui, Y.-H., Zhang, X., et al. (2014a). Endothelial cells promote stem-like phenotype of glioma cells through activating the Hedgehog pathway. *J. Pathol.* *234*, 11–22.

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. (2009a). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* *360*, 765–773.

Yan, H., Bigner, D.D., Velculescu, V., and Parsons, D.W. (2009b). Mutant Metabolic Enzymes Are at the Origin of Gliomas. *Cancer Res.* *69*, 9157–9159.

Yan, W., Li, R., Liu, Y., Yang, P., Wang, Z., Zhang, C., Bao, Z., Zhang, W., You, Y., and Jiang, T. (2014b). MicroRNA expression patterns in the malignant progression of gliomas and a 5-microRNA signature for prognosis. *Oncotarget*.

Yang, C., Ko, B., Hensley, C.T., Jiang, L., Wasti, A.T., Kim, J., Sudderth, J., Calvaruso, M.A., Lumata, L., Mitsche, M., et al. (2014). Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Mol. Cell* *56*, 414–424.

Ylagan, L.R., and Quinn, B. (1997). CD44 expression in astrocytic tumors. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *10*, 1239–1246.

Yoshida, T., Matsuda, Y., Naito, Z., and Ishiwata, T. (2012). CD44 in human glioma correlates with histopathological grade and cell migration. *Pathol. Int.* *62*, 463–470.

Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R., and Lazebnik, Y. (2007). Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J. Cell Biol.* *178*, 93–105.

Zahonero, C., Aguilera, P., Ramirez-Castillejo, C., Pajares, M., Bolos, M.V., Cantero, D., Perez-Nunez, A., Hernandez-Lain, A., Sanchez-Gomez, P., and Sepulveda, J.M. (2015). Preclinical test of dacomitinib, an irreversible EGFR inhibitor, confirms its effectiveness for glioblastoma. *Mol. Cancer Ther.*

Zarkoob, H., Taube, J.H., Singh, S.K., Mani, S.A., and Kohandel, M. (2013). Investigating the link between molecular subtypes of glioblastoma, epithelial-mesenchymal transition, and

CD133 cell surface protein. *PLoS One* 8, e64169.

Zbinden, M., Duquet, A., Lorente-Trigos, A., Ngwabyt, S.-N., Borges, I., and Ruiz i Altaba, A. (2010). NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J.* 29, 2659–2674.

Zhang, X., Fryknäs, M., Hernlund, E., Fayad, W., De Mito, A., Olofsson, M.H., Gogvadze, V., Dang, L., Pålman, S., Schughart, L.A.K., et al. (2014). Induction of mitochondrial dysfunction as a strategy for targeting tumour cells in metabolically compromised microenvironments. *Nat. Commun.* 5, 3295.

Zhao, J., Ma, W., and Zhao, H. (2014). Loss of heterozygosity 1p/19q and survival in glioma: a meta-analysis. *Neuro-Oncol.* 16, 103–112.

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.

Zhou, M., Zhao, Y., Ding, Y., Liu, H., Liu, Z., Fodstad, O., Riker, A.I., Kamarajugadda, S., Lu, J., Owen, L.B., et al. (2010). Warburg effect in chemosensitivity: Targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes Taxol-resistant cancer cells to Taxol. *Mol. Cancer* 9, 33.

Zhu, T.S., Costello, M.A., Talsma, C.E., Flack, C.G., Crowley, J.G., Hamm, L.L., He, X., Hervey-Jumper, S.L., Heth, J.A., Muraszko, K.M., et al. (2011). Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer Res.* 71, 6061–6072.

Zouaoui, S., Rigau, V., Mathieu-Daudé, H., Darlix, A., Bessaoud, F., Fabbro-Peray, P., Bauchet, F., Kerr, C., Fabbro, M., Figarella-Branger, D., et al. (2012). Recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central : résultats généraux sur 40 000 cas, principales applications actuelles et perspectives. *Neurochirurgie* 58, 4–13.

Médecine personnalisée du cancer à portée de mains.

# **ANNEXE**

# Radiation-induced PGE<sub>2</sub> sustains human glioma cell growth and survival through EGF signaling

Emeline Brocard<sup>1,2,\*</sup>, Kristell Oizel<sup>1,2,\*</sup>, Lisenn Lalier<sup>1,2,3</sup>, Claire Pecqueur<sup>1,2</sup>, François Paris<sup>1,2,3</sup>, François M. Vallette<sup>1,2,3</sup>, Lisa Oliver<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers UMR INSERM 892, CNRS 6299, Université de Nantes, 44007 Nantes, France

<sup>2</sup>Université de Nantes, Faculté de Médecine, 44007 Nantes, France

<sup>3</sup>LaBCT, Institut de Cancérologie de l'Ouest, 44805 St Herblain cedex, France

<sup>4</sup>CHU de Nantes, 1 Place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France

\*These authors have contributed equally to this work

## Correspondence to:

Lisa Oliver, e-mail: lisa.oliver@univ-nantes.fr

François M. Vallette, e-mail: francois.vallette@inserm.fr

**Keywords:** Radiation, caspase, prostaglandin, glioblastoma, EGFR

**Received:** December 08, 2014

**Accepted:** January 16, 2015

**Published:** February 25, 2015

## ABSTRACT

***Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most common brain cancer in adults. Radiotherapy (RT) is the most effective post-operative treatment for the patients even though GBM is one of the most radio-resistant tumors. Dead or dying cells within the tumor are thought to promote resistance to treatment through mechanisms that are very poorly understood. We have evaluated the role of Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>), a versatile bioactive lipid, in GBM radio-resistance. We used an *in vitro* approach using 3D primary cultures derived from representative GBM patients. We show that irradiated glioma cells produced and released PGE<sub>2</sub> in important quantities independently of the induction of cell death. We demonstrate that the addition of PGE<sub>2</sub> enhances cell survival and proliferation through its ability to trans-activate the Epithelial Growth Factor receptor (EGFR) and to activate  $\beta$ -catenin. Indeed, PGE<sub>2</sub> can substitute for EGF to promote primary cultures survival and growth *in vitro* and the effect is likely to occur through the Prostaglandin E2 receptor EP2.***

## INTRODUCTION

Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most common form of brain cancer in the adult and its prognosis remains poor. Standard therapy includes surgery followed by external beam radiotherapy (RT) and/or chemotherapy, principally temozolomide (TMZ), a DNA alkylating/methylating agent [1]. However, the effect of TMZ is beneficiary only to a subset of patients that do not express O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), a DNA repair enzyme [2]. GBM appear to be intrinsically extremely radio-resistant and this has been linked to the presence of cancer stem cells (CSC), which are efficient in repairing DNA damage [3]. Radiation resistance has also been linked to glioma heterogeneity [4], the lack of apoptosis [5] or activation of Wnt/ $\beta$ -catenin, Notch, EGF receptors and kinase signaling pathways [6–9].

Recent results have shown that RT induced a mitogenic signal that could originate from dying tumor and stromal cells [10]. Huang *et al.* [11] further demonstrated that after caspase activation dying cells released the bioactive lipid prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>), which in turn was capable of triggering tumor repopulation. The ability of PGE<sub>2</sub> to stimulate the proliferation of numerous types of cells has been shown both *in vivo* and *in vitro* and enzymes implicated in the synthesis of this prostanoid, such as cyclooxygenase 2 (Cox2), have been considered as a major target for anti-cancer therapies [10]. PGE<sub>2</sub> is implicated in numerous mechanisms including the induction of cell migration to inflammation that can affect in cancer progression in various different ways. PGE<sub>2</sub> has been shown to induce the synthesis of Bcl-2, a major anti-apoptotic protein in colon cancer and as such could directly control apoptosis [12]. On the other hand, we have shown

that intracellular PGE<sub>2</sub> triggers Bax, a pro-apoptotic protein, activation and as such would participate in the induction of apoptosis in both glioma and colon cancer [13–15]. These results suggest that PGE<sub>2</sub> may play multiple and somewhat contradictory roles during cancer progression.

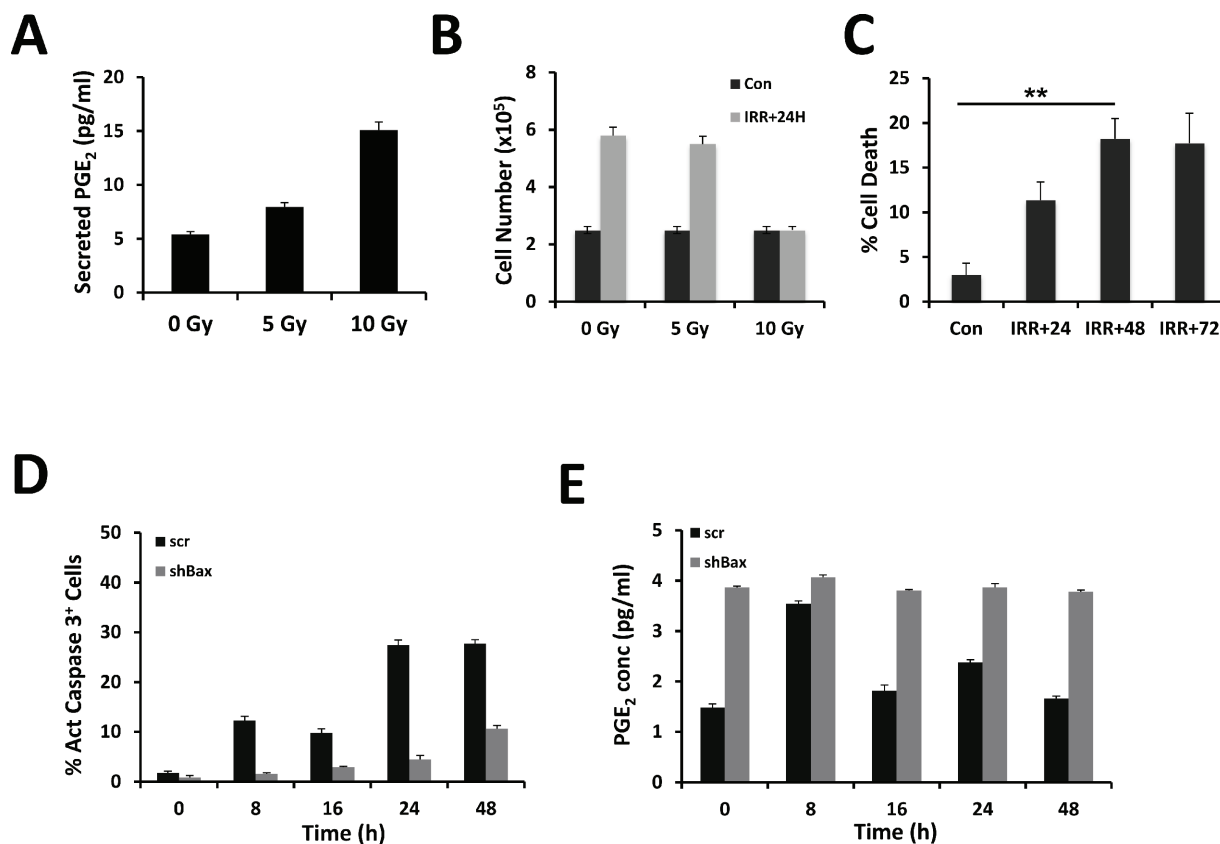
In the present study, we addressed the question of the role PGE<sub>2</sub> on tumor progression and survival, using primary cultures derived from human GBM grown in 3D-cultures.

## RESULTS

### Irradiation of the human glioma cell line U251 induces the production of PGE<sub>2</sub> without activation of caspase 3 or apoptosis

The accumulation of PGE<sub>2</sub> was measured 24 h after  $\gamma$ -irradiation of the human glioma cell line U251 at different intensities (i.e. 0, 5 and 10 Gy). As shown in Figure 1A, the amount of PGE<sub>2</sub> found in the culture supernatant was proportional to the dose of radiation. Recent results have

associated the induction of caspase activity in cancer cells to the production of PGE<sub>2</sub> upon irradiation of cancer cells [11, 13–15]. We then assessed the viability of the cells under our conditions and found that only the high dose of irradiation (10 Gy) provoked a cell growth arrest and subsequent cell death after 48 h (Figure 1B, 1C). To determine whether the cell death was caspase 3 dependent, the number of active caspase 3 cells was quantified. As seen in Figure 1D, there was a close correlation between the percent of cell death and the percent of active caspase 3 cells. To evaluate the implication of caspase in the production of PGE<sub>2</sub>, we knocked down the expression of Bax, a central pro-apoptotic member of the BCL-2 family, in U251 cells. As illustrated in Figure 1D, we observed a significant decrease in the induction of caspase 3 activity in the absence of Bax after  $\gamma$ -irradiation at 10 Gy. However, quite surprisingly, the knock down of Bax appeared to promote the production of PGE<sub>2</sub> in untreated U251 cells and the amount of PGE<sub>2</sub> is maintained upon irradiation (Figure 1E), as previously observed in primary cultures of GBM [14]. Of note, the



**Figure 1: Release of PGE<sub>2</sub> from  $\gamma$ -irradiated cells.** U251 cells were irradiated in serum-free medium at the indicated dose. PGE<sub>2</sub> secretion was measured in supernatants after 24 h. The concentration of PGE<sub>2</sub> (pg/ml) released from irradiated U251 cells was determined using an ELISA (see materials and methods) (A). Cell viability was determined by trypan blue exclusion using the Countess automatic cell counter (Life Technologies), 24 h after irradiation of U251 cells (B). Cell death was estimated as above at 24 h, 48 h and 72 h post-irradiation (C). U251 cells were transduced with shRNA encoding viral particles [either encoding for a non-relevant shRNA (scr) or shRNA directed against Bax mRNA]. Cells were irradiated in serum-free medium at 10 Gy; harvested at the indicated time points, fixed and labeled with active caspase 3 antibody coupled to a fluorescent secondary antibody. The percentage of labeled cells was assessed by flow cytometry (D). The corresponding PGE<sub>2</sub> secretion was measured in supernatants during 48 h after irradiation at 5 Gy (E). Please note that in the latter experiments, the secretion of PGE<sub>2</sub> was decreased in scr-treated U251 compared to untreated cells (compare A and E).

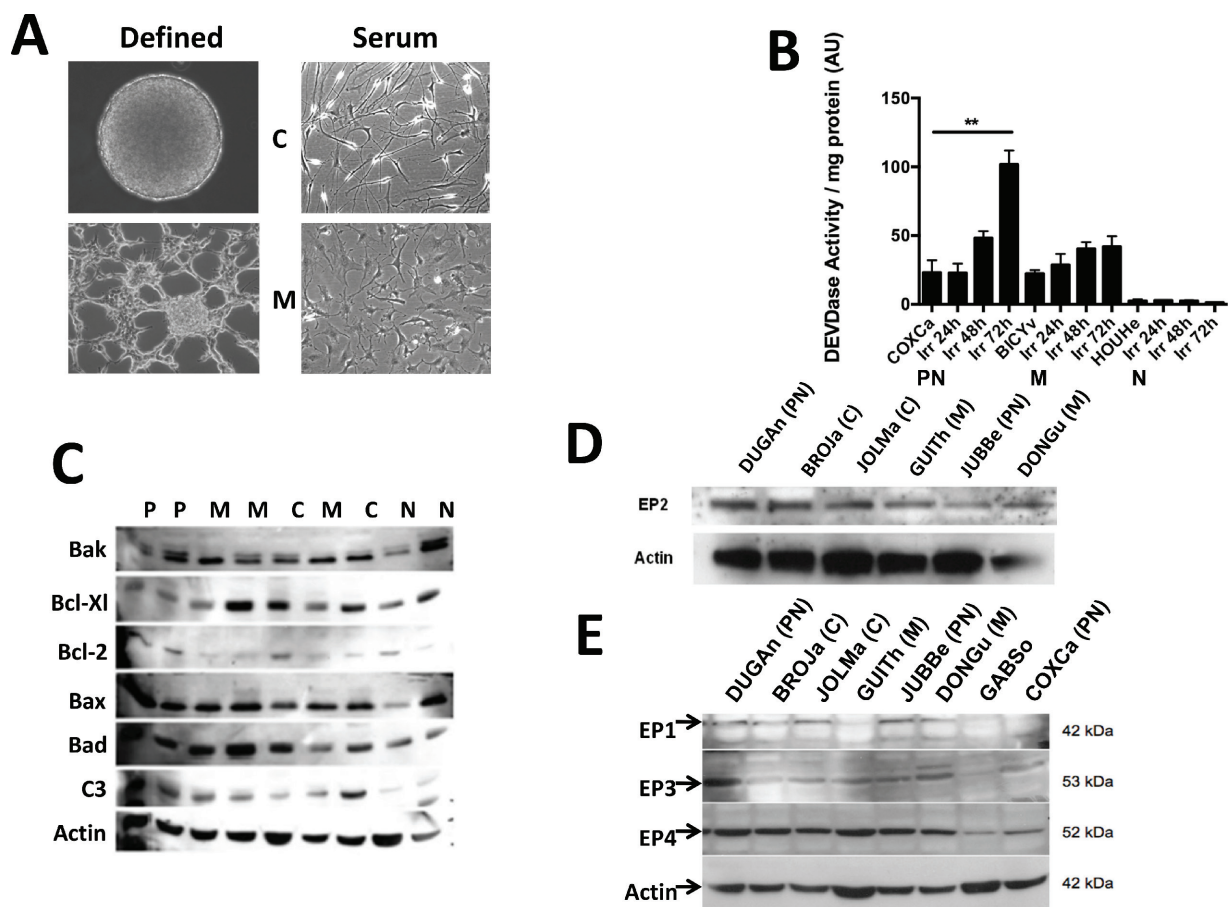
induction of PGE<sub>2</sub> in control cells reached a peak 8 h after a 10 Gy irradiation to returned to normal at 16 h (Figure 1E).

We conclude from these results that PGE<sub>2</sub> could be produced upon irradiation even in the absence of caspase activation.

### Irradiation, apoptosis and the expression of key members of the BCL-2 family in GBM primary cultures

To examine the biological consequence of the release of PGE<sub>2</sub> by GBM, we used primary cultures derived from resected tumors. Cells dissociated from these tumors were capable of growing as neurospheres and/or as adherent cells in almost 80% of the cases. We were able to derive primary cultures, which correspond to proneural (young adults with a better prognosis but unresponsive to treatment), classical, neural and mesenchymal (older adults with a worse prognosis) classification of GBM corresponding to the molecular subtypes defined by Verhaak *et al.* [16]

(Supplementary Figure S1 and Oliver *et al.* in preparation). Primary cultures in defined medium grow as spheres or as spheres and adherent cells whereas in serum complemented medium all primary cultures were adherent (Figure 2A). In all except one (15/16) primary culture we did not observed activation of caspase upon irradiation as similar low caspase 3 activities were observed in irradiated and untreated primary cultures. In Figure 2B, 3 primary cultures are given as an example (1/16 with high caspase activity, 3/16 with medium activity and 12/16 with low or no activity). Of note, the GBM cultures were able to undergo caspase dependent apoptosis as shown by their response to etoposide (Supplementary Figure S2). However, since a similar production of PGE<sub>2</sub> was observed in all cells (data not shown), we conclude that it was independent of caspase activity and of the classes of GBM. Next we examined the expression of members of the BCL-2 family commonly found in GBM [17], in the different primary cultures. We observed an almost complete absence in the expression of Bcl-2 in 4/5 mesenchymal primary cultures while the other primary cultures expressed



**Figure 2: Characteristics of primary cultures derived from GBM patients.** Pictograph of primary cultures grown in defined (left) and serum-supplemented (right) media. Depending on the type of GBMs and/or culture conditions, cells can grow as spheres and/or as adherent cells (C = classical and M = mesenchymal subtypes) (A). Caspase induction was measured in primary cultures after irradiation (10 Gy). The induction of caspase was observed in a single tumor. The cut-off for caspase 3 activation resulting in cell death was defined at 50 AU/mg protein (B). The expression of key proteins of apoptosis was examined in primary cultures and illustrated in representative of the different subtype (PN = proneural, N = neural, C = classical and M = mesenchymal) (C). The expression of the receptors of PGE<sub>2</sub> (EP 1–4) was determined by western blots in the different representative primary cultures (D, E).

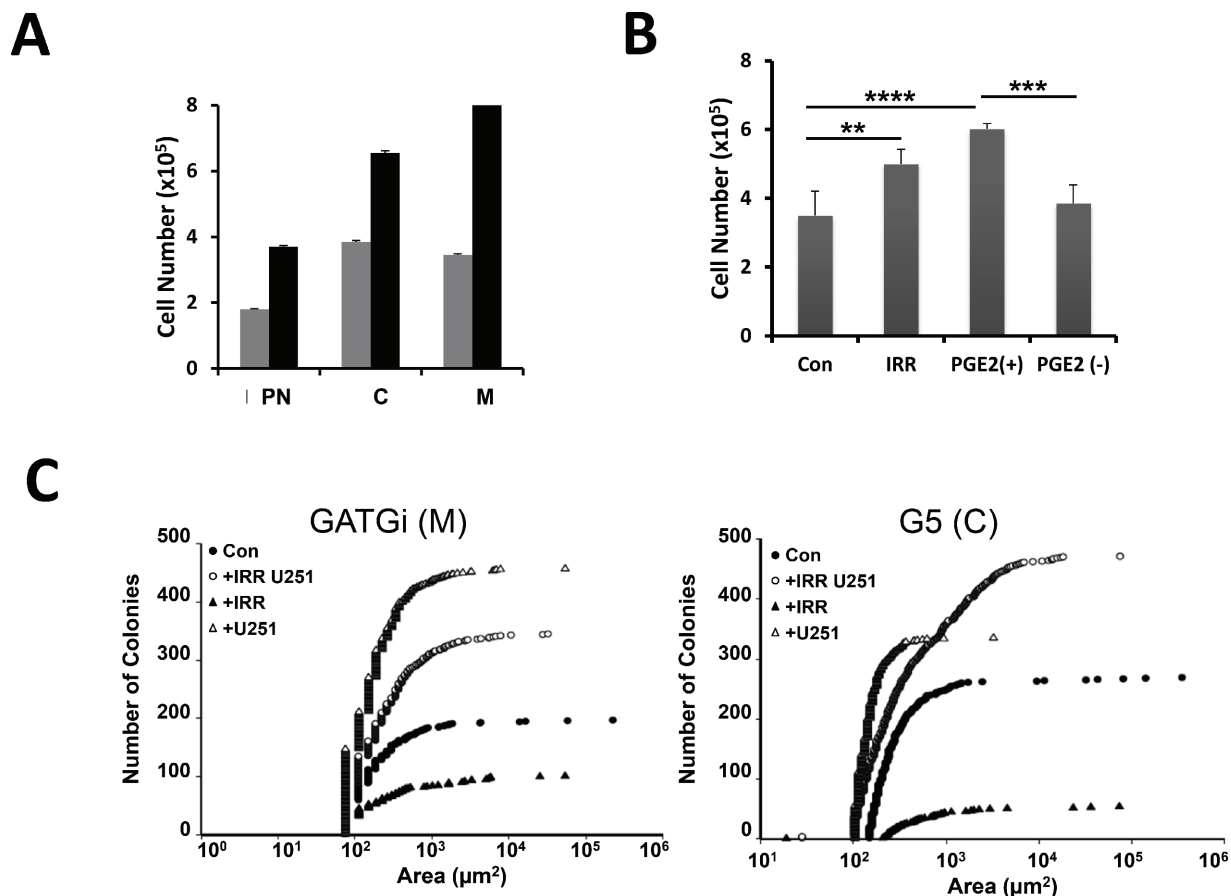
Bcl-2 in varying concentrations. The other proteins of the BCL-2 family such as Bcl-Xl, Bax, Bak or Bad were present in all the primary cultures at different levels (Figure 2C).

The expression of these proteins has been linked to PGE<sub>2</sub> signaling pathways [12]. As shown in Figure 2D, EP2 was expressed in the four different types of GBM *in vitro* at similar level. Next, we examined the expression of the other PGE<sub>2</sub> receptors *in vitro* (Figure 2E), we found that EP1, EP3 and EP4 receptors, which are also expressed in the brain [18], had a variable expression in primary cultures.

### Response of GBM primary cultures to PGE<sub>2</sub>

Similar to U251,  $\gamma$ -irradiated primary cultures produced PGE<sub>2</sub> although this production was heterogeneous and most of PGE<sub>2</sub> remained associated to the spheres rather than released into the culture medium (data not shown). Primary GBM were cultivated in the presence of supernatant

of irradiated cell culture media (ICCM). As shown in Figure 3A, cell proliferation was significantly increased upon incubation of primary cultures with ICCM. This effect was abolished after the immuno-depletion of PGE<sub>2</sub>. Note that the addition of PGE<sub>2</sub> in immuno-depleted ICCM was sufficient to restore the effect on cell proliferation (Figure 3B). Next we used the 3D co-culture in soft agar system to determine the effects of the released PGE<sub>2</sub> on the growth and survival of primary cultures. Under these experimental conditions U251 cells were irradiated with 5 Gy and 24 h later primary cultures were overlaid in soft agar and cultured for a further 3 weeks, as described in the methods section. Our first observation was the complete absence of large colonies in primary cultures overlaid over irradiated U251 cells as compared to control dishes (Figure 3C). However, the number of colonies in the co-cultures (primary cultures + irradiated U251 cells) was significantly increased. Next, we examined the expression of the different PGE<sub>2</sub>



**Figure 3: Effect of irradiation on GBM morphology and numbers *in vitro*; expression of PGE<sub>2</sub> receptors in the primary cultures.** Primary cultures were either grown in defined medium (grey bars) or in 24 h-conditioned medium from U251 cells irradiated at 5 Gy (black bars) for 24 h, then cell number was determined using the Countess automatic cell counter. The data from representative cultures performed in triplicate are shown (A). Primary culture was grown in the absence (con) or in the presence of supernatants from irradiated cells (IRR), supernatants immune-depleted in PGE<sub>2</sub> (PGE2-) or in immune-depleted medium containing 10 μM PGE<sub>2</sub> (PGE2+). Cell number was determined 24 h later as above (B). (\*\**p* = 0,005; \*\*\**p* = 0.0005; \*\*\*\**p* < 0.0001). 3D co-culture in soft agar of primary cultures grown in the absence (con) or in the presence of irradiated U251 cells (+IRR). The +IRR cultures show smaller but much more colonies that the control cultures. GATGi and G5 are illustrating of mesenchymal (M) and classical (C) GBM sub-types (C). Data are representative of 3 experiments done in duplicate.



receptors in the primary cultures: first the expression of EP2 as it is the most widely expressed prostaglandin receptor in the brain and it is functionally coupled to anti-apoptotic and protective functions in neurons and in secondary neurotoxicity during inflammation [18, 19].

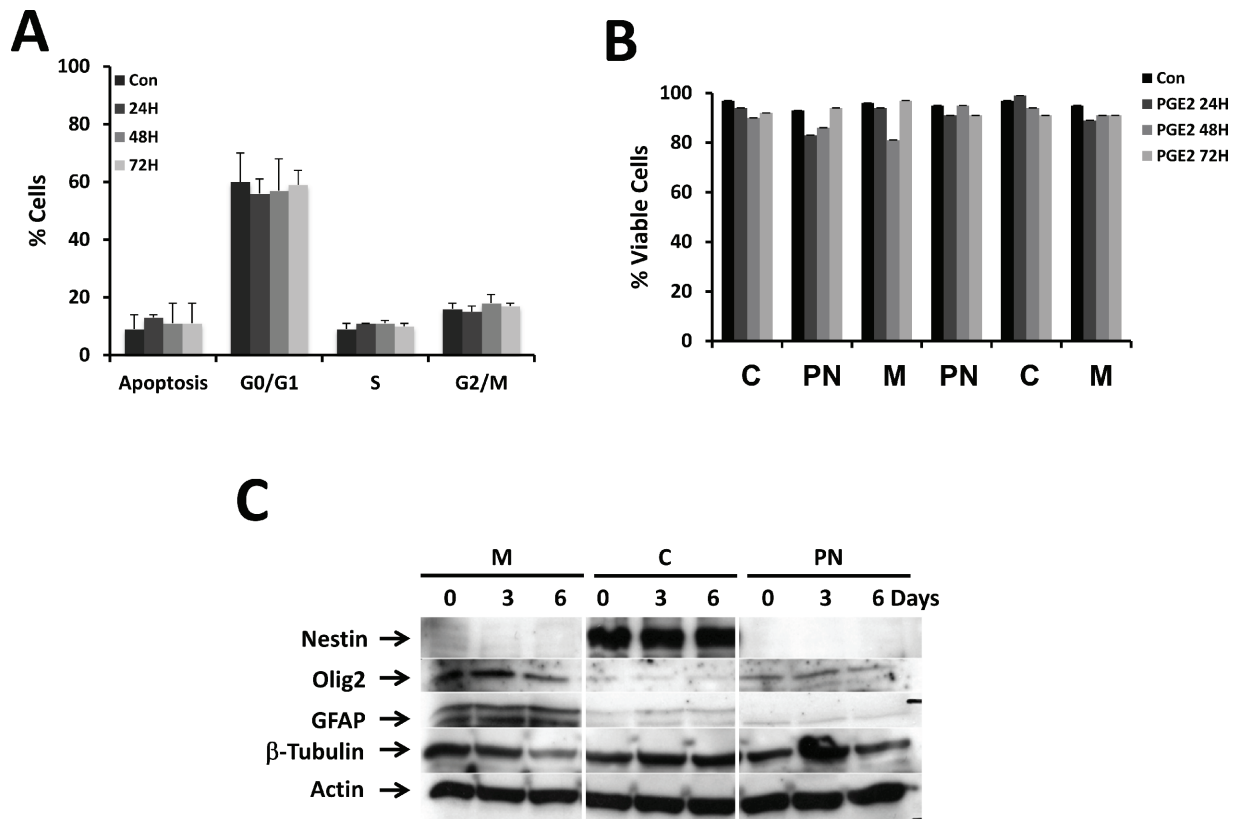
We did not observe any significant differences either on the cell cycle and apoptosis upon incubation with 10  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> for 72 h between the different GBM cultures (Figure 4A) or on cell viability (Figure 4B).

It has been suggested that PGE<sub>2</sub> liberated from dead or dying cells could regulate stem cells homeostasis and differentiation [20]. As our culture conditions support the survival and the proliferation of CSC [3], we examined if PGE<sub>2</sub> could induce a change in the proportion of CSCs by analyzing the expression of stemness markers upon long-term exposure to the bioactive lipid. As shown in Figure 4C, the expression of stemness markers were markedly different in the different types of GBM primary cultures: some expressed markers for all types of neural cells (i.e. Olig2, GFAP and  $\beta$ -tubulin), and others expressing limited amount of neural markers (i.e. the neuronal  $\beta$ -tubulin) while others expressed high level of nestin and  $\beta$ -tubulin and low level of Olig2 and GFAP. In all cases incubation with PGE<sub>2</sub> did not affect the nature and/or the level of these markers.

### Effect of PGE<sub>2</sub> on the number and size of neurospheres in the presence or in the absence of EGF

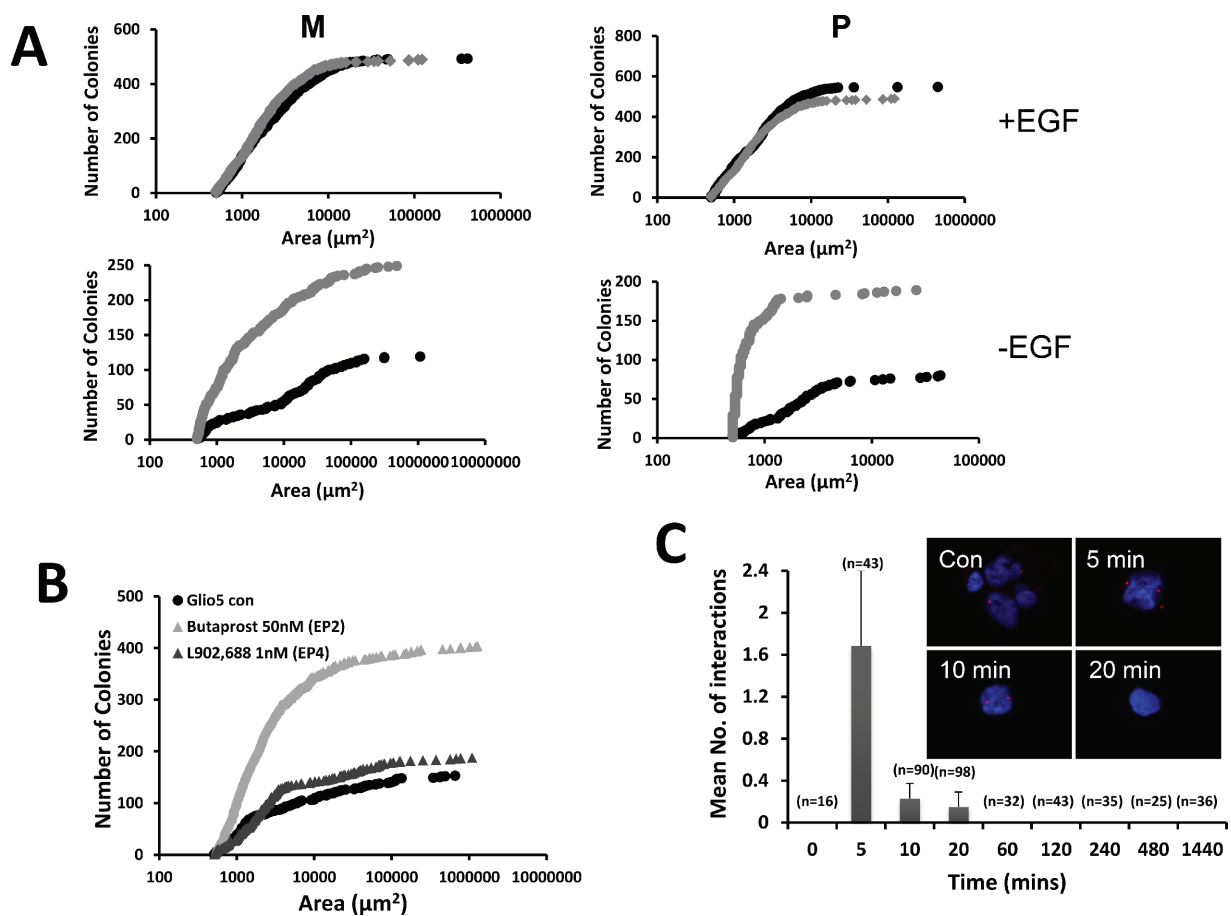
PGE<sub>2</sub> has been shown to trans-activate EGFR through its rapid phosphorylation [21, 22]. Since, GBM primary cultures are cultivated in the presence of EGF, we examined the effect of PGE<sub>2</sub> in the absence or in the presence of this growth factor. We found that GBM primary cultures grew similarly in the presence or in the absence of PGE<sub>2</sub> when EGF was present (Figure 5A). However, in absence of EGF, the addition of PGE<sub>2</sub> increased both the size and the number of spheres, which reached in size, but not in numbers, a level similar to that observed in the presence of EGF (Figure 5A). Note that the addition of PGE<sub>2</sub> alone did not have the same effect as PGE<sub>2</sub> released from irradiated U251 cells. This could be due to the fact that the biolipid is very labile and has a very short half-life or to the presence of other factors. Possibly the continual release of PGE<sub>2</sub> by dying cells has a more dramatic effect or the effect observed could be due to a combination of factors released.

Next we used agonists against EP2 and EP4 to determine the PGE<sub>2</sub> receptor implicated in this effect. Results obtained in 3D cultures showed that Butaprost, an



**Figure 4: Effect of PGE<sub>2</sub> on cell cycle, survival and expression of stemness markers.** The effect of PGE<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) on cell cycle was analyzed together with the induction of apoptosis. As illustrated no effect on the addition of PGE<sub>2</sub> on the different phases of the cycle (A) and cell viability (B) was observed over a period of 72 h. We also analyzed the effect of PGE<sub>2</sub> on the expression of stemness markers under similar conditions and as illustrated in (C), the expression of these markers was not affected by the treatment.





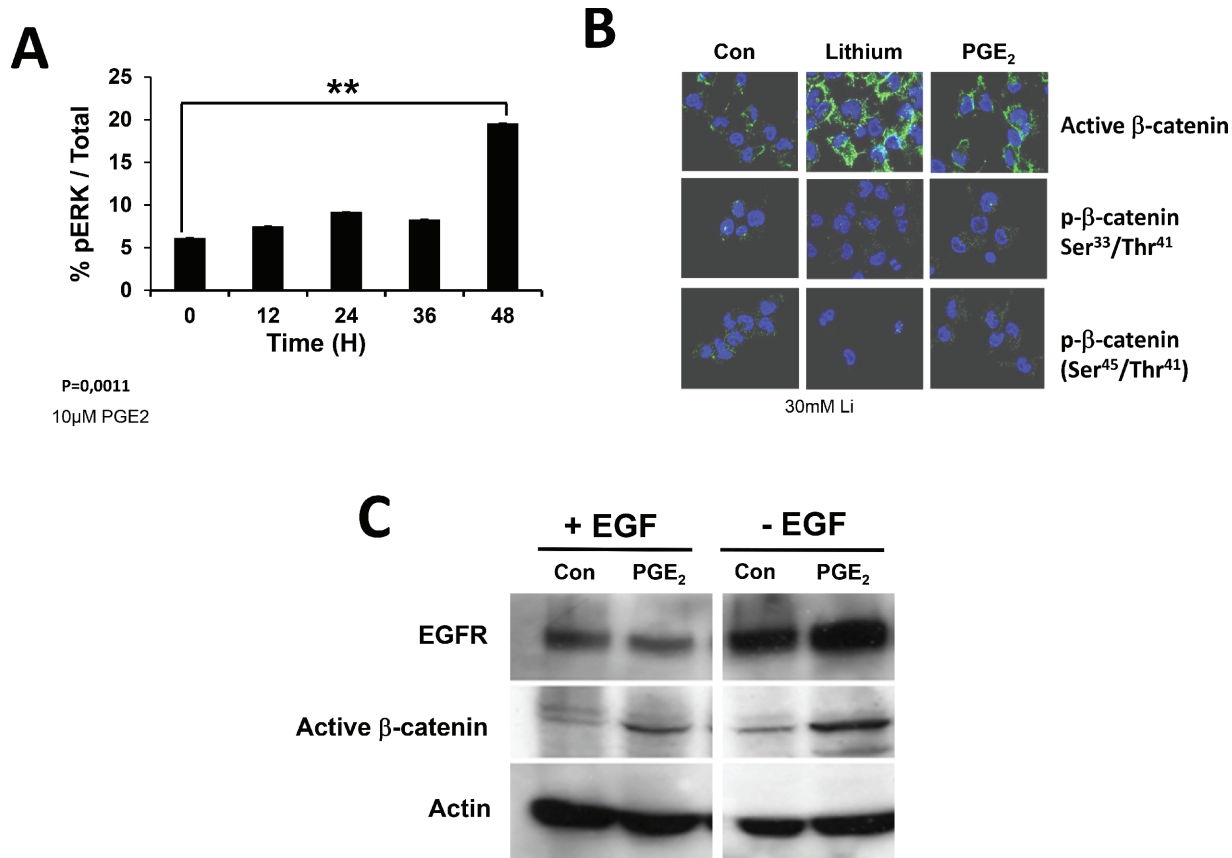
**Figure 5: PGE<sub>2</sub> and the EGF signaling pathway.** We examined the effect of PGE<sub>2</sub> on both the amount of the sizes of spheres in the presence (top) or in the absence (bottom) of EGF. Primary cultures were grown in 3D cultures in the absence (black lines) or in the presence of 10 µM PGE<sub>2</sub> for 3 weeks and the colonies formed were quantified using MetaMorph soft-ware (A) The data presented are representative of 3 independent experiments. Primary cultures were grown in soft agar in the absence or presence of agonist against EP2 (50 nM Butaprost) and EP4 (1 nM L902,688). After 3 weeks the number and size of neurospheres were determined (B). PGE<sub>2</sub> (10 µM) induces transactivation of EGFR. Proximity ligation *in situ* assay (P-LISA) adapted from the O-link protocol was used to monitor the phosphorylation of EGFR after addition of 10 mM PGE<sub>2</sub> in the cells. Each red dot indicates a close proximity between EGFR (rabbit monoclonal) and pEGFR (mouse monoclonal). Graph represents the statistical analysis of the number of interactions versus time. The data presented are the mean of 2 experiments done in triplicate (C).

agonist of EP2 and not L902,688, an EP4 ligand, trigger a PGE<sub>2</sub> like effect in the absence of EGF (Figure 5B). These results suggest that EGFR signaling could be implicated in the effect of PGE<sub>2</sub> in primary cultures. EGFR was expressed in almost all primary cultures and basal phosphorylation monitored by immunoblot indicated that the receptor was phosphorylated under our conditions (Supplementary Figure S3). Incubation of primary cultures with PGE<sub>2</sub> for 72 h did not show any significant activation of EGFR through increased phosphorylation (Supplementary Figure S3). Next we look at a short-term activation of EGFR by PGE<sub>2</sub> using the OLINK technique [23]. As illustrated in Figure 5C, PGE<sub>2</sub> induced a strong but transient phosphorylation of the receptor after 5 min incubation.

EGFR triggered the extracellular signal-regulated kinase (ERK)-mitogenic activated protein kinase (ERK/MAPK) signaling in many cells lines, an important

component of radiation-induced hormesis [24] and glioma radio-resistance [25]. Primary cultures were treated with PGE<sub>2</sub> and then the phosphorylation of ERK was quantified using a total phosphoERK1/2 ELISA. As shown in Figure 6A, the addition of PGE<sub>2</sub> triggered a phosphorylation of ERK in primary cultures after 48 hours.

In colon cancer, PGE<sub>2</sub> has been implicated in the induction of the Wnt/β-catenin pathway and as such to potentially play a critical role in carcinogenesis [26]. We analyze the activation of this pathway under our conditions by incubating primary cultures with 10 mM PGE<sub>2</sub> for 48 h. Cells were than analyzed for β-catenin activation by immunohistochemistry (Figure 6B). The activation of β-catenin by PGE<sub>2</sub> was compared to that induced by lithium and as shown in Figure 6B, both treatments led to the activation of β-catenin while on the other hand no effect on its phosphorylation was observed. We observed



**Figure 6: Activation of EGFR receptor monitored by ERK and β-catenin activation.** EGFR signaling pathway leads to the phosphorylation of ERK (pERK) and regulates β-catenin localization and stability (active β-catenin). We thus determine the percentage of pERK after incubation of primary cultures with PGE<sub>2</sub> (A) and the intracellular localization of active β-catenin, using Lithium as a positive control (B). We also analyzed the effect of PGE<sub>2</sub> on EGFR and activeβ-catenin in the presence or in the absence of EGF (C).

an increase in the induction of this activation and in the presence and in the absence of EGF, although the induction was more important in the latter case (Figure 6C).

## DISCUSSION

Glioma are resistant to chemo-therapy induced apoptosis [27]. Radio-therapy is the most effective therapy in GBM although these tumors remain largely refractory to the treatment. Mechanisms implicated in GBM radio-resistance are not well-known and unraveling them could provide new indications for better treatment strategies. Fractional/partial killing by radiation has been associated with a more rapid proliferation of the surviving cells and repopulation has been viewed over the longtime, as a major therapeutic challenge [28, 29]. This effect has been linked to the radiation-induced release of mitogenic factors by normal and/or cancer cells (30), the stimulation of radio-resistant tumor initiating cells [3, 31]. Recently, one potential mechanism, called “Phoenix Rising”, has been proposed to explain this effect [11, 20]. Huang et al. elegantly demonstrated that the

proliferation signal could be generated by PGE<sub>2</sub> produced upon activation of caspase 3, an enzyme essential for the completion of apoptosis, by radiotherapy [11]. We have shown that apoptosis is accompanied by an increase in the production of intracellular PGE<sub>2</sub> in glioma and colon cancer but that this increase was upstream of the activation of caspase 3 [13–15]. We have observed that some GBM express high amounts of m-PGES1, the enzyme responsible for the synthesis of PGE<sub>2</sub> from PGH, the product of COX2 [13]. Interestingly, the expression of m-PGES was associated with apoptosis and *in vitro* analyses indicated that this apoptosis was strictly Bax dependent [13–15]. We found that the production of PGE<sub>2</sub> was triggered by most apoptotic inducers and that cells resistant to apoptosis accumulated and released abundant level of the lipid through MRP4, a PGE<sub>2</sub> transporter both in glioma and colon cancer cells [13–15]. In the present work, we show that radiation can trigger PGE<sub>2</sub> synthesis in glioma without inducing caspase activity. This PGE<sub>2</sub> liberated participated in the survival and proliferation of surviving cancer cells by activating several pathways, including EGFR and β-catenin. Indeed, our results suggest that PGE<sub>2</sub> can substitute for EGF to promote survival of

irradiated cells. This observation is in agreement with numerous studies showing that accelerated repopulation during radiotherapy could be linked to the activation of EGFR and the subsequent activation of ERK/MAP kinase mitogenic pathways [28]. However, our results show also that PGE<sub>2</sub> under our conditions is a pro-survival factor and that irradiated cells released pro-proliferative factors that remain to be identified.

PGE<sub>2</sub> has also been shown to specifically reactivate the repopulation of normal cells by stimulating normal stem cells [32]. However, in our hands, we did not observe any change in the expression of stemness markers upon PGE<sub>2</sub> treatment in glioma primary cultures regardless of the molecular sub-class of GBM and independently of the proportion of CD133<sup>+</sup> cells.

The roles of PGE<sub>2</sub> in non targeted and targeted effects of ionizing radiations, especially in the inflammatory context [33], or on stem cells homeostasis [32] are not fully understood. Recently, COX2 and PGE<sub>2</sub> have been implicated in cancer progression but mixed results were obtained with COX2 inhibitors and radio-sensitization [34, 35]. Our results provide a molecular mechanism, by which PGE<sub>2</sub> can sustain tumor growth and proliferation after tumor irradiation and support new alternative targets, such as EP2, to potentiate the effect of radiotherapy.

## MATERIALS AND METHODS

Unless stated otherwise, all cell culture material was obtained from Life Technologies (Cergy Pontoise, France) and chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### Cell culture

Human primary cultures were grown in defined medium (DMEM/HAM-F12, 2 mM L-glutamine, N2 and B27 supplement, 2 µg/ml heparin, 20 ng/ml EGF and 25 ng/ml bFGF, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin and the U251-MG cell line was cultured in DMEM (4.5 g/L glucose), 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity.

### 3D-culture

Primary GBM cells ( $2.5 \times 10^3$ ) resuspended in 0.35% soft agar containing different compounds were layered on 0.5% agar. The soft agar layer was covered with media containing the compound to be tested. After 3 weeks, the cultures were scanned using a Leica DMI6000B and the Metamorph program.  $\gamma$ -irradiation was carried out in a Faxitron CP160 irradiator (Faxitron X-ray Corporation) at a dose rate of 1.48 Gy/min.

## ELISA

Quantity of phosphorylated and total protein was measured using the InstantOne ELISA kit (eBioscience) according to the manufacturer's instruction. Briefly, cells were lysed with 50 µL lysis buffer and incubated 1 h at room temperature with 50 µL antibody cocktail containing antibodies against total or phosphorylated forms and the peroxidase-labeled secondary antibodies. Colorimetric detection reagent (100 µl) was added and the reaction read at 450 nm.

## Protein lysates, immunoblotting and caspase activity

Total proteins were extracted in (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with protease inhibitors. Protein concentration was determined using BCA protein assay (Sigma). Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane (Millipore, St Quentin-Yvelines, France) and revealed with ECL (Millipore). Antibodies that recognize actin (Millipore), Bax (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), Bcl-2 (BD Pharmingen), EGFR and pEGFR (Cell Signaling Technology, Denvers, MA, USA), Bad (Cell Signaling), EP1-4 (Cayman, Ann Arbor, MI, USA), caspase 3 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz CA, USA), GFAP (Calbiochem, Darmstadt, Germany), nestin (Millipore, Temecula, CA, USA), olig2 (Abcam, Cambridge, UK) and  $\beta$ -tubulin (Sigma-Aldrich) were used. HRP-conjugated secondary antibodies were from BioRad. The ImageJ64 software was used to quantify Western blot bands. Caspase 3 activity was determined using the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC, as described in [14]. Note, for all the assays the cut-off limit of caspase 3 activation that induces cell death was determined at > 50 AU/mg protein.

## PGE<sub>2</sub> assay and immunodepletion

U251 cells ( $\times 10^5$ ) were seeded in 6 well plates. Complete medium was replaced by serum-free medium 24 h later and cells were  $\gamma$ -irradiated at the indicated intensity. Conditioned medium was recovered at indicated time points for PGE<sub>2</sub> measurement. PGE<sub>2</sub> assay was done according to the manufacturer's instructions (Amersham, GE Healthcare Europe, Velizy-Villacoublay, Fr). Cells were harvested and either assayed for cell viability or fixed and probed for active caspase 3 by flow cytometry (BD Pharmingen; 0.25 µg/10<sup>6</sup> cells). When indicated, conditioned medium was depleted of PGE<sub>2</sub> by filtration through PGE<sub>2</sub> affinity column according to the manufacturer (Cayman).

## Olink

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature then permeabilized

with 0.1% SDS in PBS for 10 min at room temperature. Labeling was done according to the manufacturer's instructions (Duolink® *In Situ*, Sigma–Aldrich). Fluorescence was visualized using the Axiovert 200 M microscope (Zeiss, Le Perq, France) with the apotome module (×63 objective and numerical aperture 1.4). Quantification was done using ImageJ.

The patients data have been kept confidential according to the recommendations of the National French Committee for Ethics and names of primary cultures correspond to codes.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from LABEX IGO, INSERM and CNRS. We thank Philippe Hulin from the MicroPixel platform for expert assistance.

## Abbreviations

CSC: cancer stem cells; Cyclooxygenase 2: Cox2; PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin E2; EP2: Prostaglandin E receptor 2; EP4: prostaglandin E receptor 4; TMZ: temozolomide; RT: radiotherapy.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Editorial note

This paper has been accepted based in part on peer-review conducted by another journal and the authors' response and revisions as well as expedited peer-review in *Oncotarget*.

## REFERENCES

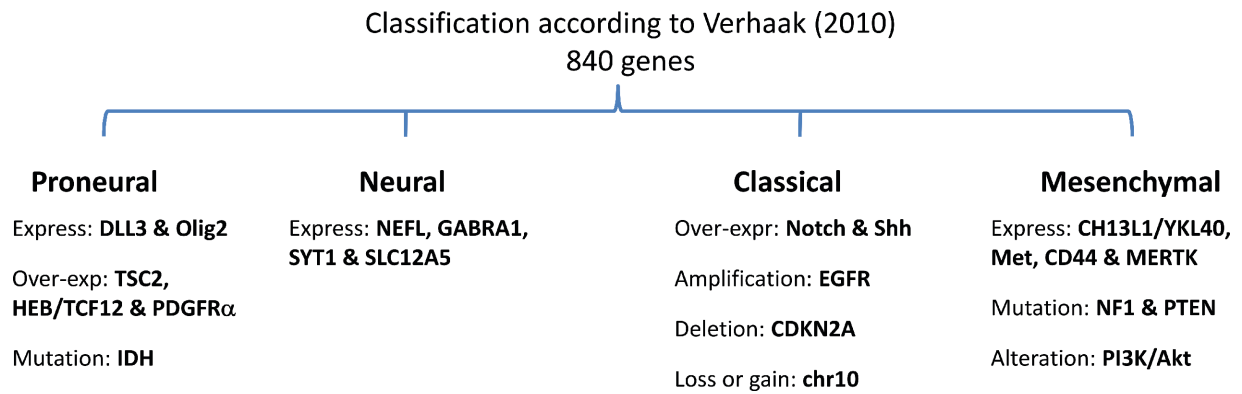
1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005; 352:987–996.
2. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005; 352:997–1003.
3. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006; 444:756–760.
4. Ke C, Tran K, Chen Y, Di Donato AT, Yu L, Hu Y, Linskey M, Wang P, Limoli C, Zhou Y. Linking differential

- radiation responses to glioma heterogeneity. *Oncotarget*. 2014; 5:1657–1665.
5. Shu HK, Kim MM, Chen P, Furman F, Julin CM, Israel MA. The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:14453–14458.
6. Kim Y, Kim KH, Lee J, Kim M, Lee SJ, Park K, Yang H, Jin J, Joo KM, Lee J, Nam DH. Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Lab Invest*. 2012; 92:466–473.
7. Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR, Rich JN, Sullenberger BA. Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells*. 2010; 28:17–28.
8. Chakravarti A, Dicker A, Mehta M. The contribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway to radioresistance in human gliomas: a review of preclinical and correlative clinical data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004; 58:927–931.
9. Anderson JC, Duarte CW, Welaya K, Rohrbach TD, Bredal M, Yang ES, Choradia NV, Thottassery JV, Yancey Gillespie G, Bonner JA, Willey CD. Kinomic exploration of temozolomide and radiation resistance in Glioblastoma multiforme xenolines. *Radiother Oncol*. 2014; 111:468–474.
10. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Caspase-3 and prostaglandins signal for tumor regrowth in cancer therapy. *Oncogene*. 2012; 31:2805–2808.
11. Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu FF, O'Sullivan B, He Z, Peng Y, Tan AC, Zhou L, Shen J, Han G, et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med*. 2011; 17:860–866.
12. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 1998; 58:362–366.
13. Lalier L, Cartron PF, Pedelaborde F, Olivier C, Loussouarn D, Martin SA, Mefflah K, Menanteau J, Vallette FM. Increase in PGE2 biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene*. 2007; 26:4999–5009.
14. Lalier L, Cartron PF, Olivier C, Logé C, Bougras G, Robert JM, Oliver L, Vallette FM. Prostaglandins antagonistically control Bax activation during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2011; 18:528–537.
15. Lalier L, Pedelaborde F, Braud C, Menanteau J, Vallette FM, Olivier C. Increase in intracellular PGE2 induces apoptosis in Bax-expressing colon cancer cells. *BMC Cancer*. 2011; 11:153.
16. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010; 17:98–110.

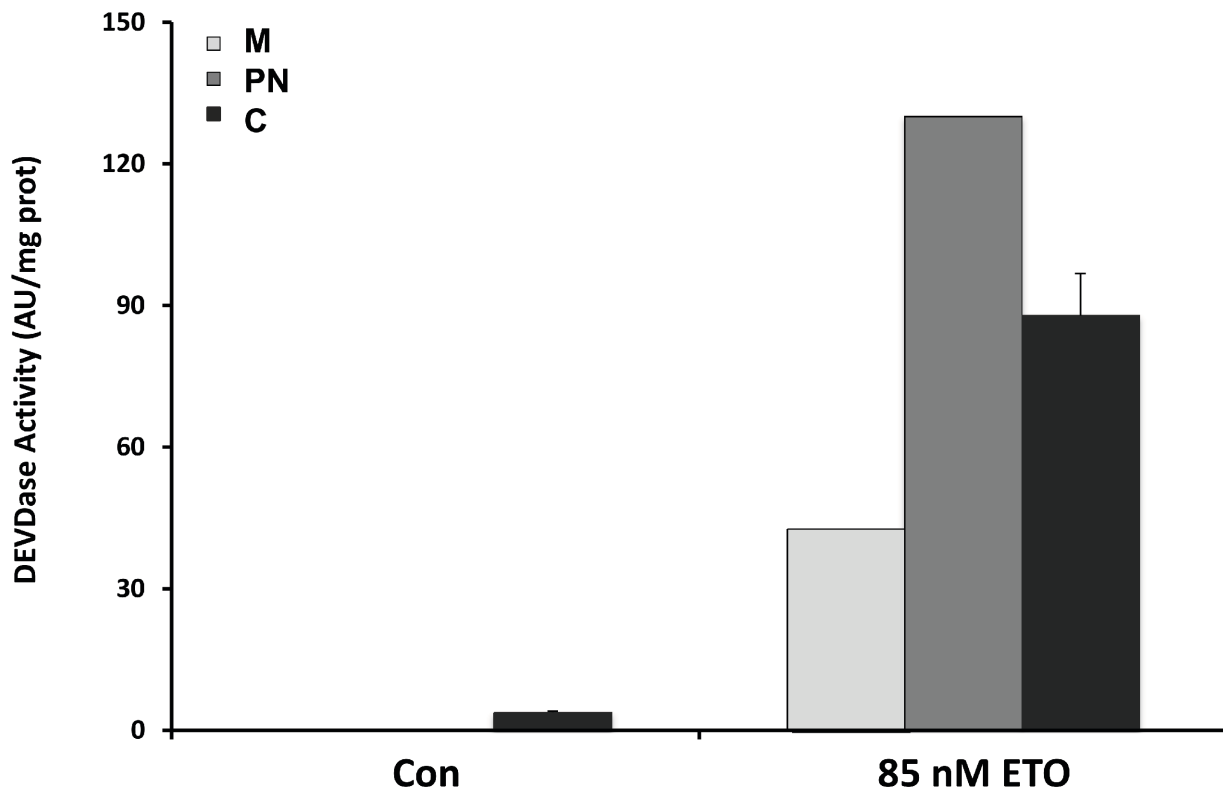


17. Cartron PF, Loussouarn D, Campone M, Martin SA, Vallette FM. Prognostic impact of the expression/phosphorylation of the BH3-only proteins of the BCL-2 family in glioblastoma multiforme. *Cell Death Dis.* 2012; 3:e421.
18. Andreasson K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010; 91:104–112.
19. Jiang J, Dingleline R. Prostaglandin receptor EP2 in the crosshairs of anti-inflammation, anti-cancer, and neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci.* 2013; 34:413–423.
20. Li F, Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop DR, Bedford JS, Li CY. Apoptotic cells activate the “phoenix rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal.* 2010; 3:ra13.
21. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med.* 2002; 8:289–293.
22. Shao J, Evers BM, Sheng H. Prostaglandin E2 synergistically enhances receptor tyrosine kinase-dependent signaling system in colon cancer cells. *J Biol Chem.* 2004; 279:14287–14293.
23. Söderberg O, Leuchowius KJ, Gullberg M, Jarvius M, Weibrecht I, Larsson LG, Landegren U. Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the *in situ* proximity ligation assay. *Methods.* 2008; 45:227–232.
24. Liang X, So YH, Cui J, Ma K, Xu X, Zhao Y, Cai L, Li W. The low-dose ionizing radiation stimulates cell proliferation via activation of the MAPK/ERK pathway in rat cultured mesenchymal stem cells. *J Radiat Res.* 2011; 53:380–386.
25. Li B, Yuan M, Kim IA, Chang CM, Bernhard EJ, Shu HK. Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. *Oncogene.* 2004; 23:4594–4602.
26. Castellone MD, Teramoto H, Williams BO, Druey KM, Gutkind JS. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science.* 2005; 310:1504–1510.
27. Gratas C, Séry Q, Rabé M, Oliver L, Vallette FM. Bak and Mcl-1 are essential for temozolomide induced cell death in human glioma. *Oncotarget.* 2014; 5:2428–2435.
28. Kim JJ, Tannock IF. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5:516–525.
29. Fowler JF. Rapid repopulation in radiotherapy: a debate on mechanism. The phantom of tumor treatment—continually rapid proliferation unmasked. *Radiother Oncol.* 1991; 22:156–158.
30. Witte L, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A, Vlodavsky I, Goodman DS, Eldor A. Effects of irradiation on the release of growth factors from cultured bovine, porcine, and human endothelial cells. *Cancer Res.* 1989; 49:5066–5072.
31. Higgins DM, Wang R, Milligan B, Schroeder M, Carlson B, Pokorny J, Cheshier S, Meyer F, Weissman I, Sarkaria J, Henley J. Brain tumor stem cell multipotency correlates with nanog expression and extent of passaging in human glioblastoma xenografts. *Oncotarget.* 2013; 4:792–801.
32. Durand EM, Zon LI. Newly emerging roles for prostaglandin E2 regulation of hematopoiesis and hematopoietic stem cell engraftment. *Curr Opin Hematol.* 2010; 17:308–12.
33. Mukherjee D, Coates PJ, Lorimore SA, Wright EG. Responses to ionizing radiations mediated by inflammatory mechanisms. *J. Pathol.* 2014; 232:289–299.
34. Ohneseit PA, Krebichl G, Dittmann K, Kehlbach R, Rodemann HP. Inhibition of cyclooxygenase-2 activity by celecoxib does not lead to radiosensitization of human prostate cancer cells *in vitro*. *Radiother Oncol.* 2007; 82:229–238.
35. Xu K, Wang L, Shu H. COX-2 overexpression increases malignant potential of human glioma cells through Id1. *Oncotarget.* 2013; 5:1241–1252.

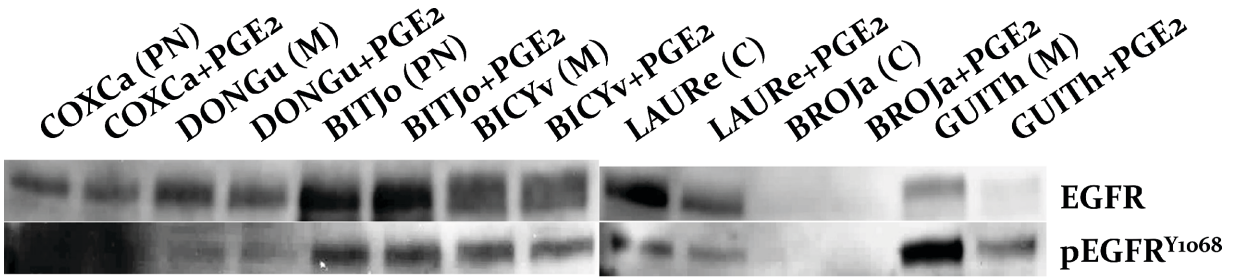
**SUPPLEMENTARY FIGURES**



Supplementary Figure S1: Some specific molecular characterization of the different primary cultures according to Verhaak et al (ref 16).



Supplementary Figure S2: Caspase dependent apoptosis can be induced in the GBM primary cultures by Etoposide (85 nM). Mesenchymal, proneural and classical primary cultures ( $n = 3$ ) were treated with Etoposide (ETO) for 48 hrs before caspase 3 assays.



72 h PGE<sub>2</sub> treatment

**Supplementary Figure S3: Effect of PGE<sub>2</sub> on EGFR expression and phosphorylation after 72 hrs exposure.** Immunoblot with antiEGFR and anti PhosphoEGFR antibodies were performed as described in the “materials and methods” section.

# Thèse de Doctorat

Kristell OIZEL

## Métabolisme et sensibilité à la mort cellulaire dans le glioblastome

### Metabolism and cell death sensitivity in glioblastoma

#### Résumé

Les cellules cancéreuses présentent des adaptations métaboliques leur permettant une forte capacité de prolifération et une résistance aux signaux de mort, notamment en augmentant la glycolyse aérobie et la glutaminolyse. Le glioblastome multiforme (GBM), tumeur cérébrale la plus fréquente chez l'adulte, est caractérisé par une résistance accrue aux traitements thérapeutiques et par la présence de cellules souches cancéreuses. Ce projet de thèse s'est intéressé au lien entre le métabolisme et la sensibilité à la mort cellulaire dans le GBM.

Dans un premier temps nous avons étudié l'impact de la mutation de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) récemment mise en évidence chez les patients atteints de GBM. Nous montrons que la mutation IDH induit une diminution de la sensibilité à la mort cellulaire induite par l'étoposide via la réduction du pool mitochondrial de NADH.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer si l'inhibition de la glutaminolyse pouvait moduler la réponse à la mort cellulaire dans le GBM. Nous montrons que l'epigallocatechine gallate (EGCG), inhibiteur de la glutamate déshydrogénase (GDH), peut sensibiliser les lignées de GBM à la mort cellulaire. De plus, dans des modèles de primocultures, l'EGCG sensibilise le sous-type mésenchymateux des GBM à la mort cellulaire. Ce modèle dérivant de tumeurs de patients permet de conserver l'hétérogénéité tumorale initiale, dont les cellules souches cancéreuses.

Ces résultats montrent un lien direct entre métabolisme et résistance à la mort cellulaire et ouvrent de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ainsi l'EGCG pourrait être un bon candidat comme adjuvant aux thérapies actuelles en traitement personnalisé.

#### Mots clés

**Métabolisme, Mort cellulaire, IDH, EGCG, Glutamine, Cellules souches cancéreuses, Glioblastome multiforme**

#### Abstract

Tumor cells undergo metabolic adaptations allowing them to sustain a high proliferative rate and to resist to cell death signals, especially increasing aerobic glycolysis and glutaminolysis. Glioblastoma multiforme (GBM), the most common brain tumor in adults, is characterized by a strong resistance to therapeutic treatments and the presence of cancer stem cells. This PhD project investigated the link between metabolism and cell death sensitivity in GBM.

First, we studied the impact of isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation recently identified in GBM patients. We show that mutated IDH induces a reduced sensitivity to etoposide-induced cell death mediated through a mitochondrial NADH pool reduction.

Second, we aimed to determine if glutaminolysis inhibition could modulate cell death response in GBM tumor model. We show that epigallocatechin gallate (EGCG), an inhibitor of glutamate dehydrogenase (GDH), can sensitize GBM cell lines to cell death. Furthermore, in primary cultures models, EGCG sensitizes the GBM mesenchymal subtype to cell death. This cellular model derived directly from patients tumors allows to keep the initial tumor heterogeneity, in particular the presence of cancer stem cells.

These results show a direct link between metabolism and cell death resistance and open new therapeutic strategies. Thus EGCG could be a good candidate as an adjuvant in current GBM therapy in the context of personalized treatment.

#### Key Words

**Metabolism, Cell death, IDH, EGCG, Glutamine, Cancer stem cell, Glioblastoma multiforme**