

ANNÉE 2020

N°

LA GLYCOLYSE FAVORISE LA MIGRATION DES CELLULES TUMORALES DANS LE GLIOBLASTOME

THÈSE
Présentée

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le 14 septembre 2020

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

Par Mané NDIAYE
Née le 10 avril 1990
à Dakar (Sénégal)

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à la disposition de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur.

Ceci implique une obligation de citation et de référencement dans la rédaction de vos travaux.

D'autre part, toutes contrefaçons, plagiat, reproductions illicites encourrent une poursuite pénale.

De juridiction constante, en s'appropriant tout ou partie d'une œuvre pour l'intégrer dans son propre document, l'étudiant se rend coupable d'un délit de contrefaçon (au sens de l'article L.335.1 et suivants du code de la propriété intellectuelle). Ce délit est dès lors constitutif d'une fraude pouvant donner lieu à des poursuites pénales conformément à la loi du 23 décembre 1901 dite de répression des fraudes dans les examens et concours publics.

ANNÉE 2020

N°

LA GLYCOLYSE FAVORISE LA MIGRATION DES CELLULES TUMORALES DANS LE GLIOBLASTOME

THÈSE
Présentée

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le 14 septembre 2020

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

Par Mané NDIAYE
Née le 10 avril 1990
à Dakar (Sénégal)

Année Universitaire 2019-2020
au 1^{er} Novembre 2019

Doyen :
Assesseurs :

M. Marc MAYNADIÉ
M. Pablo ORTEGA-DEBALLON
Mme Laurence DUVILLARD

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

		Discipline	
M.	Sylvain	AUDIA	Médecine interne
M.	Marc	BARDOU	Pharmacologie clinique
M.	Jean-Noël	BASTIE	Hématologie - transfusion
M.	Emmanuel	BAULOT	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Yannick	BEJOT	Neurologie
Mme	Christine	BINQUET	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M.	Philippe	BONNIAUD	Pneumologie
M.	Alain	BONNIN	Parasitologie et mycologie
M.	Bernard	BONNOTTE	Immunologie
M.	Olivier	BOUCHOT	Chirurgie cardiovasculaire et thoracique
M.	Belaid	BOUHEMAD	Anesthésiologie - réanimation chirurgicale
M.	Alexis	BOZORG-GRAYELI	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	Alain	BRON	Ophthalmologie
M.	Laurent	BRONDEL	Physiologie
Mme	Mary	CALLANAN	Hématologie type biologique
M.	Patrick	CALLIER	Génétique
Mme	Catherine	CHAMARD-NEUWIRTH	Bactériologie - virologie ; hygiène hospitalière
M.	Pierre-Emmanuel	CHARLES	Réanimation
M.	Jean-Christophe	CHAUVET-GELINIER	Psychiatrie d'adultes, Addictologie
M.	Nicolas	CHEYNEL	Anatomie
M.	Alexandre	COCHET	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Luc	CORMIER	Urologie
M.	Yves	COTTIN	Cardiologie
M.	Charles	COUTANT	Gynécologie-obstétrique
M.	Gilles	CREHANGE	Oncologie-radiothérapie
Mme	Catherine	CREUZOT-GARCHER	Ophthalmologie
M.	Frédéric	DALLE	Parasitologie et mycologie
M.	Alexis	DE ROUGEMONT	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
M.	Hervé	DEVILLIERS	Médecine interne
M.	Serge	DOUVIER	Gynécologie-obstétrique
Mme	Laurence	DUVILLARD	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Olivier	FACY	Chirurgie générale
Mme	Laurence	FAIVRE-OLIVIER	Génétique médicale
Mme	Patricia	FAUQUE	Biologie et Médecine du Développement
Mme	Irène	FRANCOIS-PURSSELL	Médecine légale et droit de la santé
M.	François	GHIRINGHELLI	Cancérologie
M.	Pierre Grégoire	GUINOT	Anesthésiologie – réanimation chirurgicale
M.	Frédéric	HUET	Pédiatrie
M.	Pierre	JOUANNY	Gériatrie
M.	Sylvain	LADOIRE	Histologie
M.	Gabriel	LAURENT	Cardiologie
M.	Côme	LEPAGE	Hépatogastroentérologie
M.	Romarc	LOFFROY	Radiologie et imagerie médicale
M.	Luc	LORGIS	Cardiologie

M.	Jean-Francis	MAILLEFERT	Rhumatologie
M.	Cyriaque Patrick	MANCKOUNDIA	Gériatrie
M.	Sylvain	MANFREDI	Hépatogastroentérologie
M.	Laurent	MARTIN	Anatomie et cytologie pathologiques
M.	David	MASSON	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Marc	MAYNADIÉ	Hématologie – transfusion
M.	Marco	MIDULLA	Radiologie et imagerie médicale
M.	Thibault	MOREAU	Neurologie
M.	Klaus Luc	MOURIER	Neurochirurgie
Mme	Christiane	MOUSSON	Néphrologie
M.	Paul	ORNETTI	Rhumatologie
M.	Pablo	ORTEGA-DEBALLON	Chirurgie Générale
M.	Pierre Benoit	PAGES	Chirurgie thoracique et vasculaire
M.	Jean-Michel	PETIT	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Christophe	PHILIPPE	Génétique
M.	Lionel	PIROTH	Maladies infectieuses
Mme	Catherine	QUANTIN	Biostatistiques, informatique médicale
M.	Jean-Pierre	QUENOT	Réanimation
M.	Patrick	RAY	Médecine d'urgence
M.	Patrick	RAT	Chirurgie générale
M.	Jean-Michel	REBIBOU	Néphrologie
M.	Frédéric	RICOLFI	Radiologie et imagerie médicale
M.	Paul	SAGOT	Gynécologie-obstétrique
M	Maxime	SAMSON	Médecine interne
M.	Emmanuel	SAPIN	Chirurgie Infantile
M.	Emmanuel	SIMON	Gynécologie-obstétrique
M.	Éric	STEINMETZ	Chirurgie vasculaire
Mme	Christel	THAUVIN	Génétique
M.	Benoit	TROJAK	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
M.	Pierre	VABRES	Dermato-vénéréologie
M.	Bruno	VERGÈS	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Narcisse	ZWETYENGA	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

PROFESSEURS EN SURNOMBRE

M.	Alain	BERNARD (surnombre jusqu'au 31/08/2021)	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M.	Bernard	BONIN (Surnombre jusqu'au 31/08/2020)	Psychiatrie d'adultes
M.	Jean-Marie	CASILLAS-GIL (Surnombre jusqu'au 31/08/2020)	Médecine physique et réadaptation
M.	Pascal	CHAVANET (Surnombre jusqu'au 31/08/2021)	Maladies infectieuses

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES
PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES MEDICALES**

			Discipline Universitaire
M.	Jean-Louis	ALBERINI	Biophysiques et médecine nucléaire
Mme	Lucie	AMOUREUX BOYER	Bactériologie
Mme	Shaliha	BECHOUA	Biologie et médecine du développement
M.	Mathieu	BLOT	Maladies infectieuses
M.	Benjamin	BOUILLET	Endocrinologie
Mme	Marie-Claude	BRINDISI	Nutrition
Mme	Marie-Lorraine	CHRETIEN	Hématologie
Mme	Vanessa	COTTET	Nutrition
M.	Damien	DENIMAL	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Sécolène	GAMBERT-NICOT	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Marjolaine	GEORGES	Pneumologie
Mme	Françoise	GOIRAND	Pharmacologie fondamentale
M.	Charles	GUENANCIA	Physiologie
Mme	Agnès	JACQUIN	Physiologie
M.	Alain	LALANDE	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Louis	LEGRAND	Biostatistiques, informatique médicale
Mme	Stéphanie	LEMAIRE-EWING	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Pierre	MARTZ	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Alain	PUTOT	Gériatrie
M.	Paul-Mickaël	WALKER	Biophysique et médecine nucléaire

PROFESSEURS EMERITES

M.	Laurent	BEDENNE	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	Jean-François	BESANCENOT	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	François	BRUNOTTE	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	Philippe	CAMUS	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Jean	CUISENIER	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Jean-Pierre	DIDIER	(01/11/2018 au 31/10/2021)
Mme	Monique	DUMAS-MARION	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Claude	GIRARD	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Maurice	GIROUD	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Patrick	HILLON	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	François	MARTIN	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Henri-Jacques	SMOLIK	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Pierre	TROUILLOUD	(01/09/2017 au 31/08/2020)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

M.	Jean-Noël	BEIS	Médecine Générale
----	-----------	-------------	-------------------

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme	Katia	MAZALOVIC	Médecine Générale
-----	-------	------------------	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Didier	CANNET	Médecine Générale
M.	François	MORLON	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Clément	CHARRA	Médecine Générale
Mme	Anne	COMBERNOUX -WALDNER	Médecine Générale
M.	Benoit	DAUTRICHE	Médecine Générale
M.	Alexandre	DELESVAUX	Médecine Générale
M.	Rémi	DURAND	Médecine Générale
M.	Arnaud	GOUGET	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	Lucie	BERNARD	Anglais
M.	Didier	CARNET	Anglais
Mme	Catherine	LEJEUNE	Pôle Epidémiologie
M.	Gaëtan	JEGO	Biologie Cellulaire

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Marianne	ZELLER	Physiologie
-----	----------	---------------	-------------

PROFESSEURS AGREGES de L'ENSEIGNEMENT SECONDAIRE

Mme	Marceline	EVRARD	Anglais
Mme	Lucie	MAILLARD	Anglais

PROFESSEURS CERTIFIES

Mme	Anaïs	CARNET	Anglais
M.	Philippe	DE LA GRANGE	Anglais
Mme	Virginie	ROUXEL	Anglais (Pharmacie)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M.	Mathieu	BOULIN	Pharmacie clinique
M.	François	GIRODON	Sciences biologiques, fondamentales et cliniques
Mme	Evelyne	KOHLI	Immunologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M.	Philippe	FAGNONI	Pharmacie clinique
M.	Frédéric	LIRUSSI	Toxicologie
M.	Marc	SAUTOUR	Botanique et cryptogamie
M.	Antonin	SCHMITT	Pharmacologie

L'UFR des Sciences de Santé de Dijon, Circonscription Médecine, déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

COMPOSITION DU JURY

Président :

Monsieur le Professeur Yannick BEJOT

Membres :

Monsieur le Professeur Maurice GIROUD

Monsieur le Professeur François GHIRINGHELLI – Directeur de thèse

Monsieur le Docteur Cédric REBE – Directeur de thèse

Monsieur le Docteur Walid FARAH

SERMENT D'HIPPOCRATE

"Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque."

REMERCIEMENTS AU JURY

A Monsieur le Professeur Yannick BÉJOT,

Tu me fais l'honneur de présider ce jury.

Je tiens à te remercier pour ton accompagnement et ton enseignement pédagogique durant ces années d'internat. Merci pour ton soutien et ton enthousiasme à accompagner mes projets. Ta bienveillance et ton dynamisme portent haut les couleurs de la neurologie dijonnaise.

Sois assuré de toute ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

A Monsieur le Professeur Maurice Giroud,

C'est avec beaucoup d'émotion que je vous adresse ces remerciements. Pour votre disponibilité et votre soutien constant dans mes projets durant l'internat. Pour la chance d'avoir pu bénéficier de vos précieux enseignements durant lesquels vous avez su, mieux que personne, partager votre passion pour la neurologie. Pour votre œuvre inestimable dans l'édifice de la neurologie dijonnaise. Pour la source d'inspiration que vous êtes.

Soyez assuré de toute ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

A Monsieur le Professeur François Ghiringhelli,

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail et de m'avoir permis d'intégrer votre équipe lors de mon année recherche. Cette année a été l'occasion de discussions et de réflexions passionnantes sur mon sujet de recherche. Sans votre confiance, cette thèse n'aurait pas pu voir le jour.

Soyez assuré de toute ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

A Monsieur le Docteur Cédric Rébé,

Je te remercie d'avoir accepté de diriger ce travail. L'année recherche a été une aventure passionnante à tes côtés. Merci pour ton soutien dans les moments de doutes, pour ta patience (malgré les lignées cellulaires innocentes sacrifiées), et ta bienveillance. Merci pour tout le temps consacré à la relecture de ce travail.

Sois assuré de toute ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

A Monsieur le Docteur Walid Farah,

Je suis honorée de vous compter dans ce jury de thèse. J'ai eu l'occasion de travailler avec vous et je ne peux qu'admirer votre professionnalisme et votre disponibilité. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Soyez assuré de toute ma reconnaissance et de mon plus grand respect.

REMERCIEMENTS PRIVÉS

Table des matières

Liste des abréviations	13
Liste des figures et tableaux	15
Partie I : Introduction	17
Partie II : État de l'art	19
I) Epidémiologie du glioblastome	20
II) Présentation clinique.....	20
III) Imagerie.....	21
IV) Caractéristiques histologiques tumorales et zone péri-tumorale du glioblastome	22
A) Caractéristiques histologiques tumorales	22
B) Zone tumorale et péri-tumorale du glioblastome.....	23
V) Altérations cytogénétiques et moléculaires dans le glioblastome	24
A) Mutations des gènes IDH et méthylation du promoteur du gène MGMT	24
B) Autres altérations génétiques classiques dans le glioblastome.....	25
C) Classification OMS 2016.....	27
D) Classification de Verhaak	28
VI) Prise en charge thérapeutique.....	29
A) Traitement de première ligne	29
B) Prise en charge thérapeutique de la récurrence ou de la progression tumorale sous traitement	33
C) Nouvelles voies thérapeutiques dans le glioblastome.....	35
D) Soins de supports.....	36
VII) Principes de la glycolyse	37
A) La phosphorylation oxydative.....	38
B) La fermentation lactique (glycolyse anaérobie)	39
C) Régulation de la glycolyse	39
D) Effet Warburg	40
E) Conséquences de l'effet Warburg.....	40
F) Inhibiteurs de la glycolyse	41
VIII) La glycolyse dans le glioblastome	43
A) Couplage métabolique lactate-glucose entre astrocytes et neurones dans le cerveau sain	43
B) Glycolyse, glioblastome et migration cellulaire	44

Partie III : Hypothèse de travail	46
Partie IV : Matériels et Méthodes	48
I) Lignées cellulaires	49
II) Mesure de la glycolyse par l'automate Seahorse	49
III) Dosage de l'AMP (Adenosine mono Phosphate) cyclique	50
IV) Dosage du lactate extracellulaire.....	50
V) RT - qPCR (Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction).....	50
VI) Test de migration cellulaire	52
VII) Estimation de la prolifération et de la viabilité cellulaire au <i>crystal violet</i>	53
VIII) Analyse statistique	54
Partie V : Résultats	56
I) Hétérogénéité de la capacité de glycolyse des lignées humaines de glioblastome	56
A) Mesure du taux d'acidité extracellulaire avec l'automate Seahorse	56
B) Mesure du taux d'AMPc intracellulaire.....	57
II) Choix des modèles LN229 et U118-MG	57
III) La lignée U118-MG à haute capacité de glycolyse migre plus que la lignée LN229 à faible capacité de glycolyse	59
A) Test comparatif de la migration cellulaire	59
B) Evaluation de l'expression des gènes impliqués dans la migration cellulaire dans les lignées LN229 et U118-MG par RT-qPCR.....	60
III) L'inhibition de la glycolyse par le fénofibrate ou l'acide oxamique freine la migration des cellules de la lignée U118-MG.....	60
A) Inhibition de la glycolyse avec un traitement par fénofibrate	60
B) Test de migration cellulaire avec un traitement par fénofibrate	62
C) Test de migration cellulaire avec un traitement par de l'acide oxamique	63
D) Evaluation de l'impact d'un traitement inhibiteur de la glycolyse sur l'expression des gènes impliqués dans la migration cellulaire.....	64
IV) Le lactate favorise la migration des cellules de la lignée LN229.....	66
A) Test de migration cellulaire après un traitement par lactate sur la lignée LN229	66
B) Evaluation de l'impact d'un traitement par lactate sur l'expression des gènes impliqués dans la migration cellulaire.....	67
V) La récurrence à distance des glioblastomes semble favorisée par l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse et dans la migration cellulaire.....	68

Partie VI : Discussion et Perspectives	70
I) Contexte	71
II) Synthèse des principaux résultats.....	71
III) Le lactate: molécule de signalisation dans la migration cellulaire ?	72
IV) Choix du fénofibrate	73
V) Limites du modèle in-vitro	73
VI) Perspectives	74
Partie VII : Conclusions	76
Partie VIII : Bibliographie	78

Liste des abréviations

2-DG : 2-Déoxy-D-Glucose

ACTB : Actine B

ADN/ARN : Acide DésoxyriboNucléique / Acide RiboNucléique

ADP/AMP/ATP: Adénosine Diphosphate/ Adénosine Monophosphate/ Adenosine Triphosphate

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

ATRX : *Alpha-Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked*

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

CAR-T-cells : *Chimeric Antigen Receptors-T-cells*

CGFL : Centre Georges François Leclerc

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

ECAR : *ExtraCellular Acidification Rate*

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FDA : *Food and Drug Administration*

GLUT : *GLUcose Transporter*

HIF1 : *Hypoxia Inducible Factor 1*

HK2 : HexoKinase 2

HTIC : HyperTension IntraCrânienne

IDH : Isocitrate DesHydrogénase

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

LDHA : Lactate DesHydrogénase A

MCT : *Monocarboxylate Transporter*

MGMT : MéthylGuanine MéthylTransférase

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NF-κB : *Nuclear Factor-kappa B*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PD-1/PD-L1 : *Programmed cell Death -1 / Programmed Death-Ligand 1*

PKM2 : *Pyruvate kinase muscle isozyme M2*

PTBC : Plateforme de Transfert en Biologie Cancérologique

Liste des abréviations

PTEN : *Phosphatase and TENsin homolog*

PPAR : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*

RT-qPCR : *Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction*

TAMs : *Tumor Associated Macrophages*

TCGA : *The Cancer Genome Atlas*

TEP : *Tomographie par Emission de Positons*

TERT : *TElomerase Reverse Transcriptase*

TGF- β : *Tumor Growth Factor β*

TP53 : *Tumor Protein 53*

TTF : *Tumor Treating Fiels*

VEGFR : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

Liste des figures et des tableaux

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : IRM cérébrale d'un glioblastome.....	22
Figure 2 : Principales voies de signalisations activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase. ..	26
Figure 3 : Protocole Stupp.....	29
Figure 4 : Schéma représentatif de la glycolyse.....	38
Figure 5 : Représentation schématique des différences entre la phosphorylation oxydative (<i>oxidative phosphorylation</i>), la glycolyse anaérobie (<i>anaerobic glycolysis</i>) et la glycolyse aérobie (effet Warburg).	40
Figure 6 : Différents sites d'inhibition de la glycolyse.....	43
Figure 7 : Comparaison de l'expression des différents gènes impliqués dans la glycolyse dans les gliomes de haut grade.. ..	45
Figure 8 : Test de migration cellulaire.....	53
Figure 9 : Profil glycolytique représentatif des différentes lignées de glioblastomes avec mesure de l'ECAR avant et après injection de Roténone + Antimycine A puis de 2-DG.....	56
Figure 10 : Taux d'ECAR moyens des différentes lignées de glioblastomes.	56
Figure 11 : Concentrations intracellulaires moyennes d'AMPc dans chaque lignée.	57
Figure 12 : Comparaison de l'expression des principaux gènes impliqués dans la glycolyse chez LN229 et U118-MG.....	58
Figure 13 : Concentrations extracellulaires moyennes en lactate dans les lignées LN229 et U118-MG.	58
Figure 14 : Mesure de la prolifération cellulaire des différentes lignées de glioblastomes par un test de coloration au <i>crystal violet</i>	59
Figure 15 : Test de migration cellulaire réalisé sur les lignées LN229 et U118-MG.. ..	59
Figure 16 : Expression des différents gènes codant pour des protéines impliquées dans la migration cellulaire dans les lignées LN229 et U118-MG, mesurée par RT-qPCR.....	60
Figure 17 : Evaluation de la glycolyse dans les cellules U118-MG avec l'automate Seahorse, en condition non traitée (contrôle) ou traitée par fénofibrate à la concentration de 25 µM (FF25).	61
Figure 18 : Etude de l'expression des principaux gènes de la glycolyse (PKM2 et LDHA) dans les cellules U118-MG exposées à des doses croissantes de fénofibrate à 25 µM (FF25), 50 µM (FF50) et 100 µM (FF100) en comparaison aux cellules non traitées (<i>Untreated</i>).....	61
Figure 19 : Test de viabilité cellulaire au <i>crystal violet</i> avec la comparaison de l'absorbance entre les différents puits de cellules U118-MG non traitées (<i>Untreated</i>), traitées avec 25 µM de fénofibrate (FF25) ou 50 µM de fénofibrate (FF50).	62
Figure 20 : Test de migration cellulaire réalisé sur la lignée U118-MG sans fénofibrate (<i>Untreated</i>) ou avec 25 µM de fénofibrate (FF25).	63
Figure 21 : Test de migration cellulaire réalisé sur la lignée LN229, sans fénofibrate (<i>Untreated</i>) ou avec 25 µM de fénofibrate (FF25).. ..	63

Figure 22 : Test de migration cellulaire réalisé sur la lignée U118-MG sans acide oxamique (*Untreated*) ou avec 50 µM de d'acide oxamique (Ox50)..... 64

Figure 23 : Expression des différents gènes codant pour des protéines impliquées dans la migration cellulaire dans la lignée U118-MG lorsque les cellules sont exposées à des doses croissantes de fénofibrate, à 25 µM (FF25), 50 µM (FF50) et 100 µM (FF100) en comparaison aux cellules non traitées (*Untreated*)..... 65

Figure 24 : Expression des différents gènes codant pour des protéines impliquées dans la migration cellulaire dans la lignée U118-MG lorsque les cellules sont exposées à des doses croissantes de d'acide oxamique, à 25 µM (Ox25), 50 µM (Ox50) et 100 µM (Ox100) en comparaison aux cellules non traitées (*Untreated*)..... 66

Figure 25 : Test de migration cellulaire réalisé sur la lignée LN229 sans lactate (*Untreated*) ou avec une concentration 17 mM en lactate dans le milieu de culture cellulaire (Lactate17).. 67

Figure 26 : Expression comparative des différents gènes impliqués dans la migration cellulaire dans la lignée LN229 lorsque le milieu de culture cellulaire est supplémenté en lactate (LN229 Lact17) ou non (LN229 *Untreated*)..... 67

Figure 27 : Expressions comparatives des gènes de la glycolyse (A) et de la migration cellulaire (B) entre le groupe de patients ayant récidivé à distance (*Distant relapse*) et le groupe de patients ayant récidivé localement (*Localized relapse*), de leurs glioblastomes..... 69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Extrait de la classification OMS 2016 des tumeurs cérébrales primitives 27

Tableau 2 : Classification moléculaire des glioblastomes..... 28

Tableau 3 : Echelle OMS..... 30

Tableau 4 : Echelle de Karnofsky 30

Tableau 5 : Règles de contourage dans le glioblastome selon l'EORTC ou le RTOG..... 33

Tableau 6 : Critères RANO..... 34

Tableau 7 : Liste des *primers* sens (Fw) et anti-sens (Rev) utilisés pour la mesure de l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse et des gènes impliqués dans la migration des cellules tumorales gliales. 52

Tableau 8 : Caractéristiques des patients sélectionnés, ayant présenté une récurrence locale ou à distance de leurs glioblastomes..... 68

Partie I : Introduction

Introduction

Le glioblastome est la tumeur cérébrale primitive maligne la plus fréquente chez l'adulte (Ostrom et al. 2013; Baldi et al. 2010). Son pronostic est sombre avec une récurrence tumorale constante avec les thérapies actuelles. Ces dernières années, la biologie moléculaire a permis de souligner l'hétérogénéité intertumorale mais également intratumorale dans le glioblastome avec des sensibilités aux chimiothérapies et à la radiothérapie également variables.

L'altération des voies métaboliques cellulaires est classique dans les cancers, contribuant à l'échappement tumoral et à la résistance aux thérapies antinéoplasiques. Dans le glioblastome, l'exacerbation de la voie de la glycolyse dans certaines cellules tumorales pourrait leur conférer un avantage fonctionnel, participant à la récurrence tumorale.

Par ce travail, nous avons cherché à savoir si la glycolyse pouvait favoriser la capacité de migration des cellules tumorales dans le glioblastome.

Partie II : État de l'art

I) Épidémiologie du glioblastome

Les tumeurs cérébrales primitives de l'adulte regroupent plusieurs types histologiques allant des proliférations bénignes et malignes des cellules de la glie ou des méninges, aux lymphomes cérébraux primitifs. Le glioblastome est la tumeur gliale la plus courante. Elle affecte plus fréquemment les hommes que les femmes (ratio de 1.5/1) et prédomine chez les patients de plus de 60 ans (Baldi et al. 2010; Ostrom et al. 2013).

Bien que l'incidence du glioblastome – estimée à 5 nouveaux cas/100000 habitants/an – soit en perpétuelle augmentation (Baldi et al. 2010), les facteurs de risque environnementaux ne sont pas clairement identifiés. Les rayonnements ionisants sont les seuls cancérogènes retenus pour cette tumeur (Braganza et al. 2012), tandis que l'implication des pesticides et des ondes électromagnétiques reste encore soumise à controverse.

Plusieurs syndromes génétiques peuvent prédisposer à la survenue de gliomes voire de glioblastomes. Parmi ces syndromes, on peut citer la neurofibromatose de type 1, le syndrome de Li-Fraumeni et la sclérose tubéreuse de Bourneville qui correspondent respectivement aux mutations des gènes NF1 (*Neurofibromine 1*), TP53 (*Tumor Protein 53*) et TSC1 (*Tuberous Sclerosis Complex 1*), (Goodenberger et Jenkins 2012). Ces mutations sont de transmission autosomique dominante. Le syndrome de Turcot est une variante génétique de la polypose adénomateuse familiale ou d'un syndrome HNPCC (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*). Elle associe aux tumeurs du système nerveux central, une prédisposition à la survenue d'un cancer colorectal. Des mutations des gènes APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) ou des gènes du système de réparation de mésappariements de l'ADN, de transmission autosomique dominante, sont retrouvées dans le syndrome de Turcot.

II) Présentation clinique

Les manifestations cliniques pouvant mener à la suspicion d'un processus expansif intracrânien sont diverses et parfois frustrées. La céphalée, s'inscrivant souvent dans le cadre d'un syndrome d'hypertension intracrânienne est un point d'appel fréquent. Elle peut s'accompagner d'un déficit sensitivomoteur ou de troubles aphasiques d'installation progressive – dits en tache d'huile – corrélés à la localisation de la lésion.

Les troubles cognitifs, d'installation subaigüe, prennent souvent l'aspect d'un syndrome confusionnel parfois favorisé par une épilepsie lésionnelle qui peut être le mode de révélation du glioblastome dans 20 % des cas (Dührsen et al. 2019).

III) Imagerie

L'imagerie cérébrale est un outil incontournable dans le diagnostic de glioblastome mais aussi dans la mise en évidence des complications locales liées à la tumeur.

Le scanner cérébral avec injection de produit de contraste, qui reste un examen de débrouillage, montre généralement une lésion hypodense, aux limites floues avec un rehaussement périphérique.

L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) cérébrale constitue l'imagerie de référence. Elle permet d'étudier la lésion dans les trois plans de l'espace grâce aux séquences T1 sans et avec injection de Gadolinium, T2, T2 FLAIR (*FLuid-Attenuated Inversion Recovery*) et de diffusion (Figure 1). Ces séquences de base peuvent renseigner sur le caractère hétérogène de la lésion, avec un centre nécrotique, un œdème sur la séquence FLAIR et une prise de contraste au gadolinium signant la rupture de la barrière hémato encéphalique (BHE). La séquence de diffusion avec étude de la cartographie ADC (*Apparent Diffusion Coefficient*) est d'une aide précieuse pour écarter les diagnostics différentiels tel que l'abcès, qui contrairement au glioblastome apparaît en hypersignal en diffusion du fait de son caractère visqueux.

La séquence de perfusion est une séquence utile pour mettre en évidence la néoangiogénèse caractéristique de ces lésions gliales de haut grade, permettant de les différencier des lésions secondaires métastatiques (Suh et al. 2018).

En cas de doute diagnostique persistant quant à la nature tumorale ou quant au degré de malignité de la lésion en question, la spectroscopie par résonance magnétique est d'un apport intéressant. On observe généralement dans les tumeurs du système nerveux central, un pic de choline (Cho) élevé, reflet du renouvellement cellulaire associé à un pic de N acétyl-aspartate (NAA) bas, reflet de l'altération de l'intégrité neuronale (Shimizu et al. 2000). L'importance du pic de lactates et de lipides, reflétant respectivement le métabolisme tumoral et la nécrose cellulaire, est corrélée à l'agressivité de la tumeur (McKnight, 2004).

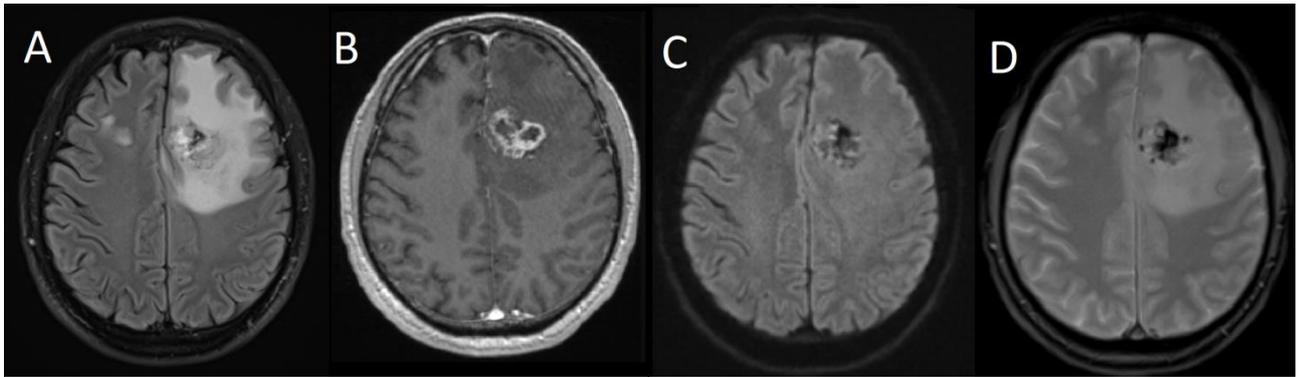


Figure 1: IRM cérébrale d'un glioblastome.

Sur la séquence FLAIR (A) la lésion est hétérogène avec un œdème périlésionnel important responsable d'un effet de masse. Cette lésion prend le contraste de manière hétérogène (B), apparaît en hyposignal sur la séquence de diffusion (C). La séquence T2 echo de gradient (D) révèle les remaniements hémorragiques au sein de la lésion.

IV) Caractéristiques histologiques de la zone tumorale et de la zone péritumorale du glioblastome

La structure lésionnelle du glioblastome peut être divisée en deux zones : la zone tumorale et la zone péritumorale.

A) Caractéristiques histologiques tumorales

Les cellules du système nerveux central peuvent être essentiellement classées en deux grandes catégories : les neurones et les cellules gliales. Les neurones sont des cellules hautement différenciées, généralement dépourvues de capacité de division cellulaire et chargées de transmettre l'influx nerveux. Les cellules gliales constituent le tissu de soutien des neurones et sont chargées de l'homéostasie du tissu nerveux.

Parmi les cellules gliales, on distingue les astrocytes, les oligodendrocytes (ou cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique), les épendymocytes et enfin la microglie.

Le glioblastome correspond à une prolifération de cellules gliales de haut grade, en général de phénotype plutôt astrocytaire. Cette tumeur survient classiquement de novo (glioblastome primaire) chez les sujets âgés ou dérive d'une tumeur gliale de bas grade transformée (glioblastome secondaire) chez les sujets plutôt jeunes. Dans les deux cas, l'examen anatomopathologique retrouve un tissu composé de cellules anormales à index mitotique élevé, avec des atypies cyto-nucléaires, des foyers de nécrose dits « en palissade » ainsi qu'une prolifération microvasculaire anormale témoin de la néoangiogénèse. Il existe quelques variants histologiques tels que le glioblastome à cellules géantes, le glioblastome épithélioïde, le gliosarcome et le glioblastome à composante oligodendrogliale qui rendent parfois difficile le diagnostic différentiel avec d'autres types de tumeurs gliales. L'examen anatomopathologique de la lésion pose le

diagnostic de certitude. La pièce tumorale est obtenue soit après exérèse chirurgicale, soit après une biopsie, lorsque la chirurgie n'est pas réalisable. Afin d'obtenir une meilleure sensibilité diagnostique, les prélèvements par biopsie doivent être multiples et intéresser les zones de nécrose ou de prise de contraste de la lésion. La biopsie "à ciel ouvert" sera préférée en cas de lésions de localisation superficielle et la biopsie stéréotaxique sera réservée aux lésions de localisation plus profonde.

B) Zone tumorale et péri-tumorale du glioblastome

La zone tumorale est le siège d'une prolifération cellulaire gliale anarchique comportant le plus souvent une nécrose centrale. Sa composition est très hétérogène avec la coexistence de populations cellulaires de phénotypes et de génotypes différents. Parmi elles, on retrouve des cellules aux caractéristiques de cellules souches, résistantes aux chimiothérapies et à la radiothérapie (Chen et al. 2012a). Ces cellules, également dénommées « cellules initiatrices de gliome », sont fortement indifférenciées, possèdent des propriétés d'autorenouvellement et peuvent être des précurseurs des différentes cellules, plus ou moins différenciées, composant le tissu tumoral (Beier et al. 2007). L'autorenouvellement de ces cellules tumorales est favorisé par l'environnement hypoxique intratumoral, responsable de la synthèse de la protéine HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*) (Soeda et al. 2009). Après de ces cellules tumorales coexistent des cellules immunitaires tels que les macrophages associés à la tumeur (TAMs), des lymphocytes T CD8+ et CD4+ avec une proportion importante de T régulateurs (Doucette et al. 2013).

La zone péri-tumorale peut apparaître macroscopiquement normale sur les imageries radiologiques mais également aux yeux du chirurgien, lors de la résection tumorale. Cependant, elle est le siège d'un infiltrat tumoral responsable de 90% des récurrences (Petrecca et al. 2013). Ces cellules tumorales infiltrantes ont un index mitotique moins élevé mais possèdent des capacités de motilité plus importantes. Elles migrent à distance du site initial de la tumeur, demeurent résistantes aux chimiothérapies et à la radiothérapie et participent à la récurrence tumorale (Chen et al. 2012b; Galli et al. 2004).

V) Altérations cytogénétiques et moléculaires dans le glioblastome

A) Mutations des gènes IDH et méthylation du promoteur du gène MGMT

Parmi les altérations moléculaires retrouvées dans le glioblastome, la mutation du gène IDH (Isocitrate DésHydrogénase) et la méthylation du promoteur du gène MGMT (Méthyle Guanine Méthyl Transférase) sont deux marqueurs de bon pronostic.

Il existe trois types d'isocitrate déshydrogénases, respectivement codées par les gènes IDH1, IDH2 et IDH3. IDH1 se trouve principalement dans le cytoplasme cellulaire et dans les peroxysomes, tandis qu'IDH2 et IDH3 se trouvent dans la matrice mitochondriale. Ces trois enzymes catalysent la transformation de l'isocitrate en α -cétoglutarate en réduisant le NAD(P)⁺ en NAD(P)H. La mutation des gènes IDH1 et IDH2 aboutit à la production d'un oncométabolite, le D-2-hydroxyglutarate (D-2HG) qui va entraîner des modifications épigénétiques au niveau de la cellule gliale (hyperméthylation d'histones) et éteindre l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeurs (Cohen, Holmen, et Colman 2013). IDH3 est une enzyme clé dans la régulation du cycle de Krebs. Sa mutation est souvent responsable d'une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les gliomes possédant une mutation sur un de ces gènes IDH sont toutefois de meilleur pronostic car plus sensibles au stress oxydatif occasionné par les thérapies anticancéreuses (SongTao et al. 2012). Dans le glioblastome, la mutation la plus fréquemment retrouvée est celle du codon 132 de l'IDH1 (12 % des cas), et elle est corrélée à une survie plus longue des patients (Nobusawa et al. 2009).

Le gène MGMT code pour une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) endommagé notamment par les chimiothérapies alkylantes comme le témozolomide. La présence d'une méthylation du promoteur MGMT est responsable d'une inactivation de ce gène, rendant la cellule tumorale plus vulnérable à la chimiothérapie. La recherche de cette méthylation par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est systématique lors de l'analyse histo-moléculaire des glioblastomes car elle influe directement sur la prise en charge thérapeutique. Elle est retrouvée dans 35 % des glioblastomes et est corrélée à une survie plus longue des patients (Esteller et al. 2000; Hegi et al. 2005).

L'association d'une mutation IDH et d'une méthylation du promoteur MGMT chez un même patient porteur d'un glioblastome est corrélée à une survie plus longue, indépendamment du traitement reçu (Yan et al. 2009).

B) Autres altérations génétiques classiques dans le glioblastome

➤ TP53

Le gène codant pour la protéine TP53 (*Tumor Protein 53*) est situé sur le bras court du chromosome 17. C'est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation des voies métaboliques et donc dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. La protéine TP53 agit comme un régulateur de la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. La voie de régulation TP53 est altérée dans 85 % des glioblastomes et cette altération semble être un évènement précoce dans le processus de gliomagenèse (Zhang et al. 2018). Le déficit en protéine TP53 peut résulter soit d'une inactivation par mutation du gène, soit d'une régulation post-traductionnelle de la protéine aboutissant à sa dégradation. Cette régulation post-traductionnelle peut être médiée par des protéines surexprimées de manière pathologique dans le glioblastome telles que MDM2 (*murine double minute 2*). L'inactivation de la voie TP53 est corrélée à une résistance aux traitements anticancéreux (Birner et al. 2002).

➤ PTEN

Le gène PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) est également un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Il est situé sur le bras long du chromosome 10. Dans le glioblastome, on observe jusqu'à 70 % de perte d'hétérozygotie du chromosome 10 (par délétion de matériel) parfois responsable d'une inactivation du gène PTEN (Crespo et al. 2015). Cette inactivation peut également se faire par le biais de mutations ponctuelles du gène (25 % des cas) (Ohgaki et Kleihues 2007).

➤ Voie des récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs à activité tyrosine kinase constituent une famille de récepteurs membranaires ayant pour ligands des facteurs de croissance et d'autres molécules de signalisation extracellulaire. Lors de l'activation de ces récepteurs par la fixation du ligand, plusieurs voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire peuvent être activées par une cascade de phosphorylations intra-cytoplasmiques. Les principales voies de signalisation intracellulaires impliquées sont les voies RAS/RAF/MAPK (*RAS/RAF/Mitogen-Activated Protein Kinase*) et PI3K/AKT/mTOR (*Phosphoinositide-3-kinase/AKT/mecanistic Target Of Rapamycin*) (Figure 2).

L'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) appartient à cette famille de récepteurs à activité tyrosine kinase et l'amplification du gène EGFR est présente dans plus de la moitié des glioblastomes (Brennan et al. 2013). Elle entre souvent dans le cadre d'un gain du bras court du chromosome 7. Cette amplification du gène EGFR peut également être la conséquence d'une mutation. La mutation la plus

fréquemment retrouvée est le variant EGFRvIII qui correspond à une délétion des exons 2 à 7 du gène sauvage. Elle mène à une prolifération cellulaire dérégulée et reste corrélée à un mauvais pronostic dans le glioblastome (Lee et al. 2006).

Bien que l'environnement hypoxique du glioblastome puisse à lui seul entraîner la surexpression du VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*), il existe une amplification du gène VEGF lui-même, dans plus d'un tiers des glioblastomes (Joensuu et al. 2005).

➤ *ATRX et TERT*

Le pool de division d'une cellule est déterminé par la longueur des télomères de ses chromosomes. Chaque division cellulaire aboutit à un raccourcissement de ces télomères. C'est le phénomène de senescence répliquative. Les mutations du promoteur TERT (*TElomerase Reverse Transcriptase*), fréquemment retrouvées dans les glioblastomes, contribuent à un maintien anormal des télomères et donc à une capacité de division cellulaire illimitée (Gocha et al. 2012). Les mutations du gène ATRX (*Alpha-Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked*), également impliquée dans le maintien des télomères, s'observent dans les tumeurs gliales astrocytaires avec mutation du gène IDH. Les mutations du promoteur TERT et du gène ATRX sont mutuellement exclusives (Gocha et al. 2012).

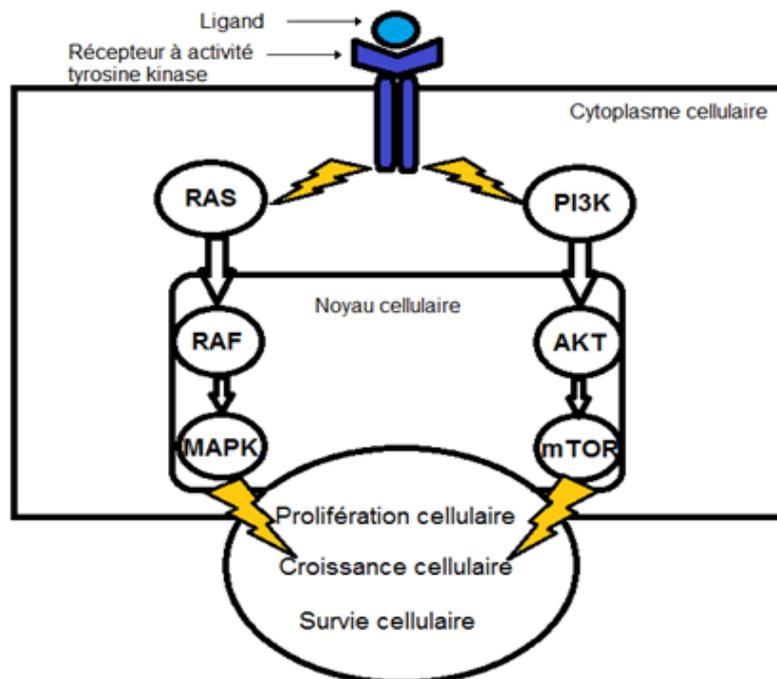


Figure 2: Principales voies de signalisations activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase.

La fixation extracellulaire du ligand sur le récepteur induit une autophosphorylation du récepteur sur ses résidus de tyrosine. Cela entraîne le recrutement de protéines telles que RAS ou PI3K qui vont transmettre le signal via une cascade de phosphorylations et induire l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la croissance et la survie cellulaire.

C) Classification OMS 2016

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a proposé une classification des tumeurs cérébrales primitives, en fonction de leur type cellulaire, de leur caractère infiltrant et de la présence ou non d'atypies nucléaires (Tableau 1). Dans cette classification révisée en 2016, le glioblastome correspond au type IV, étant le plus haut grade de malignité d'astrocytome (Louis et al. 2016).

La biologie moléculaire, outil incontournable dans la caractérisation des glioblastomes permet de distinguer les formes primaires (*de novo*) – représentant 90 % des glioblastomes – des formes secondaires (Ohgaki et Kleihues 2013). En effet, les glioblastomes secondaires, issus de la transformation de gliomes de bas grade, comportent des altérations moléculaires spécifiques dont la plus importante est la mutation du gène IDH1 (Nobusawa et al. 2009).

La présence d'une codélétion 1p/19q permet de reclasser certaines lésions présentant des caractéristiques histologiques communes avec le glioblastome, en oligodendriome.

Les mutations de type H3K27 qui correspondent à une acétylation ou à une triméthylation de la lysine en position 27 de l'histone 3, caractérisent les gliomes diffus de la ligne médiane (Schwartzentruber et al. 2012; Wu et al. 2012). Ces gliomes, particulièrement agressifs, se retrouvent surtout chez les sujets jeunes et chez l'enfant.

Type cellulaire tumoral	Type moléculaire	Grade
Astrocytome pilocytique		I
Astocytome subépendymaire à cellules géantes		I
Astrocytome diffus	IDH muté	II
Xantoastrocytome pléomorphe		II
Oligodendriome	IDH muté/ Codélétion 1p/19q	II
Xantoastrocytome pléomorphe diffus		III
Oligodendriome anaplasique	IDH muté/ Codélétion 1p/19q	III
Astrocytome anaplasique	IDH muté	III
<u>Glioblastome</u>	IDH non muté	IV
<u>Glioblastome</u>	IDH muté	IV
<u>Gliomes diffus de la ligne médiane</u>	Mutant H3K27	IV

Tableau 1: Extrait de la classification OMS 2016 des tumeurs cérébrales primitives (Louis et al. 2016)

D) Classification de Verhaak

Une nouvelle classification ((Verhaak et al. 2010, Tableau 2), se basant sur les données de l'atlas génomique des cancers combinant l'étude génomique, transcriptomique et épigénétique de séries de glioblastomes sépare :

- le glioblastome « proneural » qui touche plutôt des patients jeunes avec des mutations fréquentes des gènes IDH1/2, TP53 et des amplifications des gènes PDGFRA (*Platelet Derived Growth Factor*), CDK4/6 (*Cyclin-Dependent Kinase 4/6*) et HGFR (*Hepatocyte Growth Factor Receptor*) ;
- le glioblastome de type « neural » qui n'a pas d'altération génique spécifique mais qui présente souvent des mutations du gène EGFR (*Epidermal Growth Factor*) ;
- les glioblastomes classiques qui présentent une amplification du gène EGFR avec une perte de fonction du gène PTEN (*Phosphatase and TENSin homolog*) ;
- le glioblastome mésenchymateux, de pronostic sombre, qui comprend des mutations sur le gène de la neurofibromatose 1, une perte de fonction de TP53 et de CDKN2A (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*).

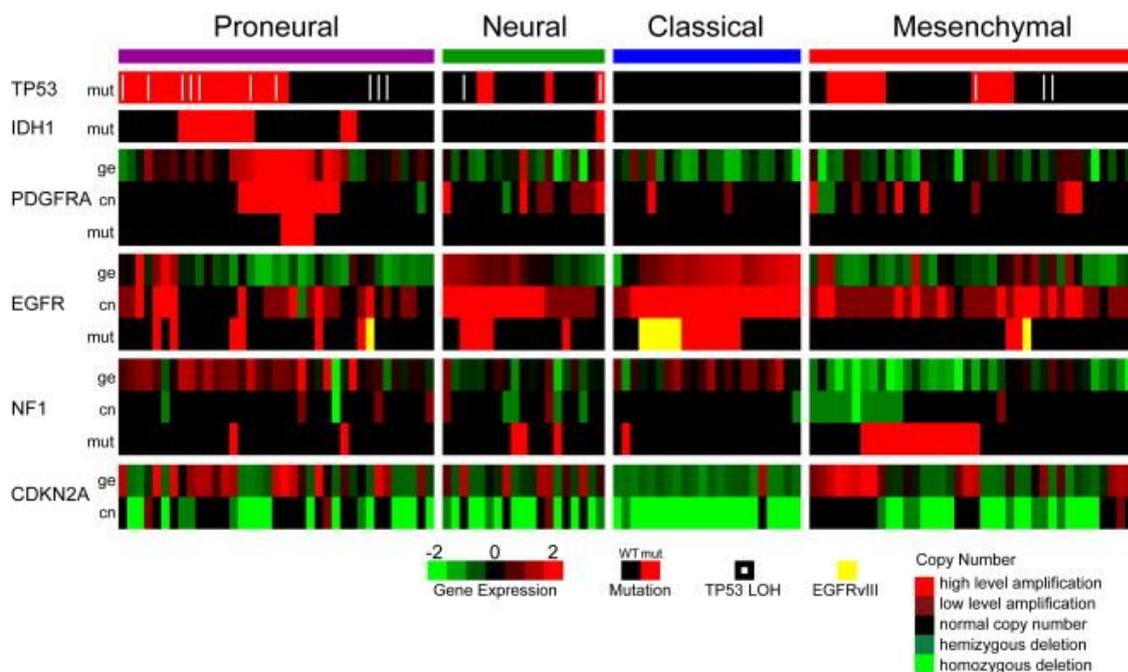


Tableau 2 : Classification moléculaire des glioblastomes (Verhaak et al. 2010)

VI) Prise en charge thérapeutique

A) Traitement de première ligne

La prise en charge thérapeutique du glioblastome en première ligne est consensuelle. Elle repose sur le protocole Stupp, du nom de la première étude de phase III ayant démontré un bénéfice significatif sur la survie globale médiane (14,6 mois) (Stupp et al. 2005). Ce protocole, réalisé après une résection chirurgicale maximale (lorsqu'elle est possible), comporte une chimiothérapie par témozolomide avec radiothérapie concomitante puis un relai par témozolomide seul en traitement adjuvant (Figure 3).

La décision thérapeutique se doit d'être posée en réunion de concertation pluridisciplinaire, réunissant au minimum un neurochirurgien, un oncologue (ou neurooncologue) et un radiothérapeute. La décision repose sur l'état général du patient défini par les échelles OMS et/ou de Karnofsky (Tableaux 3 et 4), ses comorbidités, l'accessibilité chirurgicale de la lésion et son volume. Le consentement du patient est toujours recherché avant tout traitement. La prise en charge doit être adaptée à chaque patient avec la remise d'un plan personnalisé de soins selon les recommandations de l'HAS (Haute Autorité de la Santé) en 2010.

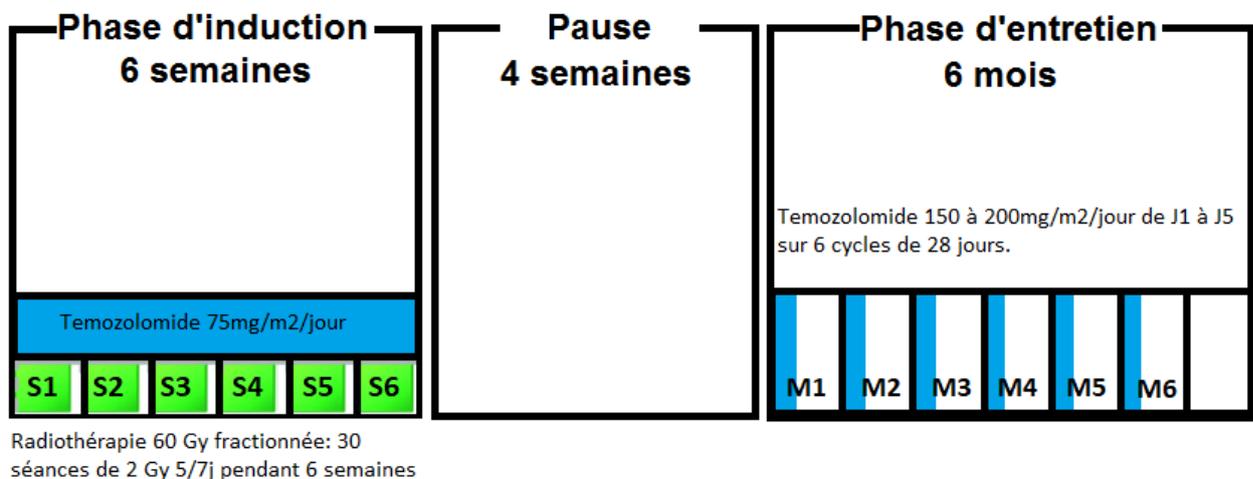


Figure 3: Protocole Stupp.

Phase d'induction par radiochimiothérapie concomitante (après la chirurgie) puis phase d'entretien par témozolomide mensuel, après une pause de 4 semaines. (Stupp et al. 2005).

État de l'art

Indice	Description
0	Asymptomatique (activité normale : aucune restriction à poursuivre les activités précédant l'affection).
1	Symptomatique (gêné pour les activités physiques soutenues mais capable de se déplacer seul et d'assurer un travail léger ou sédentaire, par exemple un travail de bureau ou le ménage).
2	Symptomatique, alité moins de 50 % de la journée (capable de se déplacer seul et de s'occuper de soi-même mais incapable de produire un travail léger).
3	Symptomatique, alité plus de 50 % de la journée, sans y être confiné (capable de prendre soin de soi-même de manière limitée, alité ou confiné au fauteuil plus de 50 % de la journée).
4	Confiné au lit (totalement dépendant, incapable de prendre soin de soi-même, confiné au lit ou au fauteuil).
5	Mort.

Tableau 3 : Échelle OMS

Indice	Description
100	Normal ; aucune plainte, aucun signe de maladie.
90	En mesure de poursuivre une activité normale ; signes ou symptômes mineurs de maladie.
80	Activité normale, avec un effort ; quelques signes ou symptômes de maladie.
70	Autonome ; incapable de poursuivre une activité normale ou de travailler de façon active.
60	Nécessité occasionnelle d'assistance mais capacité de pourvoir à ses besoins essentiels.
50	Nécessité d'aide considérable à la personne, soins médicaux fréquents.
40	Invalide ; nécessité de soins et d'assistance spécifiques.
30	Complètement invalide ; indication d'hospitalisation, pas de risque imminent de décès.
20	Très malade ; hospitalisation nécessaire, traitement actif ou de support nécessaire.
10	Moribond ; issue fatale proche.
0	Décédé.

Tableau 4 : Échelle de Karnofsky

➤ *Chirurgie*

Les critères d'opérabilité dépendent de l'état général du patient, de ses comorbidités mais aussi de la localisation de la lésion.

La chirurgie est à but diagnostique et thérapeutique. Elle permet de caractériser la lésion sur le plan histologique et biomoléculaire mais elle permet surtout de réduire fortement le volume de la tumeur.

La résection chirurgicale optimale est macroscopiquement totale. Elle n'est toutefois pas toujours possible du fait des limitations fonctionnelles au niveau cérébral.

Les examens d'imagerie préopératoires sont d'une aide précieuse pour guider les limites de la résection. Ils sont le support des techniques chirurgicales guidées par la neuronavigation notamment pour les lésions localisées en profondeur.

L'IRM fonctionnelle permet de préserver au mieux les zones cérébrales fonctionnelles à proximité de la tumeur. La chirurgie en condition éveillée peut également aider à réaliser une cartographie fonctionnelle aux abords de la tumeur afin de limiter le risque de déficit neurologique post-opératoire (De Witt Hamer et al. 2012).

La résection fluoroguidée avec le 5 ALA (acide 5-aminolévulinique) améliore la qualité de l'exérèse et la survie sans récurrence des patients (Stummer et al. 2006; Guyotat et al. 2016). En effet, le 5-ALA est une molécule fluorescente, précurseur de l'hème, impliquée dans le métabolisme des porphyrines dont l'accumulation est classique dans les tumeurs malignes. Le 5-ALA est administré au patient, par voie orale, 3 heures avant la chirurgie et permet, lors de la résection chirurgicale, la visualisation des cellules gliales malignes à l'aide d'une lumière bleue.

Une IRM cérébrale avec injection de gadolinium doit être réalisée dans les 48 heures suivant la chirurgie afin d'évaluer précisément la qualité de la résection tumorale. La résection du glioblastome est considérée comme macroscopiquement totale lorsqu'il n'est pas retrouvé de résidu tumoral ou de prise de contraste anormale. C'est un élément pronostique majeur car la présence d'un résidu tumoral post-opératoire impacte négativement la survie (Chaichana et al. 2014; Grabowski et al. 2014).

➤ *Chimiothérapie*

Le témozolomide est un agent alkylant ayant démontré son efficacité dans le traitement de plusieurs tumeurs malignes solides, y compris les tumeurs cérébrales primitives malignes (O'Reilly et al. 1993 ; Agarwala et Kirkwood 2000). Son petit poids moléculaire et son caractère lipophile lui confèrent l'avantage de traverser la barrière hémato-encéphalique plus facilement que d'autres molécules de la même famille. Le mécanisme d'action du témozolomide repose sur la création de dommages irréparables de l'ADN des cellules proliférantes, par le biais de l'alkylation des résidus de guanine. La méthylation du promoteur du gène MGMT est un facteur prédictif de la réponse du témozolomide.

L'administration du témozolomide est orale et se fait en deux phases (Stupp et al. 2005).

Phase d'induction ou chimiothérapie concomitante à la radiothérapie :

La prise du témozolomide est orale et quotidienne pendant 6 semaines. Elle se fait à jeun, une heure avant la radiothérapie, à la dose de 75mg/m² de surface corporelle/jour pendant toute la durée de la radiothérapie.

Phase d'entretien ou chimiothérapie adjuvante

Elle est débutée 4 semaines après la fin de la radiochimiothérapie concomitante et après réalisation de l'IRM cérébrale considérée comme de référence.

La prise du témozolomide se fait oralement, à jeun pendant les 5 premiers jours de chaque mois. Lors de la première cure, la dose administrée est de 150 mg/m² de surface corporelle/jour. Puis, la dose est augmentée à 200 mg/m² de surface corporelle/jour pendant 5 jours, à partir de la 2ème cure, lorsque la tolérance hématologique est bonne. Les cures sont répétées tous les 28 jours, pour une durée de 6 cycles.

Une vérification de la numération formule sanguine et du bilan hépatique est nécessaire avant chaque cycle de témozolomide, afin de ne pas méconnaître une neutropénie ou une thrombopénie, qui sont les complications classiques de ce traitement.

➤ *Radiothérapie*

La radiothérapie doit être débutée dans un délai de 2 à 6 semaines après la chirurgie sous réserve d'une bonne cicatrisation du scalp. En cas de simple biopsie, elle peut être débutée plus tôt.

Un scanner de centrage, complété par une IRM cérébrale, est réalisé avant la radiothérapie afin de repreciser le site lésionnel et le lit d'irradiation.

Le contourage des volumes cibles est réalisé avec épargne des organes sains en fonction des règles l'EORTC (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*) ou du RTOG (*The Radiation Therapy Oncology Group*) (Ataman et al. 2004; Tsien et al. 2009). Le champ d'irradiation est défini en prenant en compte les différents volumes d'intérêt (Tableau 5) :

- Le GTV (*Gross Tumor Volume*) correspond au volume tumoral macroscopique identifié sur l'imagerie.
- Le CTV (*Clinical Target Volume*) correspond au volume cible clinique c'est-à-dire qu'il comprend le GTV et une marge de sécurité de 2 cm autour de la lésion.
- Le PTV (*Planning Target Volume*) correspond au volume cible planifié. Il comprend donc le GTV et une marge d'incertitude pour prendre en compte les variations de positionnement et les mouvements éventuels des organes du patient.

La dose et le fractionnement sont conditionnés par l'état général du patient. Chez les patients de moins de 70 ans, en bon état général la dose standard est de 60 Grays en 30 fractions de 2 Grays par jour, étalées sur 6 semaines.

	EORTC	RTOG
GTV	Prise de contraste sur l'IRM initiale ou cavité opératoire et prise de contraste résiduelle sur l'IRM postopératoire en séquence T1 avec injection de gadolinium.	Anomalies en T2 ou FLAIR en incluant la cavité opératoire et la prise de contraste résiduelle en IRM.
CTV	Marge de 2 cm autour du GTV gliome ou Marge de 3 cm autour du GTV gliome	Marge de 2 cm autour du GTV gliome + œdème ou Marge de 2.5cm autour de GTV + prise de contraste
PTV	CTV + 3-5mm	CTV + 3-5mm

Tableau 5: Règles de contourage dans le glioblastome selon l'EORTC ou le RTOG (Ataman et al. 2004; Tsien et al. 2009).

➤ *Particularités chez le sujet âgé et/ou avec un score OMS > 2 (Karnofsky < 70)*

Chez les patients âgés de plus de 70 ans, lorsque le score OMS est > 2 (ou Karnofsky < 70) et en présence d'une méthylation du promoteur du gène MGMT, un traitement par témozolomide peut être proposé avec parfois une radiothérapie hypofractionnée afin de limiter le risque de leucoencéphalopathie post-radique.

En l'absence de méthylation du promoteur MGMT, le bénéfice attendu de la chimiothérapie est faible. Le patient peut ne bénéficier que de la radiothérapie, avec fractionnement des doses si l'état général le permet.

B) Prise en charge thérapeutique de la récurrence ou de la progression tumorale sous traitement

Au décours de la chimiothérapie, une surveillance radiologique est mise en place avec une IRM cérébrale de contrôle tous les 3 mois. L'IRM de référence est réalisée 1 mois après la fin de la radiothérapie. La réponse au traitement est appréciée selon les critères RANO (*Response Assessment in Neuro Oncology*) (Tableau 6) (Wen et al. 2010).

État de l'art

	Réponse complète	Réponse partielle	Maladie stable	Progression
Etat clinique	Stable ou amélioré	Stable ou amélioré	Stable ou amélioré	Altéré
Hypersignal T2/Flair	Stable ou diminué	Stable ou diminué	Stable ou diminué	Augmenté
Prise de contraste (gadolinium)	Absence	Diminution supérieure ou égale à 50%	Régression de moins de 50 % ou progression de moins de 25%	Augmentation de plus de 25 %
Nouvelles lésions	Absence	Absence	Absence	Présence
Corticothérapie	Absence	Stable ou diminuée	Stable ou diminuée	
Critères requis	Tous	Tous	Tous	Un seul

Tableau 6: Critères RANO (Wen et al. 2010)

La récurrence tumorale est la règle du fait du caractère infiltrant et très invasif du glioblastome. Il n'y a cependant pas de consensus concernant la prise en charge thérapeutique de seconde ligne. Il est impératif d'éliminer une radionécrose (ou pseudoprogression), qui reste le diagnostic différentiel principal de la récurrence. Cette pseudoprogression apparaît chez 20 à 30 % des patients ayant bénéficié d'une irradiation et correspond aux lésions induites par la radiothérapie sur le parenchyme cérébral (Taal et al. 2008). Elle survient en général dans un délai de 2 à 3 mois après la radiothérapie et apparaît sur l'imagerie comme une majoration en taille de la lésion ou comme une prise de contraste suspecte. En cas de récurrence tumorale, l'IRM multimodale avec séquence de perfusion mettra en évidence sur le site lésionnel, une hypervascularisation témoin de la néoangiogénèse (Matsusue et al. 2010). Le TEP scanner cérébral aux acides aminés marqués possède également une valeur prédictive élevée pour la distinction entre la radionécrose et un phénomène de récurrence ou de progression tumorale où sera retrouvé un hypermétabolisme local (Pöpperl et al. 2004).

Lorsque la récurrence tumorale est établie, une reprise chirurgicale peut être proposée aux patients en bon état général avec mise en place d'une chimiothérapie locale, sur les berges d'exérèse de la lésion, par implants de carmustine (Gliadel[®])

Une nouvelle irradiation de la lésion en conditions stéréotaxiques demeure une alternative ou un complément à la chirurgie lorsque la lésion est de volume limité, mais elle expose à un risque de radionécrose sur les sites préalablement irradiés (Kazmi et al. 2019).

Différents choix thérapeutiques sont possibles concernant la chimiothérapie. Si le patient a été initialement répondeur au témozolomide, une reprise de cette chimiothérapie est envisageable lors de la récurrence. Elle peut être administrée selon un schéma continu ou séquentiel.

D'autres chimiothérapies de type nitrosurée – telles que la bélustine, la carmustine et la fotémustine – peuvent être utilisées à la place du témozolomide, notamment en présence d'une méthylation du

promoteur du gène MGMT. Les taux de réponse à ces chimiothérapies dans les récurrences de glioblastome restent de l'ordre de 5 à 25 % (Addeo et al. 2011 ; Beuchet 2012).

Le bévécizumab est un anticorps monoclonal ciblant le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Plusieurs études rapportent un allongement de la survie sans progression lors de l'administration du bévécizumab dans les récurrences de glioblastome (Friedman et al. 2009 ; Kim, Umemura, et Leung 2018). Cependant, il n'y a pas de bénéfice en survie globale avec ce traitement. Les propriétés antiangiogéniques du bévécizumab permettent une réduction de l'œdème péri-tumoral et une réduction de la perméabilité vasculaire mais exposent à des complications de type hémorragiques et thromboemboliques. Le bévécizumab est souvent utilisé en association avec une nitrosurée comme la lomustine ou la fotémustine, dans les récurrences de glioblastome, hors AMM (Autorisation de Mise sur le Marché).

Du fait d'un nombre important d'essais cliniques en cours sur les glioblastomes récidivants, l'inclusion dans un protocole d'essai thérapeutique peut toujours être proposée au patient.

C) Nouvelles voies thérapeutiques dans le glioblastome

La technologie TTF (*Tumor Treating Fields*) est une nouvelle voie thérapeutique reposant sur la perturbation de la division des cellules cancéreuses gliales par l'application de champs électriques alternatifs de faible intensité, à la surface du scalp. Le dispositif, nommé NovoTTF se compose d'un casque d'électrodes à porter sur un cuir chevelu glabre, 22 heures par jour. Comparé à l'administration d'une chimiothérapie dans les récurrences de glioblastomes, le NovoTTF apporte un bénéfice similaire à la chimiothérapie, sans bénéfice sur la survie globale (Stupp et al. 2012). Les résultats de cette étude ont mené à l'approbation par la FDA (*Food and Drug Administration*) de ce traitement dans les récurrences de glioblastomes.

En 2017, Stupp et al. publient les résultats d'un essai clinique de phase III comparant l'adjonction du Novo-TTF au témozolomide en phase d'entretien des glioblastomes traités en première ligne, au témozolomide seul. Il y a un bénéfice significatif avec le NovoTTF en adjuvant en phase d'entretien sur la médiane de survie sans progression (6,7 mois) et sur la médiane de survie globale (20,9 mois) en comparaison au protocole Stupp classique (respectivement 4 mois et 16 mois) (Stupp et al. 2017). Les résultats de cette étude ont mené à l'approbation par la FDA du Novo-TTF en adjuvant du protocole Stupp dans la prise en charge de première ligne des glioblastomes. Le NovoTTF a l'avantage de n'entraîner que peu d'évènements indésirables (à savoir des irritations du scalp). Toutefois, son coût élevé freine son utilisation.

Le glioblastome a la particularité d'avoir un microenvironnement très immunosuppresseur inhibant les propriétés anti-tumorales des cellules immunitaires, via la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (interleukine 10) et le TGF- β (*Tumor Growth Factor β*). Les cellules tumorales de glioblastome peuvent aussi exprimer des molécules de surface telles que PD-L1

(*Programmed death-ligand 1*) qui inactivent les lymphocytes T en interagissant avec leurs récepteurs PD-1 (*Programmed cell death 1*) et ainsi entraîner un phénomène d'épuisement lymphocytaire (Heiland et al. 2017). L'immunothérapie apparaît donc comme une voie thérapeutique intéressante dans le glioblastome. Les inhibiteurs de *checkpoint* immunitaires vont bloquer ces sites d'interactions entre la cellule tumorale gliale et la cellule immunitaire afin d'éviter l'anergie de cette dernière. Dans l'étude CheckMate 143, l'utilisation du nivolumab (anticorps anti-PD1) en comparaison au bevacizumab dans les récurrences de glioblastome n'a pas montré un bénéfice significatif en termes de survie globale (Reardon et al. 2017). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet échec. En effet, la biodisponibilité du nivolumab au sein de la tumeur pourrait être peu importante. De plus, les chimiothérapies préalablement administrées au patient participent à la déplétion en cellules immunitaires, et limitent donc l'action de l'immunothérapie. Des études évaluant l'intérêt de l'adjonction du nivolumab au protocole Stupp, en première ligne, sont en cours.

Les vaccins de cellules dendritiques et les CAR-T-cells (*Chimeric Antigen Receptors-T-cells*) sont d'autres modalités d'immunothérapie se basant sur la sensibilisation des cellules immunitaires aux antigènes tumoraux avant ré-administration au patient. L'utilisation de ces thérapies dans le glioblastome semble prometteuse avec plusieurs études de phase III en cours.

L'efficacité des inhibiteurs des tyrosine kinases a été démontrée dans de nombreux cancers (Burotto et al. 2015; Yanada et al. 2006). Dans le glioblastome, on observe fréquemment une dérégulation des voies de signalisation médiées par les récepteurs à activité tyrosine kinase (Carrasco-García, Saceda, et Martínez-Lacaci 2014). Les inhibiteurs de tyrosine kinases présentent une action antiproliférative sur les cellules tumorales de glioblastome dans les études *in vitro* et *in vivo* chez la souris (Y. Han et al. 1997; Mishima et al. 2001). En étude de phase II, on retrouve un bénéfice significatif sur la survie globale dans les glioblastomes traités par adjonction d'erlotinib (inhibiteur du récepteur à l'EGFR) au protocole Stupp classique (Prados et al. 2009). Cependant, aucun bénéfice significatif en survie globale ou en survie sans progression n'a été rapporté lorsque les inhibiteurs de tyrosine kinases étaient administrés seuls dans le glioblastome. Cela s'explique en partie par la présence de la barrière hémato encéphalique, peu perméable à ces inhibiteurs.

D) Soins de supports

Les soins de support correspondent à la prise en charge des symptômes inhérents à la tumeur et de leurs conséquences. Ils comprennent entre autres, le traitement antiépileptique, la prévention des complications thromboemboliques mais aussi la prise en charge de l'hypertension intracrânienne et de la douleur.

La corticothérapie est un traitement anti-œdémateux largement utilisé dans le glioblastome à différentes phases de la maladie. Elle permet de limiter l'HTIC et d'améliorer rapidement les patients sur le plan fonctionnel. Néanmoins, du fait d'un impact possiblement négatif sur la survie globale, le recours à la corticothérapie ne doit pas être systématique (Pitter et al. 2016).

Il n'y a pas de consensus concernant le choix des antiépileptiques. Les traitements non inducteurs enzymatiques tels que le lévétiracétam sont souvent privilégiés afin de limiter tout risque d'interaction avec la chimiothérapie.

La prise en charge nutritionnelle, antalgique et psychologique du patient est primordiale et requiert une équipe pluridisciplinaire.

L'accompagnement du patient doit se faire à chaque étape de la maladie en tenant compte de ses souhaits en matière de niveau de soins. Le recours à une équipe de soins palliatifs est indispensable afin d'aborder et d'encadrer au mieux les questions relatives à la fin de vie, dans cette pathologie au pronostic sombre.

VII) Principes de la glycolyse

Le métabolisme cellulaire se décompose en une voie anabolique correspondant aux voies de biosynthèse cellulaire et en une voie catabolique fournissant l'énergie aux cellules via la dégradation de biomolécules permettant la synthèse d'ATP (Adénosine TriPhosphate).

La glycolyse est l'une des principales voies cataboliques conduisant à la production d'énergie dans les cellules humaines à partir de l'assimilation de molécules de glucose.

Le glucose pénètre dans les cellules via les transporteurs GLUTs (*Glucose Transporter*) et va subir plusieurs transformations enzymatiques catalysées par différentes hexokinases (Figure 4). Cette cascade enzymatique aboutit à la formation de phosphoenolpyruvate (PEP) qui est ensuite transformé en pyruvate par des pyruvate kinases.

Le pyruvate ainsi produit aura essentiellement deux destinées : soit une oxydation à travers la chaîne respiratoire mitochondriale soit une fermentation lactique.

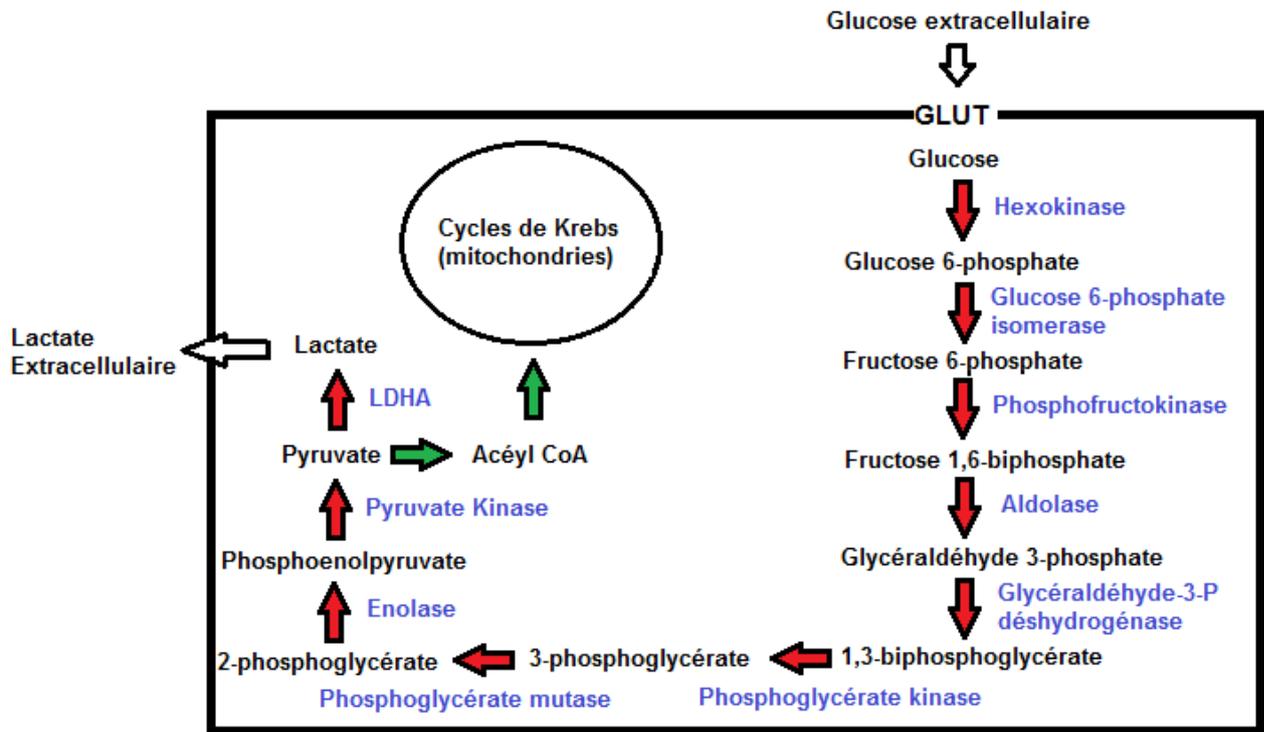


Figure 4 : Schéma représentatif de la glycolyse.

Les enzymes catalysant les différentes réactions sont notées en bleu. La LDHA (lactate déshydrogénase) catalyse l'étape finale de la glycolyse qui aboutit à la production de lactate.

A) La phosphorylation oxydative

Le pyruvate résultant des premières étapes de la glycolyse va être transformé en acétyl-coenzyme A par la pyruvate déshydrogénase. L'acétyl-coenzyme A va entrer dans le cycle de Krebs et être le substrat de multiples oxydations permettant la réduction de coenzymes tels que le NAD⁺ ou le NADP⁺ en NADH ou NADPH. Les électrons stockés par ces coenzymes vont circuler le long des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et générer un gradient de protons permettant par la suite la phosphorylation des molécules d'ADP en ATP.

Un apport d'oxygène constant, est nécessaire à la réalisation des oxydations successives qui généreront comme résidus de réaction, du CO₂ mais aussi des dérivés réactifs de l'oxygène. L'assimilation d'une molécule de glucose aboutit à la formation de 32 molécules d'ATP.

La phosphorylation oxydative du pyruvate permet donc un rendement énergétique important. Cependant, les dérivés réactifs de l'oxygène engendrés limitent l'utilisation intensive de cette voie, du fait de leur toxicité importante.

B) La fermentation lactique (glycolyse anaérobie)

En l'absence d'oxygène, la respiration mitochondriale est peu fonctionnelle. La fermentation lactique du pyruvate apparaît donc comme une voie alternative dans les tissus en hypoxie ou lorsque les besoins énergétiques des cellules dépassent les capacités de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le pyruvate est alors transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDHA).

Par cette voie, une molécule de glucose permet la génération de 2 molécules d'ATP. Le rendement énergétique est donc faible mais il peut être compensé par une absorption de quantités importantes de glucose de manière rapide et cela, sans toxicité pour la cellule. De plus, la génération de ces 2 molécules d'ATP se fait à une vitesse 100 fois supérieure à la voie impliquant la respiration mitochondriale.

C) Régulation de la glycolyse

La régulation de la glycolyse est principalement de type allostérique. Cela signifie que les produits résultant des différentes réactions enzymatiques vont pouvoir inhiber l'activité d'enzymes entrant en jeu dans les réactions initiales, en se fixant sur un site protéique modifiant la conformation de l'enzyme en question. L'activité de ces enzymes initiant la cascade de la glycolyse peut également être modulée par inhibition compétitive au niveau de leur site actif, cela par fixation du produit résultant de la réaction catalysée.

C'est le cas des hexokinases qui sont régulées via ces deux voies par le glucose-6-phosphate (G6P).

La phosphofructokinase est l'enzyme catalysant la transformation du fructose-6-phosphate en fructose 1,6-biphosphate. Cette enzyme est régulée de la même manière que les hexokinases, par les produits finaux de la glycolyse tels que l'ATP, ou par son substrat, le fructose-6-phosphate.

Les pyruvate kinases, responsables de la transformation du phosphoénolpyruvate en pyruvate, sont régulées par de nombreux métabolites. Elles sont fortement activées par le fructose 1,6-biphosphate et l'AMP et sont inhibées par l'ATP et l'acétyl-Coa.

L'expression de l'isoforme PKM2 (Pyruvate Kinase M2) des pyruvate kinases a la particularité d'être régulée positivement par la protéine NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) (Azoitei et al. 2016; D. Han et al. 2015).

La LDHA (Lactate DesHydrogenase A) est l'enzyme catalysant la dernière réaction de la glycolyse, correspondant à la réduction du pyruvate en lactate. L'expression de cette enzyme est notamment favorisée par la protéine HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*) en conditions d'hypoxie (Cui et al. 2017).

D) Effet Warburg

De façon non physiologique, on observe une captation accrue du glucose dans les cellules tumorales. Cela s'accompagne d'une augmentation de la glycolyse qui peut être jusqu'à 200 fois plus importante en comparaison aux cellules non tumorales (Warburg et al. 1927). Cette augmentation de la glycolyse peut se faire en dehors de toute hypoxie et de toute altération de la chaîne respiratoire mitochondriale et correspond à la glycolyse aérobie (Figure 5). Ce phénomène, qui prend le nom d'effet Warburg est classique dans les cancers, protégeant les cellules tumorales du stress oxydatif qui pourrait résulter d'une utilisation excessive de la chaîne respiratoire mitochondriale.

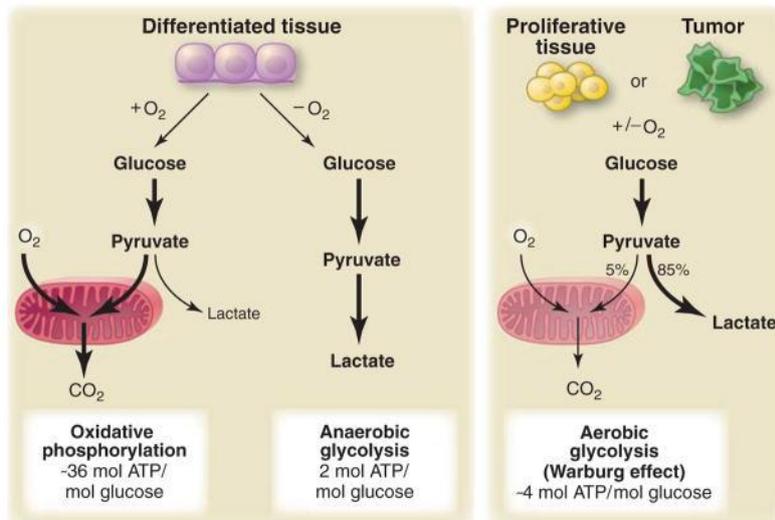


Figure 5 : Représentation schématique des différences entre la phosphorylation oxydative (*oxidative phosphorylation*), la glycolyse anaérobie (*anaerobic glycolysis*) et la glycolyse aérobie (*aerobic glycolysis*, Warburg effect).

Differentiated tissue : tissu différencié ; **Proliferative tissue :** tissu prolifératif, **Tumor :** tumeur

Extrait de « *Understanding the Warburg effect : the metabolic requirements of cell proliferation*, Vander Heiden et al. 2009

E) Conséquences de l'effet Warburg

La glycolyse permet un renouvellement énergétique rapide mais également la synthèse de la biomasse (acides nucléiques, ribose 5-phosphate) nécessaire à la prolifération dérégulée des cellules tumorales. Cette prolifération tumorale rapide va avoir pour conséquence une hypoxie du milieu tumoral et la synthèse d'HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*). HIF1 va réguler positivement l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse (GLUT1, LDHA,..) et entraîner ainsi une boucle de rétrocontrôle positif.

Le lactate, produit terminal de la glycolyse, va participer à l'acidification de l'environnement tumoral. Cette accumulation de lactate stimule l'activité des métalloprotéases, fournissant aux cellules tumorales de plus grandes facilités de motilité à travers la matrice extracellulaire. L'activation de ces

métalloprotéases peut se faire via la baisse du pH du milieu tumoral ou via l'induction de l'expression du TGF- β 2, impliqué dans la migration des cellules tumorales gliales (Baumann et al. 2009).

Le lactate recapté par les cellules tumorales via les récepteurs MCT (*Monocarboxylate Transporter*) va promouvoir la néovascularisation tumorale. En effet, il va induire l'expression du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), et celles d'autres gènes codant pour des ligands de récepteurs à tyrosine kinase (Ruan et Kazlauskas 2013).

Dans l'adénocarcinome du pancréas, il a été démontré qu'une inhibition des récepteurs au lactate (récepteurs MCT) à la surface des cellules cancéreuses issues de lignées humaines, entraîne une inhibition de la migration des cellules tumorales (Kong et al. 2016). Chez la souris, l'inhibition de la glycolyse par un agoniste PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) entraîne une diminution de la migration des cellules tumorales de mélanome (Grabacka et al. 2006).

L'augmentation de la glycolyse des cellules tumorales a également une incidence sur l'activité des cellules immunitaires infiltrant la tumeur.

En effet, les lymphocytes T activés partagent comme similitude avec les cellules tumorales une tendance à privilégier la glycolyse afin de permettre la prolifération et la différenciation en cellules T effectrices spécialisées (MacIver, Michalek, et Rathmell 2013). Cependant la consommation accrue des nutriments circulants et notamment du glucose par les cellules tumorales entraîne une compétition qui joue en défaveur des lymphocytes T. Ces derniers ne disposent alors plus des ressources énergétiques nécessaires à leur fonctionnement.

De nouvelles données plaident en faveur d'une implication du lactate dans la polarisation des macrophages infiltrant les tumeurs. Ces macrophages peuvent être soit de type M1 avec un phénotype activé inflammatoire et antitumoral soit de type M2 avec un phénotype anti-inflammatoire propice aux phénomènes de réparation et de cicatrisation cellulaires. Ces macrophages de type M2 peuvent devenir un véritable support pour les cellules tumorales en induisant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (inhibant la réponse immunitaire) et de facteurs de croissance tels que le VEGF. Le lactate, sécrété par les cellules tumorales et recapté par les macrophages serait à l'origine d'une cascade intracellulaire induisant l'expression de gènes tels que Arg 1 (Arginase 1) impliqués dans la polarisation en macrophages de type M2 (Colegio et al. 2014).

F) Inhibiteurs de la glycolyse

L'inhibition de la glycolyse peut donc apparaître comme une thérapeutique anticancéreuse intéressante. Plusieurs molécules sont connues pour inhiber la glycolyse.

1) Antagonistes du glucose et inhibiteurs des transporteurs GLUTs

Le 2-DG (2-Deoxy-d-Glucose) est un analogue du glucose ne pouvant subir de glycolyse car, contrairement au glucose, il ne possède pas de groupe hydroxyle en position 2 mais un hydrogène. Il entre en compétition avec le glucose au niveau des transporteurs GLUTs puis est phosphorylé par une hexokinase. Le produit résultant de cette phosphorylation, le 2-déoxyglucose-6-phosphate, ne peut être métabolisé en fructose-6-phosphate, par la phosphoglucosomérase, enzyme intervenant dans la seconde étape de la glycolyse.

Par ailleurs, on observe une hausse de l'expression des gènes codant pour les transporteurs GLUTs dans de nombreux cancers – dont les tumeurs cérébrales – en comparaison aux tissus sains. C'est un avantage sélectif pour les cellules tumorales, leur conférant une capacité de captation du glucose plus importante (Krzeslak et al. 2012; Mellanen et al. 1994). C'est ainsi qu'à des fins de recherche, plusieurs anticorps monoclonaux ciblant différents sous-types de récepteurs GLUTs ont été conçus ces dernières années. Il existe également plusieurs inhibiteurs naturels de ces transporteurs GLUTs. Parmi eux, le resvératrol qui est un polyphénol naturellement présent dans les fruits rouges et connu pour ses propriétés antioxydantes. Le resvératrol empêche la captation de glucose de manière compétitive par interaction directe avec GLUT1 (Salas et al. 2013).

2) Inhibiteurs des hexokinases

Les hexokinases sont une famille d'enzymes catalysant la première étape de la glycolyse au cours de laquelle le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate. L'isoforme HK2 (Hexokinase 2) est surexprimée dans de nombreux cancers parmi lesquels le glioblastome (Palmieri et al. 2009; Wolf et al. 2011). Le bromopyruvate est un agent alkylant capable d'inhiber l'hexokinase 2 par interaction directe (Sun et al. 2015). En conséquence, une déplétion importante en ATP se produit, menant à l'apoptose de la cellule tumorale (Cardaci, Desideri, et Ciriolo 2012).

3) Les agonistes des PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)

Les récepteurs PPAR, ou récepteurs activés par la prolifération du peroxyosome, appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires. On dénombre 3 types de PPAR : PPAR α , PPAR γ et PPAR β . PPAR α est impliqué dans la β oxydation des acides gras et a pour ligands naturels les acides gras polyinsaturés et les leucotriènes. PPAR γ est impliqué dans l'adipogénèse et le contrôle de l'insulinorésistance. Ses ligands naturels sont les acides gras polyinsaturés et les prostaglandines. Le rôle de PPAR β est moins connu. PPAR α et PPAR γ participent à la régulation de la réponse inflammatoire en inhibant la voie NF- κ B qui est un activateur de la glycolyse via PKM2. Les agonistes de PPAR α et PPAR γ participent donc à l'inhibition de la glycolyse via la voie NF- κ B (Delerive et al. 1999).

Parmi les agonistes de PPAR α , on peut citer le fénofibrate habituellement utilisé comme traitement contre les dyslipidémies. Dans de nombreux modèles de lignées cellulaires cancéreuses, l'action antitumorale du fénofibrate est mise en évidence (Jan et al. 2016; Sabaa et al. 2017).

Parmi les agonistes de PPAR γ on retrouve le DHA (acide docosahexaénoïque) qui va inhiber la glycolyse par la même voie (Grygiel-Górniak 2014).

4) Inhibiteurs de la LDHA

La surexpression de la LDHA a une implication majeure dans la glycolyse en aérobiose. Cette expression peut être inhibée par des ARN interférents synthétiques qui vont favoriser la dégradation des ARN messagers issus de la transcription du gène codant pour la LDHA. D'autres molécules de synthèse, parmi lesquels on retrouve l'acide oxamique, peuvent également inhiber la LDHA en lui imposant un changement de conformation dissimulant son site actif (Miskimins et al. 2014).

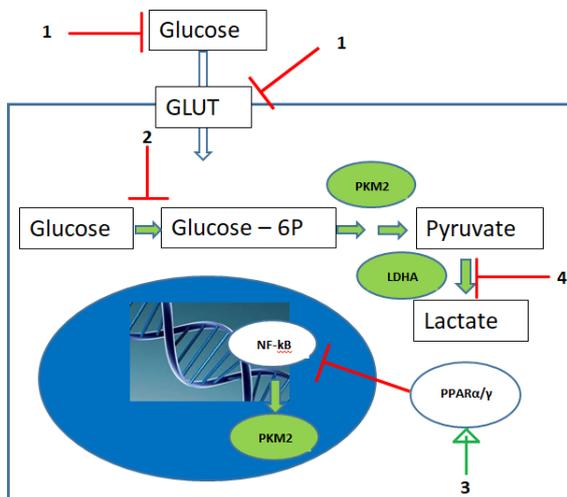


Figure 6 : Différents sites d'inhibition de la glycolyse.

1) Antagonistes du glucose ou inhibiteurs des transporteurs GLUTs. 2) Inhibiteurs des hexokinases. 3) Agonistes PPAR α/γ . 4) Inhibiteurs de la LDHA

VIII) La glycolyse dans le glioblastome

A) Couplage métabolique lactate-glucose entre astrocytes et neurones dans le cerveau sain

Le cerveau est un organe hautement dépendant des apports en glucose et représente plus de 20 % de la consommation en glucose de l'organisme (Erbsloh, Klarner, et Bernsmeier 1958). Étant donné le caractère limité des capacités de stockage du glucose dans le parenchyme cérébral, un apport constant est nécessaire. Cependant le métabolisme du glucose diffère énormément selon le type cellulaire en question. En effet les astrocytes privilégient la voie de la glycolyse tandis que le métabolisme énergétique des neurones repose plutôt sur la phosphorylation oxydative. Les astrocytes expriment le récepteur

GLUT1 qui va leur permettre de capter le glucose provenant des capillaires et le faire pénétrer dans le système nerveux. Ce glucose peut être soit stocké sous forme de glycogène et être réutilisé en période de jeûne, soit acheminé dans la voie de la glycolyse avec comme métabolite terminal le lactate. Le lactate ainsi produit va être sécrété dans le milieu extracellulaire pour être recapté par les neurones via les récepteurs MCT (*MonoCarboxylate Transporter*). Parvenu dans le cytoplasme neuronal, le lactate va être converti en pyruvate via la LDHB (Lactate déshydrogénase B) et ainsi rentrer dans la chaîne respiratoire mitochondriale.

Le lactate extracellulaire peut être détecté par des récepteurs couplés aux protéines G situés à la surface des astrocytes et entraîner la sécrétion d'AMPc (AMP cyclique). Les taux d'AMPc intracellulaires sont donc un bon reflet de l'activité de glycolyse des cellules astrocytaires (Vardjan et al. 2018).

B) Glycolyse, glioblastome et migration cellulaire

Contrairement à l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses, la glycolyse est un phénomène finement régulé dans les astrocytes qui s'adapte aux besoins énergétiques locaux et ponctuels (Dienel et Cruz 2016).

Plusieurs études ont démontré que l'effet Warburg survenait également dans le glioblastome avec une glycolyse dépassant largement la glycolyse physiologique (Agnihotri et Zadeh 2016; Brennan et al. 2013; Oudard et al. 1996). Cette dérégulation métabolique s'accompagne de l'expression accrue de gènes de la glycolyse tels que PKM2 et LDHA (J. Mukherjee et al. 2013; Di et al. 2018).

Sur la figure 8, l'analyse des données du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) met en évidence une surexpression de certains gènes de la glycolyse dans les gliomes de haut grade. Cela sous-tend un caractère plus agressif des tumeurs gliales ayant un métabolisme reposant principalement sur la glycolyse. Cependant, le métabolisme des cellules tumorales dans le glioblastome reste hétérogène, à l'image du polymorphisme des cellules composant la lésion.

Dans de nombreux cancers, les cellules souches tumorales sont décrites comme étant plus glycolytiques que les cellules tumorales résultant de leur différenciation (Ciavardelli et al. 2014; Emmink et al. 2013; Liao et al. 2014). Dans le glioblastome, l'existence de cellules souches gliales, au métabolisme particulier, va être à l'origine de récives via la création de nouvelles niches de prolifération (Thomas et Yu 2017; Jackson, Hassiotou, et Nowak 2015). Ces niches se trouvent parfois à distance du site lésionnel initial du fait de la capacité de migration de ces cellules, sous-tendue par l'expression de gènes de la migration cellulaire que sont ZEB1 (*Zinc finger E-box-binding homeobox 1*), ZEB2 (*Zinc finger E-box-binding homeobox 2*), SNAIL et TWIST (Qi et al. 2012; Mahabir et al. 2014).

Par ailleurs, les cellules souches gliales tumorales affichent une sensibilité aux inhibiteurs de glycolyse qui semblent prometteurs en prévention des récives de glioblastome (Zhao et al. 2013).

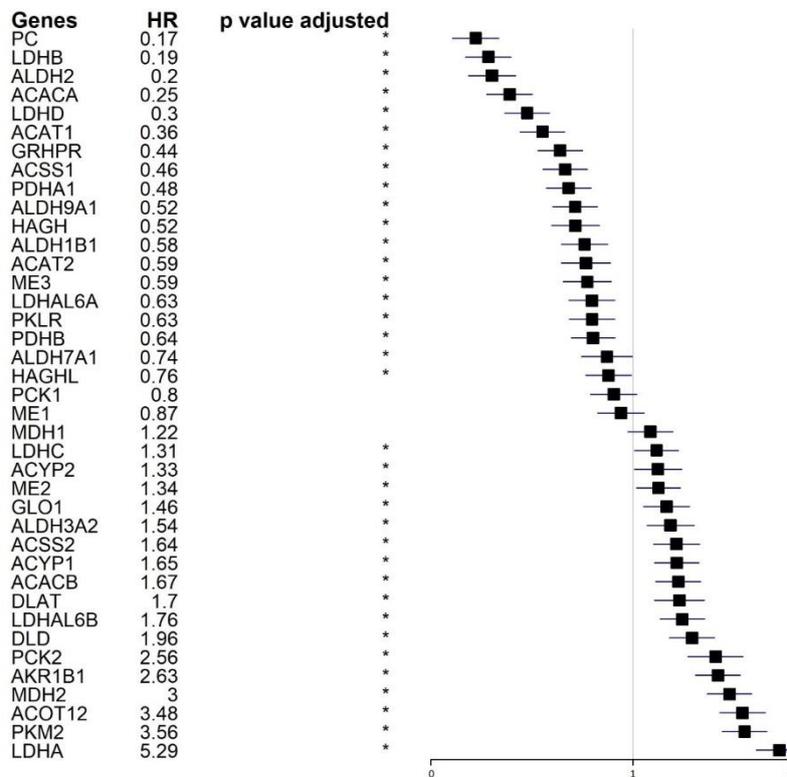


Figure 7 : Comparaison de l'expression des différents gènes impliqués dans la glycolyse dans les gliomes de haut grade.

Résultats obtenus après interrogation des données de l'atlas génomique des cancers (TCGA) par le service de biostatistiques de la PTBC (Plateforme de Transfert en Biologie Cancérologique) du CGFL (Centre Georges François Leclerc). * $p < 0,05$.

Partie III : Hypothèse de travail

Hypothèse de travail

Nous avons émis l'hypothèse que, dans le glioblastome, la capacité de glycolyse des cellules tumorales gliales pourrait être corrélée à leur capacité de migration et qu'une inhibition de cette glycolyse pourrait empêcher la migration des cellules tumorales.

Partie IV : Matériels et Méthodes

I) Lignées cellulaires

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons utilisé comme modèle expérimental 6 lignées cellulaires humaines de glioblastomes. Des lignées cellulaires humaines de glioblastomes LN229, LN18 et U118-MG étaient cultivées, ainsi que préconisé par l'ATCC (*American Type Culture Collection*), en conditions stériles dans du *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Dominique Dutscher). Des lignées cellulaires humaines de glioblastomes U373-MG, U87-MG et T98G étaient cultivées, ainsi que préconisé par l'ATCC, en conditions stériles dans du *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM, Sigma-Aldrich).

Toutes les lignées cellulaires étaient incubées dans une étuve à 37 °C paramétrée à 5 % de CO₂.

Toutes ces lignées cellulaires étant adhérentes, elles étaient récupérées après clivage des protéines membranaires d'adhésion avec de la trypsine, pendant 5 minutes. Les cellules récupérées étaient ensuite comptées sur des cellules de Kova, avant d'êtreensemencées pour les différentes expérimentations.

II) Mesure de la glycolyse par l'automate Seahorse

La glycolyse basale était évaluée avec l'automate Seahorse XF96 qui mesure l'acidité du milieu de culture cellulaire de chaque lignée de glioblastome. Les cellules étaientensemencées dans une plaque à 96 puits, à raison de 30 000 cellules par puits et 8 puits par lignée, dans leur milieu de culture habituel (180 µL). Après ensemencement, la plaque était maintenue à l'étuve à 37 °C durant la nuit afin de permettre la bonne adhérence des cellules. Le lendemain, le milieu de culture des cellules était remplacé à deux reprises par un milieu de culture DMEM sans rouge de phénol (Agilent) avec 10 mM de glucose, 1 mM de sodium pyruvate, 2 mM de glutamine, 5 mM d'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique). Le pH du milieu était équilibré à 7,4 avec une solution d'hydroxyde de sodium. Le premier changement de milieu de culture des cellules était réalisé 45 minutes avant l'introduction de la plaque de culture cellulaire dans l'automate Seahorse et le deuxième changement de milieu intervenait à quelques minutes de cette introduction. L'acidité du milieu extracellulaire et la respiration mitochondriale étaient mesurées par l'automate Seahorse, avant et après l'injection de 20µL de roténone et d'antimycine A puis, de 22 µL de 2-D-Glucose (2-DG). L'injection de la roténone et de l'antimycine A permettait de bloquer respectivement les complexes 1 et 3 de la chaîne respiratoire mitochondriale afin de déduire l'acidité résultant de la respiration mitochondriale. L'injection de 2-D-Glucose permettait de bloquer la glycolyse afin de s'assurer que l'acidité du milieu cellulaire, mesurée en temps réel, résultait bien de la glycolyse seule.

III) Dosage de l'AMP (Adénosine mono Phosphate) cyclique

La détection du lactate par les récepteurs couplés aux protéines G à la surface des cellules astrocytaires entraîne la sécrétion d'AMP cyclique (AMPc) intracellulaire. Les taux d'AMPc intracellulaires sont donc un bon reflet de l'activité de glycolyse des cellules astrocytaires (Vardjan et al. 2018).

La concentration d'AMPc intracellulaire et dans le surnageant était mesurée à l'aide d'un kit ELISA (Cayman). Les différentes lignées cellulaires étaient cultivées dans des plaques de 6 puits, dans leur milieu de culture habituel à raison de 500 000 cellules par puits. Après 24h de culture, le surnageant cellulaire ainsi que les cellules étaient récupérés séparément afin de doser l'AMPc extra et intracellulaire. Les échantillons recueillis étaient immédiatement conservés à -80 °C pour éviter la dégradation de l'AMPc avant son dosage. Le test ELISA était ensuite réalisé en suivant le protocole proposé par Cayman (Cyclic AMP Select Elisa Kit) avec un triplicat de puits pour chaque lignée. Les calculs des taux d'AMPc étaient obtenus à l'aide du logiciel fourni par Cayman.

IV) Dosage du lactate extracellulaire

L'étape terminale de la glycolyse aboutit à la synthèse de lactate par le biais de l'hydrogénation du pyruvate par la LDHA. Nous avons donc mesuré les taux de lactate dans le milieu extracellulaire de nos lignées de glioblastomes en culture. La concentration en lactate dans le milieu extracellulaire a été déterminée par dosage colorimétrique.

Les différentes lignées cellulaires étaient cultivées dans des plaques de 6 puits, dans leur milieu de culture habituel à raison de 1 000 000 de cellules par puits. Après 24h de culture, le surnageant cellulaire était récupéré afin de doser le lactate extra cellulaire. Les échantillons recueillis étaient immédiatement conservés à -80°C pour éviter la dégradation du lactate avant son dosage. Le dosage colorimétrique était ensuite réalisé en suivant le protocole proposé par Cayman (L-Lactate Assay Kit) avec un triplicat de puits pour chaque lignée. La fluorescence de chaque puits était lue par un lecteur de plaques à fluorescence en utilisant une longueur d'onde d'excitation à 530-540nm et une longueur d'onde d'émission à 585-595 nm. Les valeurs des concentrations en lactate dans le milieu extracellulaire des cellules étaient obtenues en rapportant la valeur de la fluorescence mesurée dans les puits, dans le logiciel fourni par Cayman.

V) RT-qPCR (*Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction*)

Afin d'évaluer l'expression des principaux gènes de la glycolyse (PKM2 et LDHA) et des gènes impliqués dans la migration cellulaire (ZEB1, ZEB2, TWIST et SNAIL), dans nos lignées cellulaires, nous avons utilisé la RT-PCR. Cette technique est basée sur la transcription inverse des ARN messagers puis de leur amplification par PCR afin de déterminer l'expression relative du gène d'intérêt.

Matériels et Méthodes

Pour l'extraction des ARN messagers totaux, 500 000 cellules étaient utilisées par lignée. Après comptage, les cellules étaient centrifugées puis lavées avec du tampon de phosphate salin (PBS, Sigma-Aldrich) puis culottées. Les ARN étaient extraits des culots après resuspension dans 500 μL de Trizol (Ambion), puis ajout de 100 μL de chloroforme. Après centrifugation, la phase supérieure était récupérée et mélangée à 200 μL d'isopropanol. Après précipitation, une nouvelle centrifugation était réalisée avant deux lavages successifs à l'éthanol (70 %).

Les culots d'ARN étaient réhydratés avec 20 μL d'eau ultra-pure stérile puis la quantité d'ARN était déterminée par dosage au Nanodrop (ThermoFisher).

Une reverse transcription (RT) était ensuite réalisée afin de transformer les ARN en ADN complémentaire. Un volume de mélange 1 était préparé puis déposé dans chaque puits d'une plaque PCR (Thermo Fisher). Ce mélange était composé de *random primers* (Invitrogen) correspondant à des amorces aléatoires et de dNTPs (Invitrogen) correspondant à un mélange des 4 désoxyribonucléotides : dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Promega). 100 à 300 ng d'ARN étaient déposés dans chaque puits. La plaque était ensuite scellée et placée dans un thermocycleur 5 minutes à 65 °C, puis 5 minutes sur la glace. Le mélange 2, composé du First-Stand Buffer, de dTT, de M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) et de RNase OUT (Vitrogen) était ensuite déposé dans chaque puits. La plaque était à nouveau scellée et placée sur le thermocycleur pour un cycle de 10 minutes à 25 °C, 50 minutes à 37 °C, 15 minutes à 70 °C et enfin à 4°C. Au terme de la RT, les échantillons étaient dilués dans 180 μL d'eau stérile ultra-pure.

L'ADN complémentaire obtenu après l'étape de transcription inverse était déposé dans une plaque de 96 puits à raison 3,5 μL d'ADN par puits, à raison de 4 réplicats par gène.

L'étape de PCR était réalisée à l'aide du Quant Studio 5 (Applied biosystems), après rajout de 7 μL de SYBR Green RT-PCR Kit (Applied biosystems) et de 0,53 μL de *primers* sens et anti-sens (dilués au dixième) dans chaque puits.

Le taux d'expression de chaque gène était obtenu avec le ΔCT (Δ *cycle threshold*) correspondant au nombre de cycles d'amplification à partir duquel la fluorescence du puits atteint le seuil de détection par le Quant Studio 5. Un ΔCT bas correspond donc à une détection précoce de la fluorescence du puits de PCR et donc à une quantité d'ARN messager (du gène d'intérêt) initial élevée.

Les résultats obtenus étaient normalisés avec des gènes de ménage comme l'actine ou la cyclophiline A (CYCLOA). Les résultats étaient similaires avec les deux normalisations. Seules les données normalisées avec l'actine sont montrées.

Dans le tableau 7 sont listés les différents *primers* utilisés afin de mesurer l'expression des gènes de la glycolyse et des gènes impliqués dans la migration des cellules tumorales gliales (Qi et al., 2012 ; Mahabir et al., 2014).

<u>Primers des gènes impliqués dans la glycolyse</u>	
hPKM2 Fw	CCTCAGCAGCCATGTCGAA
hPKM2 Rev	GCTGGGCCAATGGTACAGAT
hLDHA Fw	ACGTGCATTCCCGATTCTT
hLDHA Rev	GCAAGTTCATCTGCCAAGTCC
<u>Primers des gènes impliqués dans la migration cellulaire</u>	
hZEB1 Fw	TGTGGTAGAAACAAATTCAGATTCA
hZEB1 Rev	GCCCTTCCTTCTGTGTCA
hZEB2 Fw	GAATAACGGTCCTGCCTCCC
hZEB2 Rev	GCTCGATCTGCGAAGTCTTG
hSNAIL1 Fw	CGAGTGGTTCTTCTGCGCTA
hSNAIL1 Rev	CTGCTGGAAGGTAACTCTGGA
hTWIST1 Fw	GCCGGAGACCTAGATGTCATT
hTWIST1 Rev	TTTTAAAAGTGCGCCCCACG
<u>Primers des gènes de ménage</u>	
hCYCLOA Fw	GCATACGGGTCTGGCATCTTGTC
hCYCLOA Rev	ATGGTGATCTTCTGCTGGTCTTGC
hActine Fw	GTTGTGACGACGAGCG
hActine Rev	GCACAGAGCCTCGCTT

Tableau 7 : Liste des *primers* sens (Fw) et anti-sens (Rev) utilisés pour la mesure de l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse et des gènes impliqués dans la migration des cellules tumorales gliales.

VI) Test de migration cellulaire

Afin de déterminer la capacité de migration cellulaire de nos lignées, nous avons réalisé un test de migration cellulaire. Ce test était réalisé avec ou sans l'ajout d'inhibiteurs de la glycolyse tels que du fénofibrate ou de l'acide oxamique, dans le milieu de culture des cellules.

Les cellules des différentes lignées (LN229 et U118-MG) étaientensemencées dans des plaques 6 puits avec 500 000 cellules par puits, dans leur milieu de culture habituel (DMEM + 10 % SVF). La plaque était mise à incuber durant la nuit le temps que les cellules puissent adhérer.

Le lendemain, après vérification de la bonne confluence du tapis cellulaire (environ 80 %), un « scratch » était réalisé sur le tapis cellulaire à l'aide d'un cône de pipette p200. Le milieu de culture était ensuite délicatement retiré et le tapis cellulaire était lavé deux fois avec du PBS ceci afin d'éviter la réadhésion de cellules décrochées sur la zone du scratch. Puis, les cellules étaient mises au contact d'un nouveau milieu, avec ou sans traitement inhibiteur de la glycolyse (fénofibrate, acide oxamique).

Des photos des marges du « scratch » étaient réalisées à H0, H6 et H24 afin d'évaluer la migration cellulaire. La migration cellulaire était évaluée en rapportant la distance mesurée entre les deux fronts de confluence dans chaque puits à la distance initiale entre les marges du « scratch » (Figure 10). Afin que les photographies correspondent toujours à la même zone, un repérage au feutre était réalisé sur le couvercle.

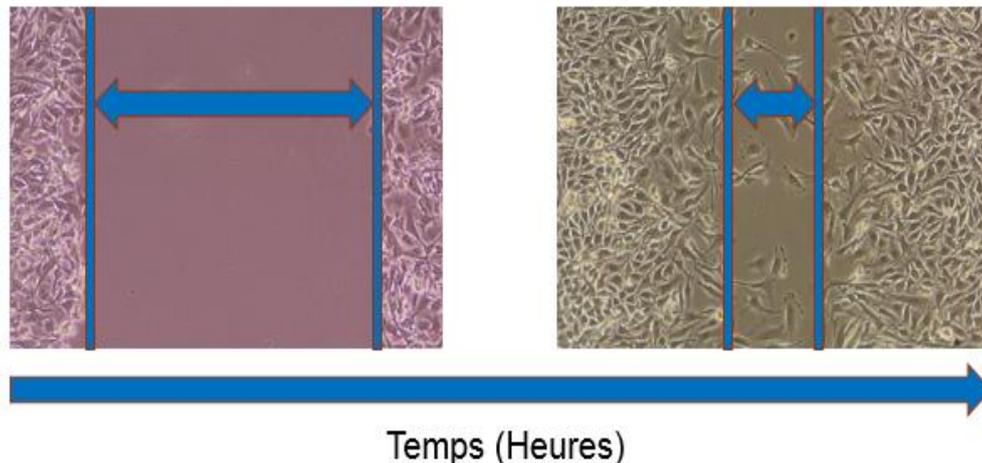


Figure 8 : Test de migration cellulaire.

Photos prises à H0 et à H24. Les bandes bleues délimitent les fronts de confluence du tapis cellulaire. La mesure de la distance séparant les fronts de confluence en fonction du temps, rapportée à la distance initiale à H0, permet de déterminer le taux de migration cellulaire.

VII) Estimation de la prolifération et de la viabilité cellulaire au *crystal violet*

Le *crystal violet* est un colorant composé de groupements méthyles capables de se fixer aux protéines des cellules. Il permet d'estimer la quantité de cellules viables dans un échantillon. En effet, les cellules mortes, devenues non adhérentes vont être éliminées lors du rinçage tandis que le *crystal violet* va rester fixé aux noyaux des cellules viables, adhérentes.

L'estimation de la prolifération cellulaire de nos lignées humaines de glioblastome a été réalisée, en fonction du temps, afin de prendre en compte la part de migration cellulaire secondaire à la prolifération cellulaire.

Sur une plaque de 96 puits, 10 000 cellules étaientensemencées par puits avec, 10 puits par lignée cellulaire. À 24h, 48h et 88h les puits étaient rincés avec du PBS puis les cellules fixées avec de l'éthanol absolu (50 μ L par puits). Après 30 minutes à température ambiante, l'éthanol absolu était retiré et remplacé par 50 μ L de solution de *crystal violet* par puits. Après 5 minutes au contact du *crystal violet*, le tapis cellulaire était délicatement rincé avec de l'eau et mis à sécher sur la nuit.

Le lendemain, 100 μ L d'éthanol absolu et 100 μ L de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) étaient ajoutés dans chaque puits. Les puits étaient ensuite homogénéisés à l'aide d'un agitateur pendant plusieurs minutes

puis l'absorbance était lue à 575 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Tecan). L'augmentation de l'absorbance en fonction du temps de culture cellulaire permettait d'estimer la prolifération cellulaire en fonction du temps.

La viabilité cellulaire a été évaluée avec des concentrations croissantes d'inhibiteurs de la glycolyse afin de déterminer le seuil de toxicité de ces traitements pour les cellules tumorales.

Les cellules des différentes lignées (LN229 et U118-MG) étaientensemencées dans des plaques 6 puits avec 500 000 cellules par puits, dans leur milieu de culture habituel (DMEM + 10% SVF). La plaque était mise à incuber durant la nuit le temps que les cellules puissent adhérer.

Le lendemain, les puits étaient rincés et mis au contact d'un nouveau milieu (3 mL), contenant ou non un traitement inhibiteur de la glycolyse, à différentes concentrations.

À 24 heures, les puits étaient rincés avec du PBS puis les cellules fixées avec de l'éthanol absolu (1 mL par puits). Après 30 minutes à température ambiante, l'éthanol absolu était retiré et remplacé par 1mL de solution de *crystal violet* par puits. Après 5 minutes au contact du *crystal violet*, le tapis cellulaire était délicatement rincé avec de l'eau et mis à sécher sur la nuit.

Le lendemain, les puits étaient repris dans 2 mL d'éthanol absolu et 2 mL de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*).

Les puits étaient ensuite homogénéisés sur un agitateur pendant plusieurs minutes puis l'absorbance était lue à 575 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Tecan).

La comparaison de l'absorbance entre les puits de cellules traitées par inhibiteurs de la glycolyse et celle des puits contrôles après 24 heures d'exposition, permettait de déterminer le seuil de toxicité des traitements.

VIII) Analyse statistique

L'analyse statistique des différents résultats a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism. Une analyse de variance ANOVA était utilisée pour comparer les différentes lignées humaines de glioblastomes entre elles, pour les valeurs moyennes des différentes variables mesurées. Pour la comparaison entre LN229 et U118-MG sur différentes variables, un test de Student non paramétrique était utilisé.

Les différentes valeurs sont représentées avec la déviation standard. Les résultats étaient considérés comme significatifs lorsque la *p-value* était inférieure à 0,05.

Partie V : Résultats

I) Hétérogénéité de la capacité de glycolyse des lignées humaines de glioblastome

A) Mesure du taux d'acidité extracellulaire avec l'automate Seahorse

Dans un premier temps, nous avons évalué la glycolyse basale dans nos lignées humaines de glioblastomes LN18, LN229, T98G, U118-MG, U373-MG et U87-MG en mesurant l'acidification du milieu extracellulaire (ECAR), avec l'automate Seahorse (Figure 11 et 12).

On peut noter que les lignées U118-MG, T98G et U373-MG étaient celles ayant le métabolisme glycolytique le plus important tandis que les lignées LN229, U87 et LN18 avaient un métabolisme glycolytique moins important.

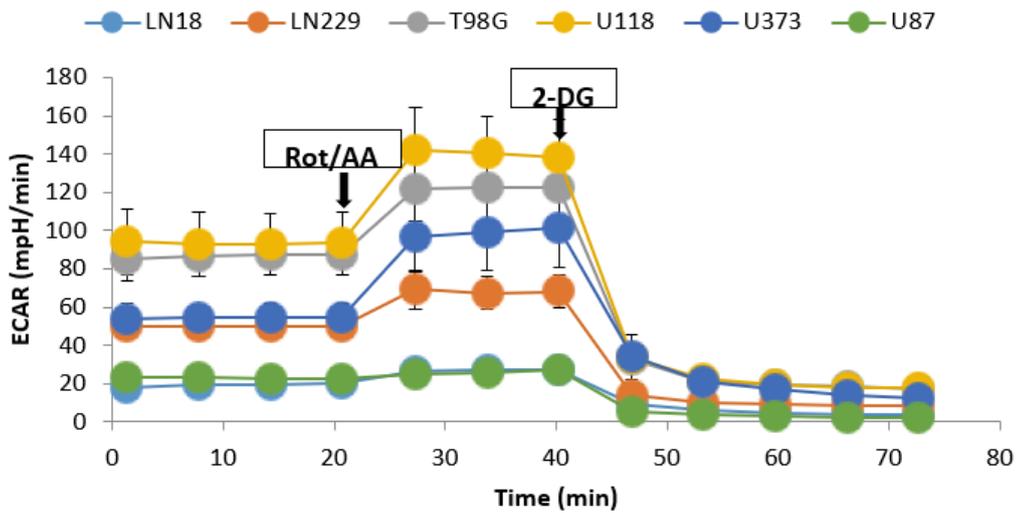


Figure 9 : Profil glycolytique représentatif des différentes lignées de glioblastomes avec mesure de l'ECAR avant et après injection de Roténone + Antimycine A puis de 2-DG.

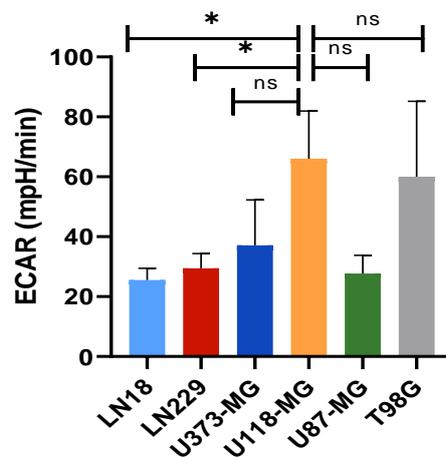


Figure 10 : Taux d'ECAR moyens des différentes lignées de glioblastomes sur 6 expériences.

* $p < 0.05$, ns = non significatif. Ces valeurs sont représentatives de la glycolyse basale de chaque lignée.

B) Mesure du taux d'AMPc intracellulaire

Étant donné que la glycolyse des cellules astrocytaires conduit à la synthèse d'AMPc intracellulaire, cette dernière est donc un moyen indirect d'évaluer la glycolyse (Vardjan et al. 2018). Nous avons dosé la production d'AMPc intracellulaire dans chacune de nos lignées humaines de glioblastomes par ELISA.

Sur la figure 13, U118-MG est la lignée produisant le plus d'AMPc intracellulaire et les lignées U87-MG, LN229 et U373-MG, celles qui en produisent le moins.

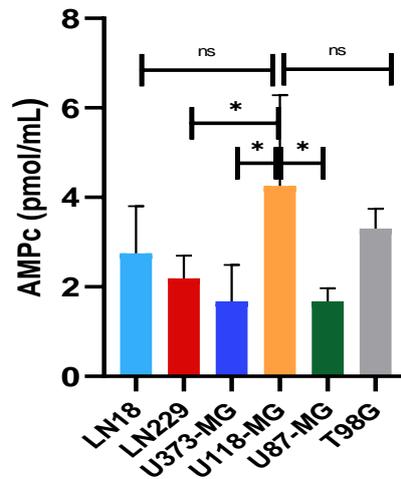


Figure 11: Concentrations intracellulaires moyennes d'AMPc dans chaque lignée. Schéma représentatif de 5 expériences ELISA. * $p < 0,05$. ns = non significatif.

II) Choix des modèles LN229 et U118-MG

L'association des résultats obtenus pour la mesure de la glycolyse par le Seahorse avec ceux obtenus par la mesure de la production intracellulaire d'AMPc par ELISA, nous permet d'isoler deux lignées cellulaires : U118-MG et LN229. Ces deux lignées humaines de glioblastomes présentent un métabolisme du glucose différent. En effet, U118-MG a une capacité de glycolyse et une production d'AMPc significativement plus importante que LN229. Ces résultats sont confirmés par une surexpression des principaux gènes impliqués dans la glycolyse chez U118-MG (Figure 14), mais également par des taux de lactate extracellulaire significativement plus importants chez U118-MG en comparaison à la lignée LN229 (Figure 15).

Résultats

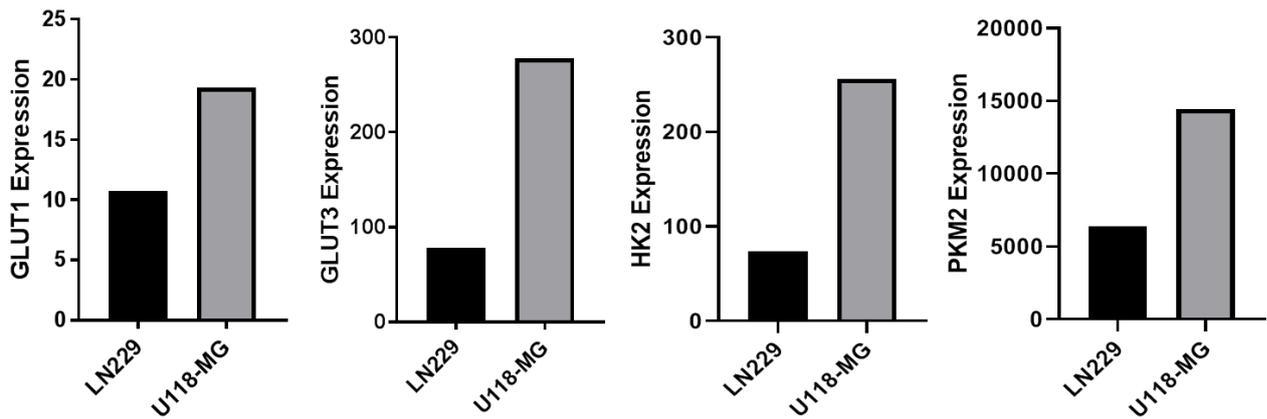


Figure 12 : Comparaison de l'expression des principaux gènes impliqués dans la glycolyse chez LN229 et U118-MG : GLUT1 (*GLU*cose *T*ransporter 1), GLUT3 (*GLU*cose *T*ransporter 3), HK2 (HexoKinase 2), PKM2 (Pyruvate Kinase M2). Données issues de la Cancer Cell Line Encyclopedia regroupant l'étude génomique des lignées cellulaires humaines cancéreuses. L'expression des gènes d'intérêt est déterminée avec la technique des puces à ADN (*Affymetrics 133, microarrays*) avec normalisation RMA (*Robust Multichip Average*).

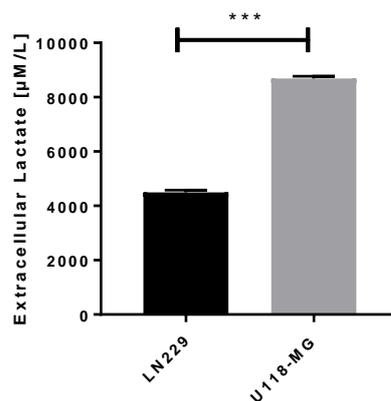


Figure 13 : Concentrations extracellulaires moyennes en lactate dans les lignées LN229 et U118-MG. Moyennes de 3 expériences. *** $p < 0,001$

Nous avons choisi comme modèles ces deux lignées car elles sont cultivées dans le même milieu, riche en glucose (DMEM), et ont une vitesse de prolifération similaire (Figure 16). Les biais pouvant résulter de leur comparaison sont donc limités.

Résultats

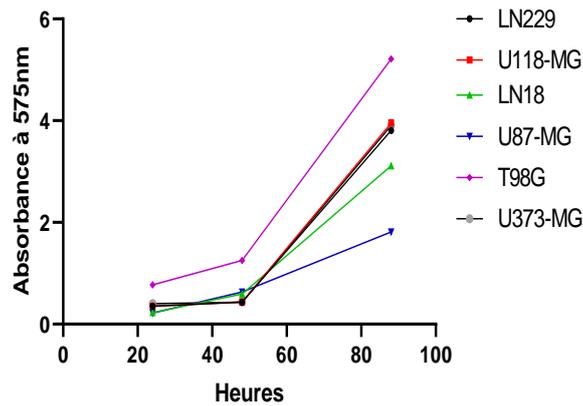


Figure 14 : Mesure de la prolifération cellulaire des différentes lignées de glioblastomes par un test de coloration au *crystal violet*.

L'absorbance en fonction du temps détermine la vitesse de prolifération. La figure est représentative de 3 expériences.

III) La lignée U118-MG à haute capacité de glycolyse migre plus que la lignée LN229 à faible capacité de glycolyse

A) Test comparatif de la migration cellulaire

Afin de mettre en évidence une potentielle corrélation entre le taux de glycolyse et la capacité de migration au sein de nos deux lignées humaines de glioblastomes (LN229 et U118-MG), nous avons réalisé un test de migration cellulaire comparatif entre ces deux lignées. On peut noter qu'après 6 heures (H6) et 24 heures (H24), la capacité de migration des cellules de la lignée U118-MG est significativement supérieure à celle des cellules de la lignée LN229 (Figure 17).

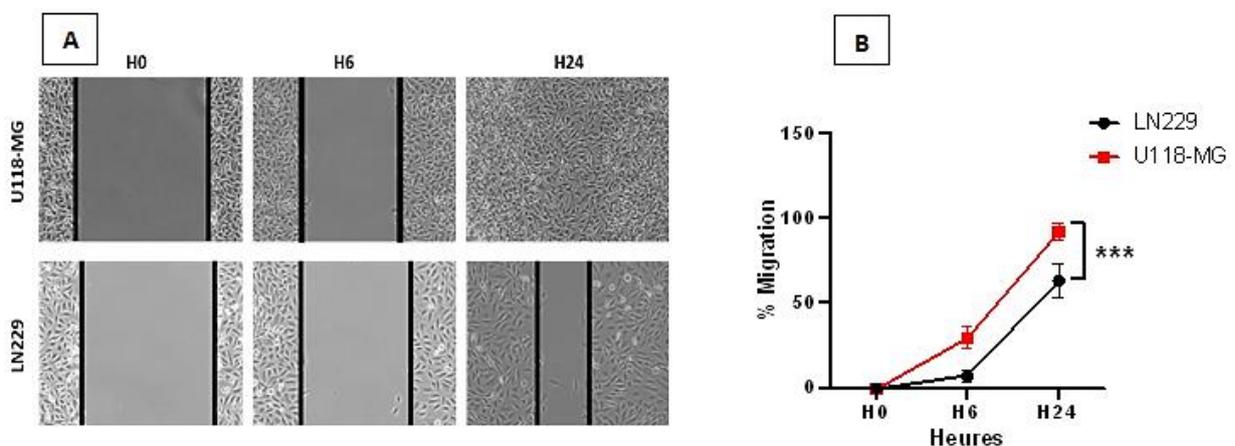


Figure 15 : Test de migration cellulaire réalisé sur les lignées LN229 et U118-MG. A) Images représentatives de 6 expériences. Les traits représentent les marges du « scratch ». La capacité de migration des cellules était évaluée à H0, H6 et H24 en mesurant la distance séparant les deux fronts de confluences dans chaque puits.

B) Pourcentage de migration cellulaire par lignée, en fonction du temps. Moyenne de 6 expériences. ***p < 0,001

B) Évaluation de l'expression des gènes impliqués dans la migration cellulaire dans les lignées LN229 et U118-MG par RT-qPCR

Après avoir mis en évidence des capacités de migration différentes entre nos lignées U118-MG et LN229, nous avons cherché à déterminer si cette différence était sous-tendue par une expression différente des gènes impliqués dans la migration cellulaire.

On observe sur la figure 18, que les gènes ZEB1, ZEB2, TWIST et SNAIL étaient exprimés de manière significativement plus importante dans la lignée U118-MG en comparaison avec la lignée LN229.

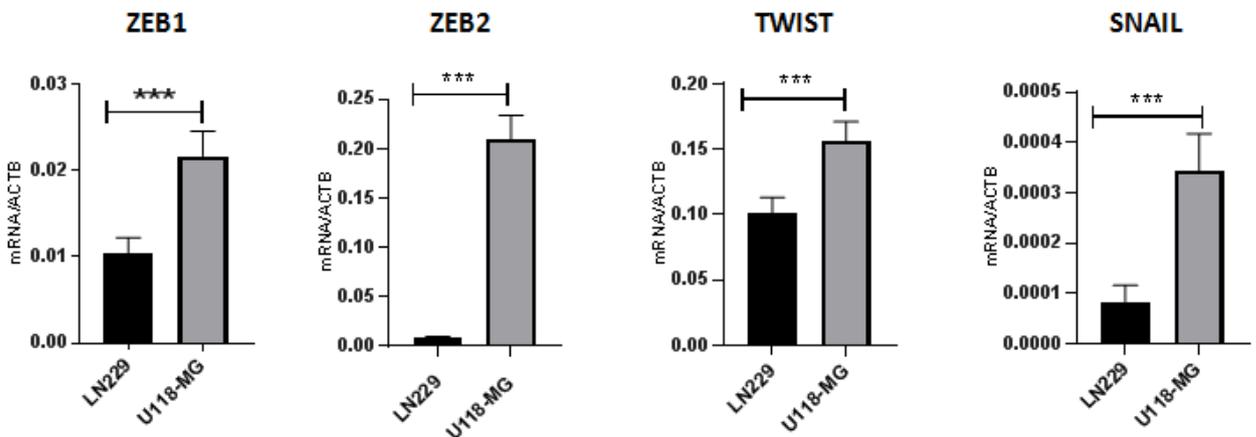


Figure 16 : Expression des différents gènes codant pour des protéines impliquées dans la migration cellulaire dans les lignées LN229 et U118-MG, mesurée par RT-qPCR.

La quantité d'ARN messagers (mRNA) est rapportée à la quantité d'actine (ACTB) dans chaque échantillon. Moyenne de 3 expériences pour chaque gène. *** $p < 0,001$.

III) L'inhibition de la glycolyse par le fénofibrate ou l'acide oxamique freine la migration des cellules de la lignée U118-MG

A) Inhibition de la glycolyse avec un traitement par fénofibrate

Le fénofibrate est connu pour ralentir la glycolyse, notamment en inhibant l'expression de l'une de ses enzymes clé, PKM2 (D. Han et al. 2015). Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact d'un traitement par fénofibrate sur la glycolyse basale de la lignée U118-MG. L'ECAR dans les cellules U118-MG (représentatif de la glycolyse) était nettement diminué dans le groupe traité par 25 μ M de fénofibrate en comparaison au groupe contrôle (Figure 19). Ces résultats confirment donc bien la capacité d'inhibition de la glycolyse par le fénofibrate.

Résultats

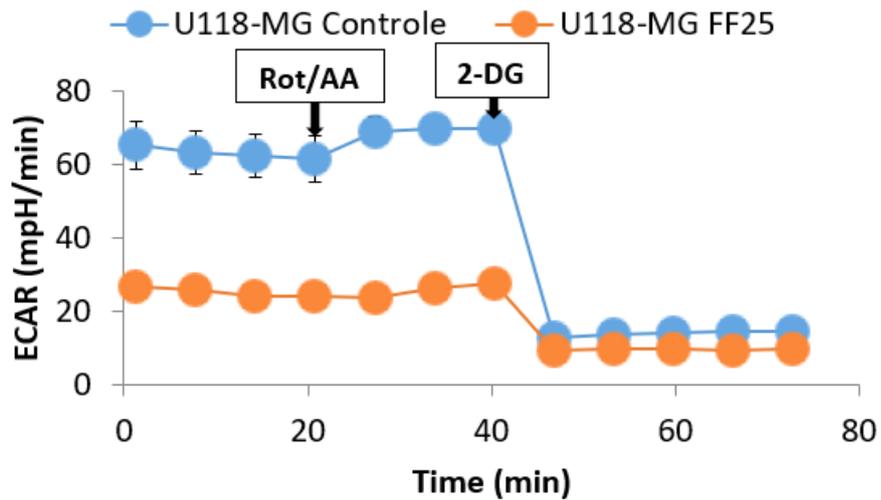


Figure 17 : Evaluation de la glycolyse dans les cellules U118-MG avec l'automate Seahorse, en condition non traitée (contrôle) ou traitée par fénofibrate à la concentration de 25 μM (FF25).

Expérience représentative de 8 réplicats.

On notait, en regard de l'inhibition de la glycolyse, une diminution significative de l'expression des gènes PKM2 et LDHA qui était corrélée à la dose de fénofibrate appliquée à la lignée U118-MG (Figure 20).

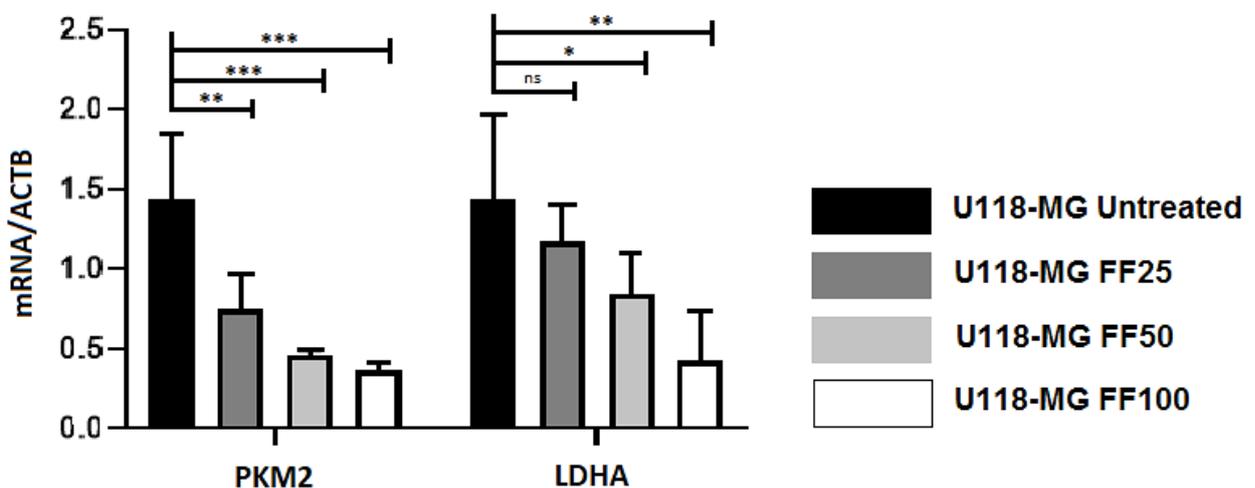


Figure 18 : Étude de l'expression des principaux gènes de la glycolyse (PKM2 et LDHA) dans les cellules U118-MG exposées à des doses croissantes de fénofibrate à 25 μM (FF25), 50 μM (FF50) et 100 μM (FF100) en comparaison aux cellules non traitées (*Untreated*).

La quantité d'ARN messagers du gène d'intérêt (mRNA) est rapportée à la quantité d'ARNm de l'actine (ACTB). Moyenne de 3 expériences. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ns = non significatif.

B) Test de migration cellulaire avec un traitement par fénofibrate

Nous avons ensuite cherché à savoir si le fénofibrate pouvait limiter les capacités de migration des cellules de la lignée U118-MG. La concentration adéquate en fénofibrate dans le milieu de culture cellulaire a été déterminée en réalisant des tests comparatifs de viabilité cellulaire au *crystal violet*, à des doses croissantes de fénofibrate. La concentration à 25µM de fénofibrate n'entraînait pas de toxicité cellulaire significative en comparaison à des puits de cellules non traitées (Figure 21).

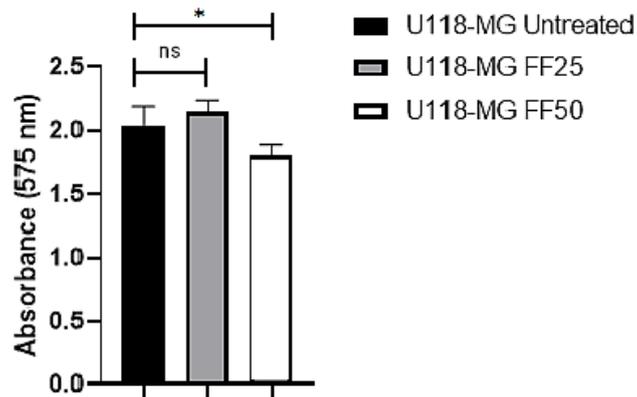


Figure 19 : Test de viabilité cellulaire au *crystal violet* avec la comparaison de l'absorbance entre les différents puits de cellules U118-MG non traitées (untreated), traitées avec 25 µM de fénofibrate (FF25) ou 50 µM de fénofibrate (FF50).

Moyennes de 3 expériences. * $p < 0,05$. ns = non significatif.

Des puits de cellules de la lignée U118-MG étaient traités ou non par du fénofibrate à la concentration de 25 µM. Puis une surveillance de la migration cellulaire était réalisée au cours du temps. Nous avons noté une diminution significative de la migration cellulaire dans les puits traités avec une concentration de 25 µM de fénofibrate (Figure 22).

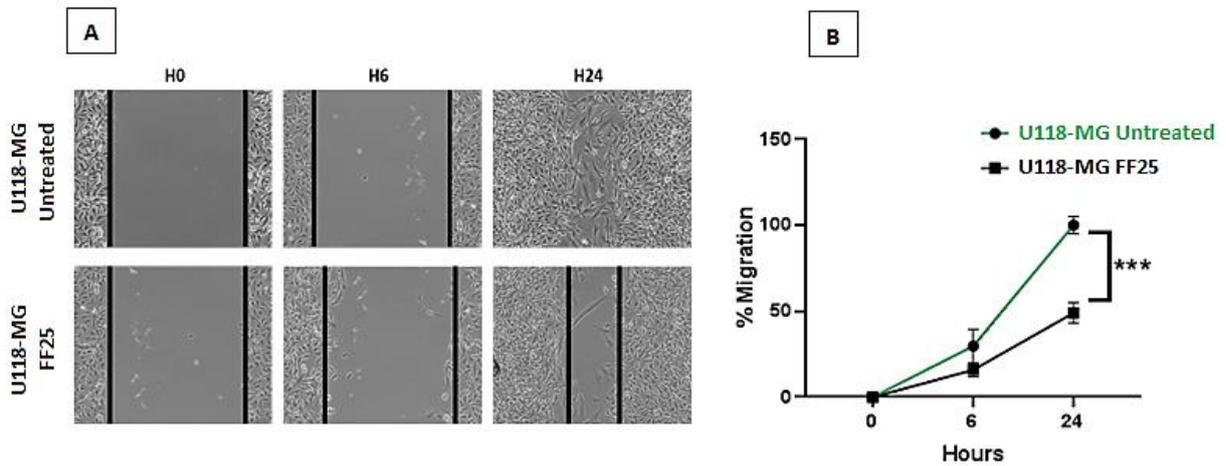


Figure 20 : Test de migration cellulaire réalisé sur la lignée U118-MG sans fénofibrate (Untreated) ou avec 25 μ M de fénofibrate (FF25). (A) Image représentative de 6 expériences. Les traits représentent les marges du « scratch ». La capacité de migration des cellules était évaluée à H0, H6 et H24 en mesurant la distance séparant les deux fronts de confluences dans chaque puits. (B) Pourcentage de migration cellulaire en fonction du temps. Moyenne de 6 expériences. *** $p < 0,001$.

De manière intéressante, il n'y avait pas d'effet significatif du fénofibrate sur la migration des cellules de la lignée LN229 (Figure 23).

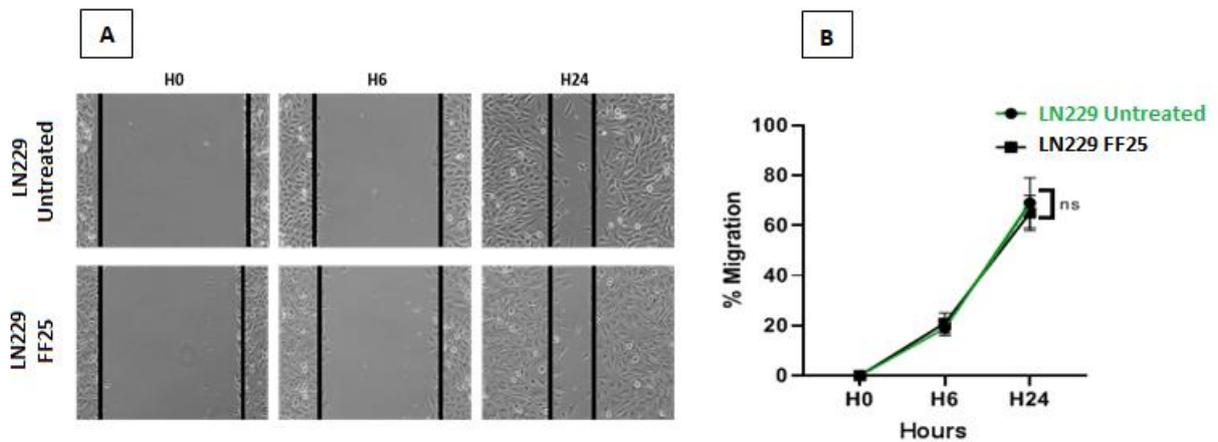


Figure 21 : Test de migration cellulaire réalisé sur la lignée LN229, sans fénofibrate (Untreated) ou avec 25 μ M de fénofibrate (FF25). (A) Image représentative de 3 expériences. Les traits représentent les marges du "scratch". La capacité de migration des cellules était évaluée à H0, H6 et H24 en mesurant la distance séparant les deux fronts de confluences dans chaque puits. (B) Pourcentage de migration cellulaire en fonction du temps. Moyenne de 3 expériences. ns = non significatif.

C) Test de migration cellulaire avec un traitement par de l'acide oxamique

Nous avons renouvelé les tests de migration cellulaire sur la lignée U118-MG après un traitement par de l'acide oxamique. Ce composé est un inhibiteur de la LDHA, enzyme catalysant la dernière étape

Résultats

de la glycolyse. La concentration adéquate en acide oxamique dans le milieu de culture cellulaire a été déterminée en réalisant des tests comparatifs de viabilité cellulaire au *crystal violet*, avec des doses croissantes d'acide oxamique. La concentration à 50 μM n'entraînait pas de toxicité cellulaire significative en comparaison à des puits de cellules non traitées.

Des puits de cellules de la lignée U118-MG étaient traités ou non par de l'acide oxamique, à la concentration de 50 μM . Puis une surveillance de la migration cellulaire était réalisée au cours du temps. On notait une diminution significative de la migration cellulaire dans les puits traités avec une concentration de 50 μM d'acide oxamique (Figure 24).

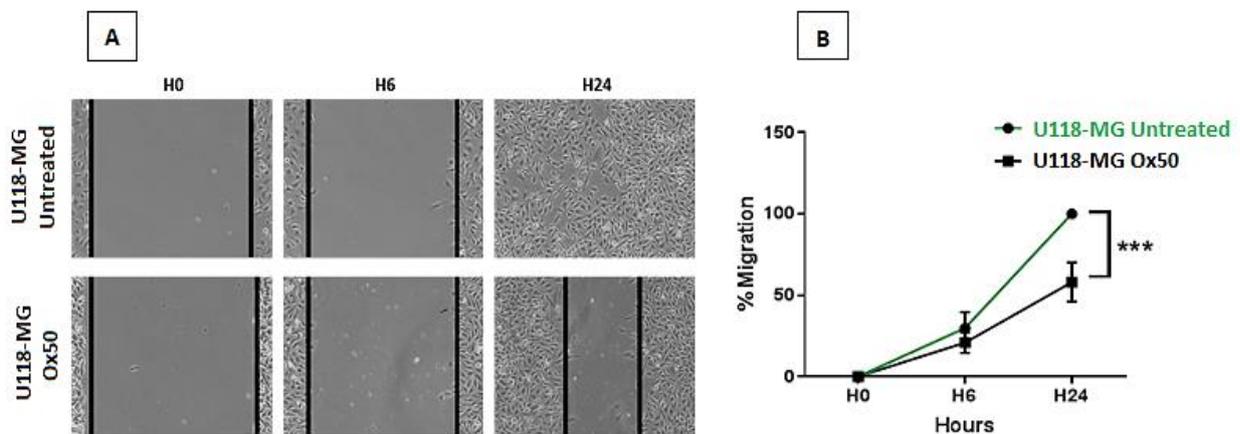


Figure 22 : Test de migration cellulaire réalisé sur la lignée U118-MG sans acide oxamique (Untreated) ou avec 50 μM d'acide oxamique (Ox50). (A) Image représentative de 6 expériences. Les traits représentent les marges du « scratch ». La capacité de migration des cellules était évaluée à H0, H6 et H24 en mesurant la distance séparant les deux fronts de confluences dans chaque puits. (B) Pourcentage de migration cellulaire en fonction du temps. Moyenne de 6 expériences. *** $p < 0,001$.

D) Évaluation de l'impact d'un traitement inhibiteur de la glycolyse sur l'expression des gènes impliqués dans la migration cellulaire

Nous avons ensuite cherché à vérifier que l'inhibition de la migration cellulaire par le fénofibrate ou par l'acide oxamique s'accompagnait d'une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la migration.

Nous avons donc mesuré par RT-qPCR l'expression de ZEB1, ZEB2, SNAIL et TWIST dans les cellules de la lignée U118-MG exposées à des doses croissantes de fénofibrate ou d'acide oxamique.

Sur la figure 25, on constate que lorsque les cellules de la lignée U118-MG étaient exposées à des doses croissantes de fénofibrate (25 μM , 50 μM et 100 μM), elles exprimaient moins les gènes impliqués dans la migration cellulaire. Cette diminution d'expression de ces gènes se faisait de manière proportionnelle à l'augmentation de la concentration en fénofibrate dans le milieu de culture cellulaire.

Résultats

Sur la figure 26, le constat est similaire lorsque les cellules de la lignée U118-MG étaient exposées à des doses croissantes d'acide oxamique (25 μ M, 50 μ M et 100 μ M).

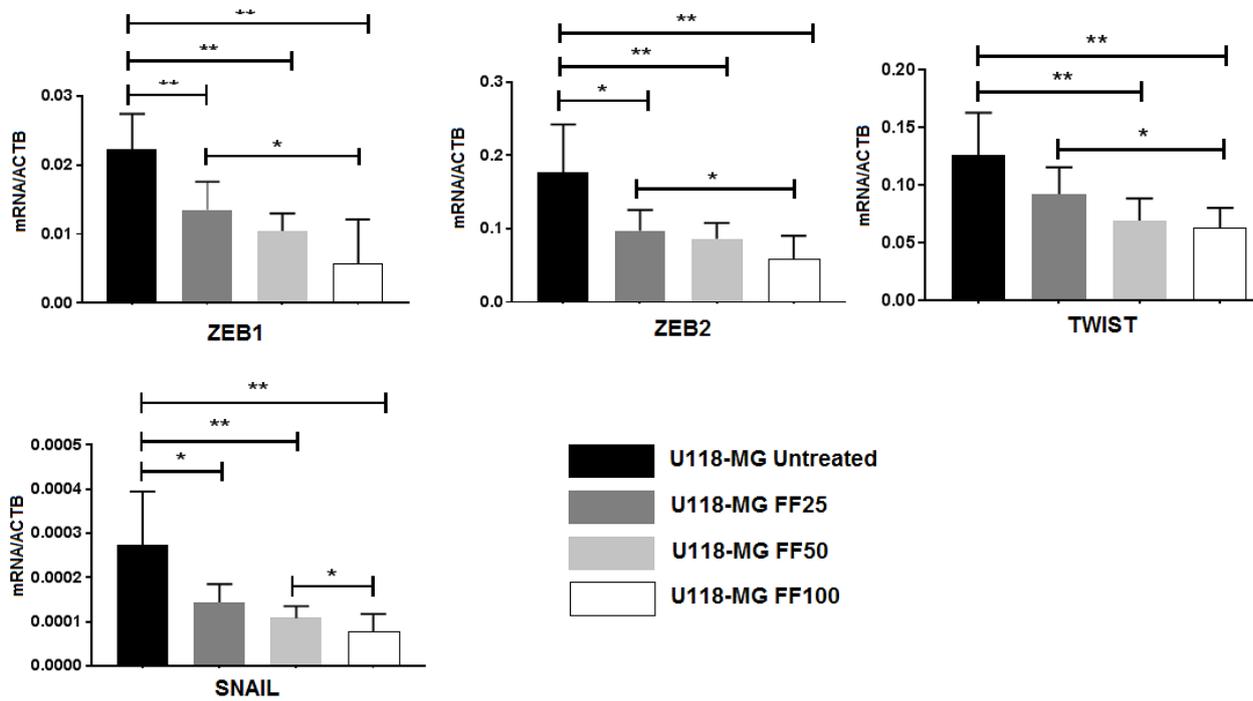


Figure 23 : Expression des différents gènes codant pour des protéines impliquées dans la migration cellulaire dans la lignée U118-MG lorsque les cellules sont exposées à des doses croissantes de fénofibrate, à 25 μ M (FF25), 50 μ M (FF50) et 100 μ M (FF100) en comparaison aux cellules non traitées (Untreated). La quantité d'ARN messagers du gène d'intérêt (mRNA) est rapportée à la quantité d'ARNm de l'actine (ACTB). Moyennes de 3 expériences. * p < 0,05, ** p < 0,01.

Résultats

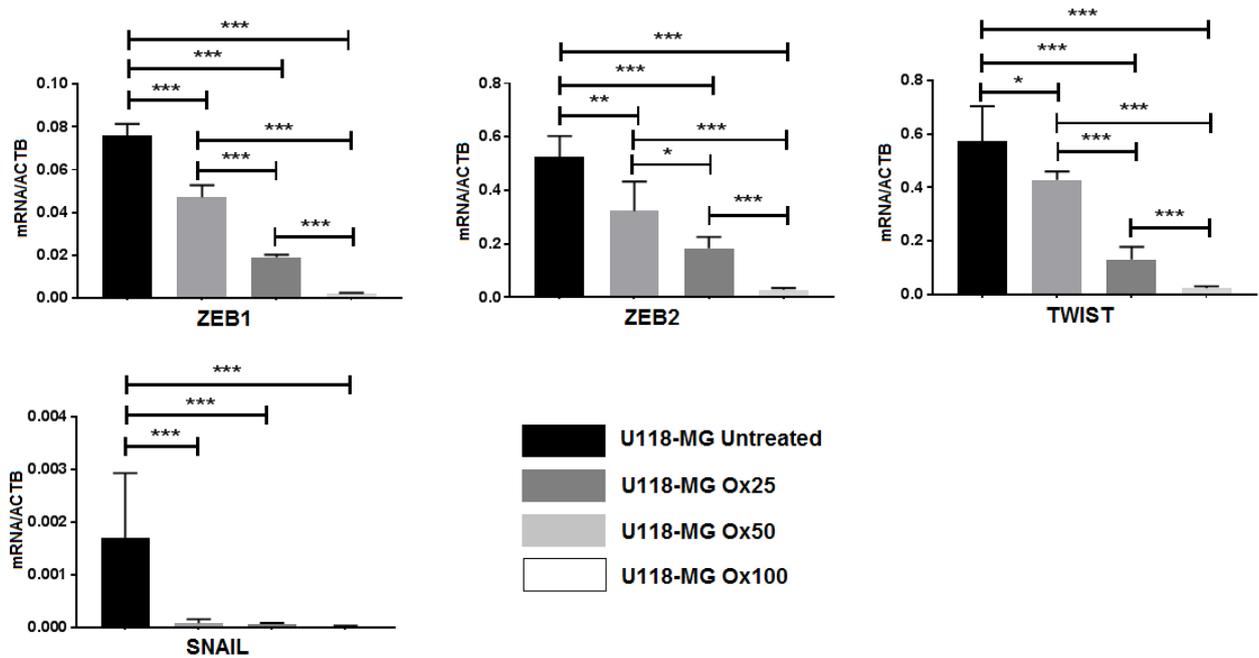


Figure 24 : Expression des différents gènes codant pour des protéines impliquées dans la migration cellulaire dans la lignée U118-MG lorsque les cellules sont exposées à des doses croissantes d'acide oxamique, à 25 μ M (Ox25), 50 μ M (Ox50) et 100 μ M (Ox100) en comparaison aux cellules non traitées (Untreated). La quantité d'ARN messagers du gène d'intérêt (mRNA) est rapportée à la quantité d'ARNm de l'actine (ACTB). Moyennes de 3 expériences. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

IV) Le lactate favorise la migration des cellules de la lignée LN229

A) Test de migration cellulaire après un traitement par lactate sur la lignée LN229

Étant donné que l'inhibition de la LDHA (Lactate DésHydrogénase A) par l'acide oxamique réduisait de manière significative la migration des cellules de la lignée U118-MG, nous avons cherché à mettre en évidence une implication directe du lactate dans la migration des cellules tumorales.

Des puits de cellules de la lignée LN229 étaient traités ou non par du lactate, à la concentration de 17 mM dans le milieu de culture cellulaire. Puis une surveillance de la migration cellulaire était réalisée au cours du temps.

On notait une augmentation significative de la migration cellulaire dans les puits traités avec une concentration de 17 mM de lactate (Figure 27).

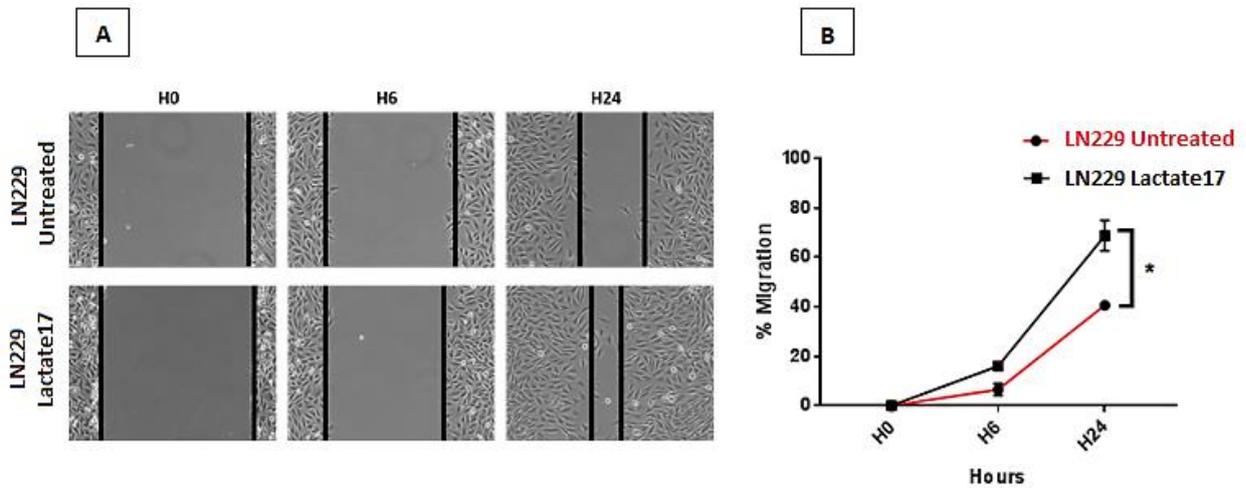


Figure 25 : Test de migration cellulaire réalisé sur la lignée LN229 sans lactate (Untreated) ou avec une concentration 17 mM en lactate dans le milieu de culture cellulaire (Lactate17). (A) Image représentative de 4 expériences. Les traits représentent les marges du « scratch ». La capacité de migration des cellules était évaluée à H0, H6 et H24 en mesurant la distance séparant les deux fronts de confluences dans chaque puits. (B) Pourcentage de migration cellulaire en fonction du temps. Moyenne de 4 expériences. * $p < 0,05$.

B) Évaluation de l'impact d'un traitement par lactate sur l'expression des gènes impliqués dans la migration cellulaire

Nous avons ensuite étudié l'expression des gènes de la migration dans les cellules LN229, lorsqu'elles étaient exposées à une concentration de 17 mM de lactate.

Sur la figure 28, on observe que l'expression des gènes ZEB1, ZEB2 et TWIST était significativement augmentée lorsque que le milieu de culture des cellules de la lignée LN229 était supplémenté en lactate. Il n'y avait cependant pas d'effet significatif de l'adjonction de lactate sur l'expression de SNAIL.

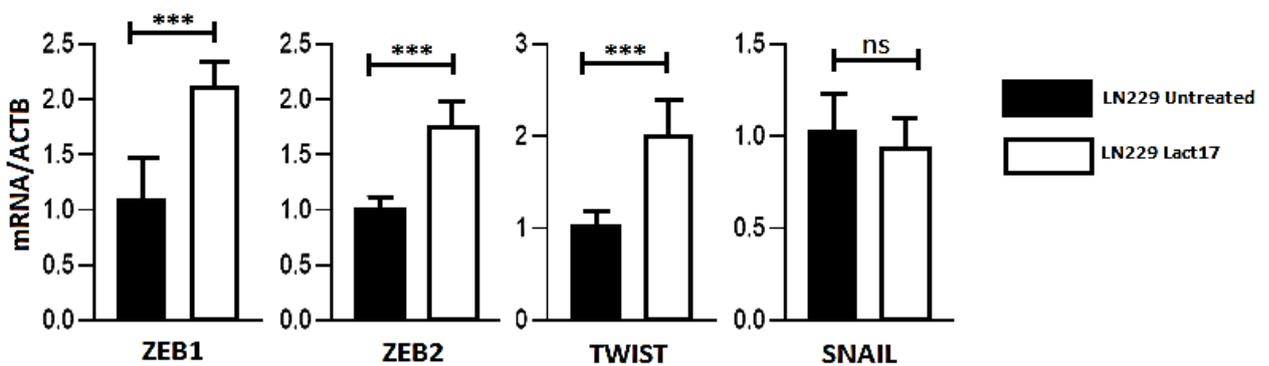


Figure 26 : Expression comparative des différents gènes impliqués dans la migration cellulaire dans la lignée LN229 lorsque le milieu de culture cellulaire est supplémenté en lactate (LN229 Lact17) ou non (LN229 Untreated).

La quantité d'ARN messagers du gène d'intérêt (mRNA) est rapportée à la quantité d'ARNm de l'actine (ACTB). Moyennes de 3 expériences. *** $p < 0.001$. ns = non significatif.

V) La récurrence à distance des glioblastomes semble favorisée par l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse et dans la migration cellulaire

Nous avons recensé tous les patients pris en charge pour un glioblastome entre novembre 2017 et novembre 2018 au Centre George-François Leclerc, à Dijon.

Les critères d'inclusion étaient un diagnostic de glioblastome confirmé par un examen anatomopathologique, une réponse initiale au traitement (stabilité ou régression lésionnelle) avec une prise en charge par un protocole Stupp. Nous avons exclu de l'analyse, les patients n'ayant pas donné leur consentement écrit pour le recueil de leurs données cliniques.

Sur le pool initial de 41 patients, 15 patients répondaient aux critères d'inclusion et ne présentaient pas de critère d'exclusion. Parmi ces patients, nous en avons sélectionné 5 ayant présenté une récurrence locale de leur glioblastome et 5 ayant présenté une récurrence à distance (Tableau 8).

Afin de pouvoir comparer nos deux groupes de patients, un appariement des patients sur le sexe, l'âge au diagnostic (+/- 5 ans) et le caractère de la résection chirurgicale a été réalisé.

	Récurrence	Sexe	Age(ans)	Résection chirurgicale	IDH	MGMT
Couple 1	Locale	Masculin	74	Totale	non muté	non méthylé
	À distance	Masculin	75	Totale	non muté	non méthylé
Couple 2	Locale	Féminin	67	Partielle	non muté	non méthylé
	À distance	Féminin	72	Partielle	non muté	non méthylé
Couple 3	Locale	Masculin	57	Partielle	non muté	non méthylé
	À distance	Masculin	56	Partielle	non muté	non méthylé
Couple 4	Locale	Masculin	48	Partielle	non muté	non méthylé
	À distance	Masculin	52	Partielle	non muté	non méthylé
Couple 5	Locale	Masculin	45	Partielle	non muté	méthylé
	À distance	Masculin	50	Partielle	non muté	méthylé

Tableau 8 : Caractéristiques des patients sélectionnés, ayant présenté une récurrence locale ou à distance de leurs glioblastomes.

L'expression des gènes impliqués dans la glycolyse (PKM2 et LDHA) et dans la migration cellulaire (ZEB1, ZEB2, TWIST et SNAIL) était quantifiée par RT-qPCR, à partir des blocs de tissus tumoraux issus de l'exérèse chirurgicale initiale des glioblastomes des patients.

L'expression des gènes PKM2 et LDHA était significativement plus importante dans le groupe de patients ayant présenté une récurrence tumorale à distance, en comparaison au groupe de patients ayant récidivé localement (Figure 29, A).

Nous avons noté une tendance à une expression plus importante des gènes impliqués dans la migration cellulaire (ZEB1, ZEB2 et TWIST) dans le groupe de patients ayant présenté une récurrence

Résultats

tumorale à distance, en comparaison au groupe de patients ayant récidivé localement. Seule l'expression de SNAIL était significativement différente entre les 2 groupes (Figure 29, B).

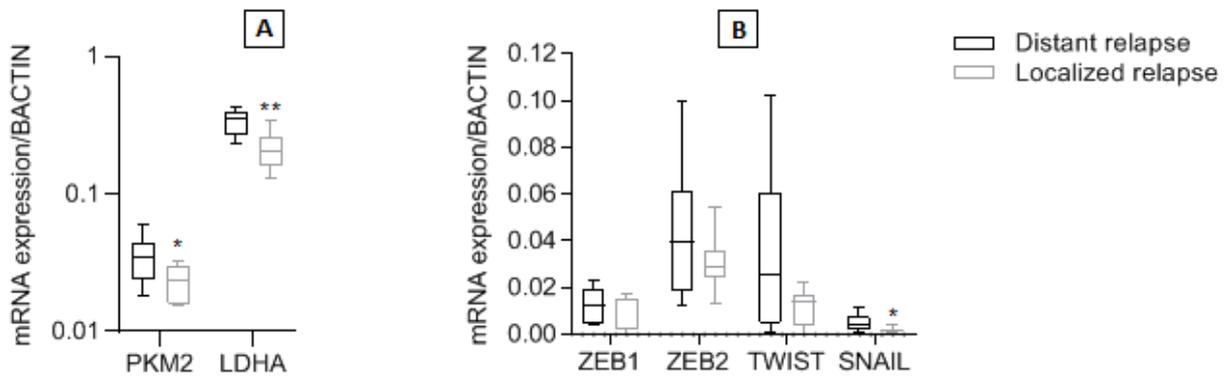


Figure 27 : Expressions comparatives des gènes de la glycolyse (A) et de la migration cellulaire (B) entre le groupe de patients ayant récidivé à distance (*Distant relapse*) et le groupe de patients ayant récidivé localement (*Localized relapse*), de leurs glioblastomes. La quantité d'ARN messagers du gène d'intérêt (mRNA) est rapportée à la quantité d'ARNm de l'actine B (BACTIN). Moyenne de 3 expériences. * p < 0,05, ** p < 0,01.

Partie VI : Discussion et Perspectives

I) Contexte

Le glioblastome est une tumeur au pronostic sombre du fait de son caractère invasif et de ses propriétés de résistance aux traitements anticancéreux classiques, menant à la récurrence systématique. Cette résistance aux chimiothérapies et à la radiothérapie s'explique par la grande hétérogénéité du tissu tumoral avec la présence de cellules gliales très peu différenciées (cellules gliales initiatrices) capable de donner des cellules de génotype et de phénotype différents. La résection chirurgicale reste limitée par les zones fonctionnelles cérébrales mais aussi par la capacité de certaines cellules du glioblastome à migrer à distance du site tumoral initial. Dès lors, la recherche de nouvelles voies thérapeutiques pouvant être efficaces contre ces cellules gliales initiatrices et ces cellules gliales tumorales migrantes paraît essentielle. L'implication des altérations métaboliques dans la transformation et la progression tumorale est établie (Warburg, Wind, et Negelein 1927). L'effet Warburg ou glycolyse cellulaire en conditions aérobie en est la parfaite illustration.

Les dernières décennies ont vu exploser la recherche sur des agents anticancéreux capables de bloquer ces voies métaboliques dérégulées avec des effets décrits, de type essentiellement antiprolifératif.

Plus récemment, plusieurs éléments sont venus étayer l'hypothèse d'une implication de l'effet Warburg dans la migration des cellules tumorales (T. Han et al. 2013).

II) Synthèse des principaux résultats

Notre travail s'est donc intéressé à l'impact de la glycolyse en aérobie dans la capacité de migration des cellules de glioblastome.

En comparant des lignées cellulaires humaines de glioblastomes, nous avons d'abord souligné une hétérogénéité de métabolisme au sein de nos lignées. Cette hétérogénéité est à l'image des différentes cellules composant le tissu tumoral des glioblastomes.

Le choix d'un modèle à deux lignées, aux métabolismes opposés, nous a permis de mettre en évidence que :

- La capacité de glycolyse en aérobie des cellules tumorales de glioblastome était positivement corrélée à leur capacité de migration via l'expression de gènes impliqués dans la migration cellulaire.
- L'inhibition de la glycolyse avait un effet freinateur sur la migration des cellules tumorales.
- Le lactate, produit final de la glycolyse induisait la migration de cellules tumorales (initialement peu migrantes) en favorisant l'expression de gènes impliqués dans la migration cellulaire.

Ces résultats sont en cohérence avec les données de la littérature retrouvant une inhibition de la migration des cellules tumorales lors de l'inhibition de la glycolyse (dans le cancer du poumon) ou lors de

l'inhibition des récepteurs au lactate dans l'adénocarcinome du pancréas (Liu et Yin 2017; Kong et al. 2016).

Grabacka et al. soulignaient déjà en 2004, les propriétés anti-migratoire et anti-métastatique du fénofibrate *in vivo* sur des hamsters, dans le mélanome (Grabacka et al. 2006). L'hypothèse physiopathologique retenue était une inhibition de l'expression de la molécule d'adhésion cellulaire VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*) par les cellules tumorales.

Concernant les tumeurs gliales, les travaux de Miranda-Goncalves et al. ont illustré en 2013, la corrélation entre la capacité de migration et d'invasivité des cellules tumorales et l'expression des récepteurs au lactate MCT1 et MCT4 (Miranda-Gonçalves et al. 2013). Cela, en comparant plusieurs lignées cellulaires humaines de gliomes exprimant ces récepteurs de manière différente.

III) Le lactate : molécule de signalisation dans la migration cellulaire ?

Bien que notre travail ne permette pas d'identifier les voies de signalisations impliquées dans l'induction de la migration cellulaire, plusieurs mécanismes pourraient expliquer la promotion de la migration des cellules tumorales par le lactate.

Le premier mécanisme repose sur une action directe d'acidification du microenvironnement tumoral. Cet état va être favorable à l'activation des métalloprotéases et entraîner une dégradation de la matrice extracellulaire permettant la dissémination des cellules tumorales (Kato et al. 2005).

Plusieurs autres hypothèses pourraient expliquer l'induction de l'expression des gènes impliqués dans la migration cellulaire, par le lactate.

En effet, le lactate est un stabilisateur de la protéine HIF1 (Lu, Forbes, et Verma 2002). Or HIF1 peut jouer le rôle de facteur de transcription, induisant directement l'expression des gènes ZEB1, ZEB2, TWIST et SNAIL (Zhu et al. 2018; Yang et Wu 2008; Xu et al. 2015).

Par ailleurs, de nouveaux éléments plaident en faveur d'un rôle de molécule de signalisation du lactate avec des actions autocrines et paracrines via l'activation du récepteur GPR81 (*G Protein-coupled Receptor 81*) (Brown et Ganapathy 2020; Rawat et al. 2019; Végran et al. 2011a, 1).

Les actions autocrines du lactate décrites dans la littérature correspondent essentiellement à la promotion de l'angiogenèse via l'activation de la voie NF- κ B et l'induction de la synthèse de VEGF. Les effets paracrines du lactate ciblent les cellules immunitaires environnantes avec une polarisation des macrophages associés à la tumeur vers un phénotype non inflammatoire et une inhibition de la prolifération et de l'activité cytotoxique des lymphocytes T (Bohn et al. 2018).

IV) Choix du fénofibrate

Dans ce travail, nous avons choisi le fénofibrate pour nos différents tests thérapeutiques en tant qu'inhibiteur de la glycolyse. Le rationnel du choix de cette molécule repose sur plusieurs arguments.

D'une part, il existe pour le fénofibrate, un recul de plusieurs décennies en matière de pharmacovigilance. D'autre part, le fénofibrate passe la barrière hématoencéphalique du fait de son caractère lipophile (Deplanque et al. 2003). Enfin, son mode d'administration est simple. Cependant la perméabilité de la barrière hématoencéphalique au fénofibrate, n'est que partielle, limitant la biodisponibilité locale de la molécule.

Le fénofibrate inhibe la glycolyse de manière indirecte en activant la voie PPAR α . La voie PPAR α inhibe la voie NF-kB qui est un activateur de la glycolyse. Cependant, la voie PPAR α stimule également la beta-oxydation des acides gras qui est une source d'énergie pour les cellules. On peut donc se poser la question d'un éventuel support énergétique, au travers de cette voie pour les cellules tumorales recevant du fénofibrate. De plus, le PPAR α agit comme un régulateur transcriptionnel de nombreux gènes. On ne peut exclure l'existence d'une inhibition de la migration cellulaire exclusivement PPAR α dépendante, indépendante de la glycolyse.

Ces éléments soulignent l'intérêt d'une reproductibilité de nos résultats avec un inhibiteur de la glycolyse intervenant à une étape différente, tel que l'acide oxamique.

V) Limites du modèle in-vitro

Le caractère exclusivement *in vitro* de nos expériences induit un biais dans la représentativité de l'environnement tumoral.

On peut tout d'abord se poser la question des effets d'une inhibition de la glycolyse, sur le parenchyme cérébral sain. En effet, le couplage métabolique entre les neurones et les astrocytes illustre le rôle central de la glycolyse dans métabolisme cérébral. Cependant, dans des modèles *in vitro*, les cellules neurales non tumorales semblent peu affectées par la déplétion en glucose du milieu de culture en comparaison aux cellules gliales tumorales (P. Mukherjee et al. 2008). Cette différence de sensibilité s'expliquerait par une variation brutale des ratios d'ATP dans les cellules tumorales, induisant un stress énergétique cellulaire et ainsi, l'apoptose. Dans les cellules neurales saines, ce stress énergétique ne se produit pas, du fait d'un métabolisme glycolytique significativement inférieur à celui des cellules tumorales.

L'influence de l'hypoxie dans le tissu tumoral n'a pas pu être étudiée. Or, la protéine HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*) est un inducteur clé de l'expression des gènes de la glycolyse (Semenza et al. 1994). Elle est également impliquée dans les phénomènes de migration et d'invasion tumorale par le biais de

voies de signalisations parfois indépendantes de la glycolyse (Jl et al. 2013). Toutefois, la stabilisation de la protéine HIF1 reste dépendante du lactate issu de la glycolyse (Lu, Forbes, et Verma 2002).

La néoangiogénèse est une caractéristique commune aux lésions tumorales de haut grade. Elle favorise la prolifération et la dissémination à distance des cellules tumorales. Cette néoangiogénèse s'accompagne d'une expression accrue du VEGFA (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) dans les cellules endothéliales, favorisée par la stabilisation de la protéine HIF1 par le lactate intracellulaire (Végran et al. 2011b). Les effets éventuellement anti-angiogéniques d'une inhibition de la glycolyse des cellules tumorales n'ont également pas pu être étudiés dans notre modèle.

Enfin, le système immunitaire est le premier rempart contre la prolifération des cellules néoplasiques. Dans le glioblastome, on observe un environnement très immunosuppresseur favorisé par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, notamment par les macrophages associés à la tumeur (TAMs). Ces TAMs présentent un phénotype anti-inflammatoire qui va être un support de la progression tumorale. La polarisation des macrophages vers ce phénotype anti-inflammatoire serait favorisée par le recaptage du lactate par ces macrophages avec une cascade de signalisation intracellulaire induisant l'expression de gènes tels que Arg1 (Arginase 1) (Colegio et al. 2014; Bohn et al. 2018). L'inhibition de la glycolyse pourrait donc permettre de restaurer une réponse immunitaire efficace en limitant la présence de lactate dans l'environnement tumoral.

VI) Perspectives

L'inhibition de la glycolyse semble prometteuse contre la migration des cellules tumorales de glioblastome, dans notre modèle expérimental *in vitro*.

Ces résultats seraient à confirmer dans un modèle *in vivo* de type murin, afin d'intégrer à l'analyse des données, d'autres facteurs clés de l'échappement tumoral que sont la néoangiogénèse et l'anergie de la réponse immunitaire.

Bien que nous ne nous soyons uniquement intéressés à la migration des cellules tumorales dans ce travail, l'inhibition de la glycolyse aurait également des effets anti-prolifératifs et pro-apoptotiques. Il serait donc intéressant de réaliser des tests thérapeutiques *in vitro* avec des associations de type fénofibrate et témozolomide afin de révéler un effet chimiosensibilisant des inhibiteurs de la glycolyse. Ces expériences pourraient de la même manière être renouvelées, en exposant dans un second temps les cellules à une irradiation, afin de dégager un éventuel effet radiosensibilisant d'une inhibition de la glycolyse. Si ces expériences s'avéraient concluantes, l'utilisation d'inhibiteurs de la glycolyse en adjuvants thérapeutiques chez les patients atteints d'un glioblastome pourrait s'envisager.

Enfin, l'effet Warburg étant observé dans la plupart des cancers, l'effet anti-migratoire voire anti-métastatique des inhibiteurs de la glycolyse pourrait être vérifié dans d'autres types histologiques tumoraux. Cela ouvre une voie thérapeutique anticancéreuse prometteuse.

Partie VII : Conclusions

CONCLUSIONS

En comparant la capacité de glycolyse de différentes lignées cellulaires humaines de glioblastomes, nous avons mis en évidence une corrélation positive entre la capacité de glycolyse des cellules tumorales et leur capacité de migration. La migration des cellules tumorales de glioblastomes était significativement freinée lorsque la lignée cellulaire la plus glycolytique (U118-MG) était traitée par un inhibiteur de la glycolyse tel que le fénofibrate ou l'acide oxamique. L'ajout de lactate, produit final de la glycolyse, dans le milieu de culture de la lignée cellulaire la moins glycolytique (LN229), induisait la migration des cellules tumorales.

Ces résultats plaident pour une participation des altérations métaboliques, à l'échappement tumoral dans le glioblastome. L'utilisation des inhibiteurs de glycolyse en adjuvant des thérapeutiques classiques dans le glioblastome pourrait s'avérer intéressante dans la prévention des récurrences tumorales.

Le Président du jury,



Pr. BESJOT

Vu et permis d'imprimer
Dijon, le 29 Mai 2020
Le Doyen



Pr. M. MAYNADIÉ

Partie VIII : Bibliographie

Bibliographie

- Addeo, Raffaele, Michele Caraglia, M. Serena De Santi, Liliana Montella, Alberto Abbruzzese, Ciro Parlato, Bruno Vincenzi, et al. 2011. « A New Schedule of Fotemustine in Temozolomide-Pretreated Patients with Relapsing Glioblastoma ». *Journal of Neuro-Oncology* 102 (3): 417-24.
- Agarwala, S. S., et J. M. Kirkwood. 2000. « Temozolomide, a Novel Alkylating Agent with Activity in the Central Nervous System, May Improve the Treatment of Advanced Metastatic Melanoma ». *The Oncologist* 5 (2): 144-51.
- Agnihotri, Sameer, et Gelareh Zadeh. 2016. « Metabolic reprogramming in glioblastoma: the influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions ». *Neuro-Oncology* 18 (2): 160-72.
- Ataman, Fatma, Philip Poortmans, Roger Stupp, Barbara Fisher, et René-Olivier Mirimanoff. 2004. « Quality Assurance of the EORTC 26981/22981; NCIC CE3 Intergroup Trial on Radiotherapy with or without Temozolomide for Newly-Diagnosed Glioblastoma Multiforme: The Individual Case Review ». *European Journal of Cancer* 40 (11): 1724-30.
- Azoitei, Ninel, Alexander Becher, Konrad Steinestel, Arefeh Rouhi, Kristina Diepold, Felicitas Genze, Thomas Simmet, et Thomas Seufferlein. 2016. « PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 α through NF- κ B activation ». *Molecular Cancer* 15 (1): 3.
- Baldi, I., A. Huchet, L. Bauchet, et H. Loiseau. 2010. « [Epidemiology of glioblastoma] ». *Neuro-Chirurgie* 56 (6): 433-40.
- Baumann, Fusun, Petra Leukel, Anett Doerfelt, Christoph P. Beier, Katja Dettmer, Peter J. Oefner, Michael Kastenberger, et al. 2009. « Lactate promotes glioma migration by TGF- β 2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2 ». *Neuro-Oncology* 11 (4): 368-80.
- Beauchesne, Patrick. 2012. « Fotemustine: A Third-Generation Nitrosourea for the Treatment of Recurrent Malignant Gliomas ». *Cancers* 4 (1): 77-87.
- Beier, Dagmar, Peter Hau, Martin Proescholdt, Annette Lohmeier, Jörg Wischhusen, Peter J. Oefner, Ludwig Aigner, Alexander Brawanski, Ulrich Bogdahn, et Christoph P. Beier. 2007. « CD133(+) and CD133(-) Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles ». *Cancer Research* 67 (9): 4010-15.
- Birner, Peter, Maria Piribauer, Ingeborg Fischer, Brigitte Gatterbauer, Christine Marosi, Karl Ungersböck, Karl Rössler, Herbert Budka, et Johannes A. Hainfellner. 2002. « Prognostic Relevance of P53 Protein Expression in Glioblastoma ». *Oncology Reports* 9 (4): 703-7.
- Bohn, Toszka, Steffen Rapp, Natascha Luther, Matthias Klein, Till-Julius Bruehl, Nobuhiko Kojima, Pamela Aranda Lopez, et al. 2018. « Tumor Immuno-evasion via Acidosis-Dependent Induction of Regulatory Tumor-Associated Macrophages ». *Nature Immunology* 19 (12): 1319-29.
- Braganza, Melissa Z., Cari M. Kitahara, Amy Berrington de González, Peter D. Inskip, Kimberly J. Johnson, et Preetha Rajaraman. 2012. « Ionizing Radiation and the Risk of Brain and Central Nervous System Tumors: A Systematic Review ». *Neuro-Oncology* 14 (11): 1316-24.
- Chen, Jian, Yanjiao Li, Tzong-Shiue Yu, Renée M. McKay, Dennis K. Burns, Steven G. Kernie, et Luis F. Parada. 2012. « A Restricted Cell Population Propagates Glioblastoma Growth after Chemotherapy ». *Nature* 488 (7412): 522-26.

Bibliographie

- Ciavardelli, D., C. Rossi, D. Barcaroli, S. Volpe, A. Consalvo, M. Zucchelli, A. De Cola, et al. 2014. « Breast Cancer Stem Cells Rely on Fermentative Glycolysis and Are Sensitive to 2-Deoxyglucose Treatment ». *Cell Death & Disease* 5: e1336.
- Cohen, Adam, Sheri Holmen, et Howard Colman. 2013. « IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas ». *Current neurology and neuroscience reports* 13 (5): 345.
- Colegio, Oscar R., Ngoc-Quynh Chu, Alison L. Szabo, Thach Chu, Anne Marie Rhebergen, Vikram Jairam, Nika Cyrus, et al. 2014. « Functional Polarization of Tumour-Associated Macrophages by Tumour-Derived Lactic Acid ». *Nature* 513 (7519): 559-63.
- Crespo, Ines, Ana Louisa Vital, María Gonzalez-Tablas, María del Carmen Patino, Alvaro Otero, María Celeste Lopes, Catarina de Oliveira, Patricia Domingues, Alberto Orfao, et Maria Dolores Taberner. 2015. « Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme ». *The American Journal of Pathology* 185 (7): 1820-33.
- Cui, Xin-Gang, Zhi-Tao Han, Shao-Hui He, Xing-da Wu, Tian-Rui Chen, Cheng-Hao Shao, Dan-Lei Chen, et al. 2017. « HIF1/2 α Mediates Hypoxia-Induced LDHA Expression in Human Pancreatic Cancer Cells ». *Oncotarget* 8 (15): 24840-52.
- De Witt Hamer, Philip C., Santiago Gil Robles, Aeilko H. Zwinderman, Hugues Duffau, et Mitchel S. Berger. 2012. « Impact of Intraoperative Stimulation Brain Mapping on Glioma Surgery Outcome: A Meta-Analysis ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (20): 2559-65.
- Delerive, P., K. De Bosscher, S. Besnard, W. Vanden Berghe, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, J. C. Fruchart, A. Tedgui, G. Haegeman, et B. Staels. 1999. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Negatively Regulates the Vascular Inflammatory Gene Response by Negative Cross-Talk with Transcription Factors NF-KappaB and AP-1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (45): 32048-54.
- Deplanque, Dominique, Patrick Gelé, Olivier Pétrault, Isabelle Six, Christophe Furman, Muriel Bouly, Stéphane Nion, et al. 2003. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha Activation as a Mechanism of Preventive Neuroprotection Induced by Chronic Fenofibrate Treatment ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (15): 6264-71.
- Di, Hui, Xinting Zhang, Yi Guo, Yanfang Shi, Chuan Fang, Yu Yuan, Jiwei Wang, Chao Shang, Wenzhe Guo, et Chunhui Li. 2018. « Silencing LDHA Inhibits Proliferation, Induces Apoptosis and Increases Chemosensitivity to Temozolomide in Glioma Cells ». *Oncology Letters* 15 (4): 5131-36.
- Dienel, Gerald A., et Nancy F. Cruz. 2016. « Aerobic Glycolysis during Brain Activation: Adrenergic Regulation and Influence of Norepinephrine on Astrocytic Metabolism ». *Journal of Neurochemistry* 138 (1): 14-52.
- Doucette, Tiffany, Ganesh Rao, Arvind Rao, Li Shen, Kenneth Aldape, Jun Wei, Kristine Dziurzynski, Mark Gilbert, et Amy B. Heimberger. 2013. « Immune Heterogeneity of Glioblastoma Subtypes: Extrapolation from the Cancer Genome Atlas ». *Cancer Immunology Research* 1 (2): 112-22.
- Dührsen, Lasse, Thomas Sauvigny, Franz L. Ricklefs, Klaus-Christian Mende, Miriam Schaper, Jakob Matschke, Einar Goebell, Manfred Westphal, et Tobias Martens. 2019. « Seizures as Presenting Symptom in Patients with Glioblastoma ». *Epilepsia* 60 (1): 149-54.

Bibliographie

- Emmink, Benjamin L., André Verheem, Winan J. Van Houdt, Ernst J. A. Steller, Klaas M. Govaert, Thang V. Pham, Sander R. Piersma, Inne H. M. Borel Rinkes, Connie R. Jimenez, et Onno Kranenburg. 2013. « The Secretome of Colon Cancer Stem Cells Contains Drug-Metabolizing Enzymes ». *Journal of Proteomics* 91 (octobre): 84-96.
- Erbsloh, F., P. Klarner, et A. Bernsmeier. 1958. « [The balance of cerebral sugar metabolism] ». *Klinische Wochenschrift* 36 (18): 849-52.
- Esteller, M., J. Garcia-Foncillas, E. Andion, S. N. Goodman, O. F. Hidalgo, V. Vanaclocha, S. B. Baylin, et J. G. Herman. 2000. « Inactivation of the DNA-Repair Gene MGMT and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents ». *The New England Journal of Medicine* 343 (19): 1350-54.
- Friedman, Henry S., Michael D. Prados, Patrick Y. Wen, Tom Mikkelsen, David Schiff, Lauren E. Abrey, W. K. Alfred Yung, et al. 2009. « Bevacizumab Alone and in Combination with Irinotecan in Recurrent Glioblastoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (28): 4733-40.
- Galli, Rossella, Elena Binda, Ugo Orfanelli, Barbara Cipelletti, Angela Gritti, Simona De Vitis, Roberta Fiocco, Chiara Foroni, Francesco Dimeco, et Angelo Vescovi. 2004. « Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma ». *Cancer Research* 64 (19): 7011-21.
- Gocha, April Renee Sandy, Harris Julia, Groden Joanna. 2012. « Alternative mechanisms of telomere lengthening: permissive mutations, DNA repair proteins and tumorigenic progression ». *Mutation Research* 743-744:142-150
- Goodenberger, McKinsey L., et Robert B. Jenkins. 2012. « Genetics of Adult Glioma ». *Cancer Genetics* 205 (12): 613-21.
- Grabacka, Maja, Przemyslaw M. Plonka, Krystyna Urbanska, et Krzysztof Reiss. 2006. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Activation Decreases Metastatic Potential of Melanoma Cells in Vitro via down-Regulation of Akt ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12 (10): 3028-36.
- Grabowski, Matthew M., Pablo F. Recinos, Amy S. Nowacki, Jason L. Schroeder, Lilyana Angelov, Gene H. Barnett, et Michael A. Vogelbaum. 2014. « Residual Tumor Volume versus Extent of Resection: Predictors of Survival after Surgery for Glioblastoma ». *Journal of Neurosurgery* 121 (5): 1115-23.
- Grygiel-Górniak, Bogna. 2014. « Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review ». *Nutrition Journal* 13 (février): 17.
- Guyotat, Jacques, Johan Pallud, Xavier Armoiry, Vladislav Pavlov, et Philippe Metellus. 2016. « 5-Aminolevulinic Acid-Protoporphyrin IX Fluorescence-Guided Surgery of High-Grade Gliomas: A Systematic Review ». *Advances and Technical Standards in Neurosurgery*, n° 43: 61-90.
- Han, Dongfeng, Wenjin Wei, Xincheng Chen, Yaxuan Zhang, Yingyi Wang, Junxia Zhang, Xiefeng Wang, et al. 2015. « NF-KB/RelA-PKM2 Mediates Inhibition of Glycolysis by Fenofibrate in Glioblastoma Cells ». *Oncotarget* 6 (28): 26119-28.

Bibliographie

- Han, Tianyu, De Kang, Daokun Ji, Xiaoyu Wang, Weihua Zhan, Mingguo Fu, Hong-Bo Xin, et Jian-Bin Wang. 2013. « How Does Cancer Cell Metabolism Affect Tumor Migration and Invasion? » *Cell Adhesion & Migration* 7 (5): 395-403.
- Han, Y., C. G. Caday, K. Umezawa, et A. Nanda. 1997. « Preferential Inhibition of Glioblastoma Cells with Wild-Type Epidermal Growth Factor Receptors by a Novel Tyrosine Kinase Inhibitor Ethyl-2,5-Dihydroxycinnamate ». *Oncology Research* 9 (11-12): 581-87.
- Hegi, Monika E., Annie-Claire Diserens, Thierry Gorlia, Marie-France Hamou, Nicolas de Tribolet, Michael Weller, Johan M. Kros, et al. 2005. « MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma ». *New England Journal of Medicine* 352 (10): 997-1003.
- Heiland, Dieter Henrik, Gerrit Haaker, Daniel Delev, Bianca Mercas, Waseem Masalha, Sabrina Heynckes, Annette Gäbelein, et al. 2017. « Comprehensive Analysis of PD-L1 Expression in Glioblastoma Multiforme ». *Oncotarget* 8 (26): 42214-25.
- Jackson, Melanie, Foteini Hassiotou, et Anna Nowak. 2015. « Glioblastoma Stem-like Cells: At the Root of Tumor Recurrence and a Therapeutic Target ». *Carcinogenesis* 36 (2): 177-85.
- Jan, Chia-Ing, Ming-Hsui Tsai, Chang-Fang Chiu, Yi-Ping Huang, Chia Jen Liu, et Nai Wen Chang. 2016. « Fenofibrate Suppresses Oral Tumorigenesis via Reprogramming Metabolic Processes: Potential Drug Repurposing for Oral Cancer ». *International Journal of Biological Sciences* 12 (7): 786-98.
- Ji, Wang, Qiu, Li, Zhu, Liang, Wan, et Di. 2013. « Hypoxia inducible factor 1 α -mediated LOX expression correlates with migration and invasion in epithelial ovarian cancer ». *International Journal of Oncology* 42 (5): 1578-88.
- Joensuu, Heikki, Marjut Pupa, Harri Sihto, Olli Tynnen, et Nina N. Nupponen. 2005. « Amplification of Genes Encoding KIT, PDGFR α and VEGFR2 Receptor Tyrosine Kinases Is Frequent in Glioblastoma Multiforme ». *The Journal of Pathology* 207 (2): 224-31.
- Kato, Yasumasa, Charles A. Lambert, Alain C. Colige, Pierre Mineur, Agnès Noël, Francis Frankenne, Jean-Michel Foidart, et al. 2005. « Acidic Extracellular pH Induces Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Mouse Metastatic Melanoma Cells through the Phospholipase D-Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (12): 10938-44.
- Kazmi, Farasat, Yu Yang Soon, Yiat Horng Leong, Wee Yao Koh, et Balamurugan Vellayappan. 2019. « Re-Irradiation for Recurrent Glioblastoma (GBM): A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Neuro-Oncology* 142 (1): 79-90.
- Kim, Michelle M., Yoshie Umemura, et Denise Leung. 2018. « Bevacizumab and Glioblastoma: Past, Present, and Future Directions ». *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)* 24 (4): 180-86.
- Kong, Su Chii, Asbjørn Nøhr-Nielsen, Katrine Zeeberg, Stephan Joel Reshkin, Else Kay Hoffmann, Ivana Novak, et Stine Falsig Pedersen. 2016. « Monocarboxylate Transporters MCT1 and MCT4 Regulate Migration and Invasion of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells ». *Pancreas* 45 (7): 1036-47.
- Krzyszak, Anna, Katarzyna Wojcik-Krowiranda, Ewa Forma, Paweł Jozwiak, Hanna Romanowicz, Andrzej Bienkiewicz, et Magdalena Brys. 2012. « Expression of GLUT1 and GLUT3 Glucose Transporters in Endometrial and Breast Cancers ». *Pathology & Oncology Research* 18 (3): 721-28.

Bibliographie

- Lee, Jeffrey C, Igor Vivanco, Rameen Beroukhi, Julie H. Y Huang, Whei L Feng, Ralph M DeBiasi, Koji Yoshimoto, et al. 2006. « Epidermal Growth Factor Receptor Activation in Glioblastoma through Novel Missense Mutations in the Extracellular Domain ». *PLoS Medicine* 3 (12).
- Liao, Jianqun, Feng Qian, Nana Tchabo, Paulette Mhaweche-Fauceglia, Amy Beck, Zikun Qian, Xinhui Wang, et al. 2014. « Ovarian Cancer Spheroid Cells with Stem Cell-like Properties Contribute to Tumor Generation, Metastasis and Chemotherapy Resistance through Hypoxia-Resistant Metabolism ». *PloS One* 9 (1): e84941.
- Liu, Tao, et Honglei Yin. 2017. « PDK1 Promotes Tumor Cell Proliferation and Migration by Enhancing the Warburg Effect in Non-Small Cell Lung Cancer ». *Oncology Reports* 37 (1): 193-200.
- Louis, David N., Arie Perry, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling, Dominique Figarella-Branger, Webster K. Cavenee, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Paul Kleihues, et David W. Ellison. 2016. « The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary ». *Acta Neuropathologica* 131 (6): 803-20.
- Lu, Huasheng, Robert A. Forbes, et Ajay Verma. 2002. « Hypoxia-Inducible Factor 1 Activation by Aerobic Glycolysis Implicates the Warburg Effect in Carcinogenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (26): 23111-15.
- Maclver, Nancie J., Ryan D. Michalek, et Jeffrey C. Rathmell. 2013. « Metabolic Regulation of T Lymphocytes ». *Annual Review of Immunology* 31: 259-83.
- Mahabir, Roshan, Mishie Tanino, Aiman Elmansuri, Lei Wang, Taichi Kimura, Tamio Itoh, Yusuke Ohba, et al. 2014. « Sustained Elevation of Snail Promotes Glial-Mesenchymal Transition after Irradiation in Malignant Glioma ». *Neuro-Oncology* 16 (5): 671-85.
- Matusue, Eiji, James R. Fink, Jason K. Rockhill, Toshihide Ogawa, et Kenneth R. Maravilla. 2010. « Distinction between Glioma Progression and Post-Radiation Change by Combined Physiologic MR Imaging ». *Neuroradiology* 52 (4): 297-306.
- McKnight, Tracy Richmond. 2004. « Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Evaluation of Brain Tumor Metabolism ». *Seminars in Oncology, Brain Tumors*, 31 (5): 605-17.
- Mellanen, P., H. Minn, R. Grénman, et P. Härkönen. 1994. « Expression of Glucose Transporters in Head-and-Neck Tumors ». *International Journal of Cancer* 56 (5): 622-29.
- Miranda-Gonçalves, Vera, Mrinalini Honavar, Céline Pinheiro, Olga Martinho, Manuel M. Pires, Célio Pinheiro, Michelle Cordeiro, et al. 2013. « Monocarboxylate Transporters (MCTs) in Gliomas: Expression and Exploitation as Therapeutic Targets ». *Neuro-Oncology* 15 (2): 172-88.
- Mishima, K., T. G. Johns, R. B. Luwor, A. M. Scott, E. Stockert, A. A. Jungbluth, X. D. Ji, et al. 2001. « Growth Suppression of Intracranial Xenografted Glioblastomas Overexpressing Mutant Epidermal Growth Factor Receptors by Systemic Administration of Monoclonal Antibody (MAb) 806, a Novel Monoclonal Antibody Directed to the Receptor ». *Cancer Research* 61 (14): 5349-54.
- Miskimins, W. Keith, Hyun Joo Ahn, Ji Yeon Kim, Sun Ryu, Yuh-Seog Jung, et Joon Young Choi. 2014. « Synergistic Anti-Cancer Effect of Phenformin and Oxamate ». *PloS One* 9 (1): e85576.

Bibliographie

- Mukherjee, Joydeep, Joanna J. Phillips, Shichun Zheng, John Wiencke, Sabrina M. Ronen, et Russell O. Pieper. 2013. « Pyruvate Kinase M2 Expression, but Not Pyruvate Kinase Activity, Is up-Regulated in a Grade-Specific Manner in Human Glioma ». *PLoS One* 8 (2): e57610.
- Mukherjee, Purna, Tiernan J. Mulrooney, Jeremy Marsh, Derek Blair, Thomas C. Chiles, et Thomas N. Seyfried. 2008. « Differential effects of energy stress on AMPK phosphorylation and apoptosis in experimental brain tumor and normal brain ». *Molecular Cancer* 7 (1): 37.
- Nobusawa, Sumihito, Takuya Watanabe, Paul Kleihues, et Hiroko Ohgaki. 2009. « IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15 (19): 6002-7.
- Ohgaki, Hiroko, et Paul Kleihues. 2007. « Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma ». *The American Journal of Pathology* 170 (5): 1445-53.
- Ohgaki, Hiroko et Paul Kleihues. 2013. « The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma ». *Clinical Cancer Research* 19 (4): 764-72.
- O'Reilly, S. M., E. S. Newlands, M. G. Glaser, M. Brampton, J. M. Rice-Edwards, R. D. Illingworth, P. G. Richards, C. Kennard, I. R. Colquhoun, et P. Lewis. 1993. « Temozolomide: A New Oral Cytotoxic Chemotherapeutic Agent with Promising Activity against Primary Brain Tumours ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 29A (7): 940-42.
- Ostrom, Quinn T., Haley Gittleman, Paul Farah, Annie Ondracek, Yanwen Chen, Yingli Wolinsky, Nancy E. Stroup, Carol Kruchko, et Jill S. Barnholtz-Sloan. 2013. « CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010 ». *Neuro-Oncology* 15 Suppl 2 (novembre): ii1-56.
- Oudard, S., F. Arvelo, L. Miccoli, F. Apiou, A. M. Dutrillaux, M. Poisson, B. Dutrillaux, et M. F. Poupon. 1996. « High Glycolysis in Gliomas despite Low Hexokinase Transcription and Activity Correlated to Chromosome 10 Loss ». *British Journal of Cancer* 74 (6): 839-45.
- Palmieri, Diane, Daniel Fitzgerald, S. Martin Shreeve, Emily Hua, Julie L. Bronder, Robert J. Weil, Sean Davis, et al. 2009. « Analyses of Resected Human Brain Metastases of Breast Cancer Reveal the Association between Up-Regulation of Hexokinase 2 and Poor Prognosis ». *Molecular Cancer Research: MCR* 7 (9): 1438-45.
- Petrecca, Kevin, Marie-Christine Guiot, Valerie Panet-Raymond, et Luis Souhami. 2013. « Failure Pattern Following Complete Resection plus Radiotherapy and Temozolomide Is at the Resection Margin in Patients with Glioblastoma ». *Journal of Neuro-Oncology* 111 (1): 19-23.
- Pitter, Kenneth L., Ilaria Tamagno, Kristina Alikhanyan, Amira Hosni-Ahmed, Siobhan S. Pattwell, Shannon Donnola, Charles Dai, et al. 2016. « Corticosteroids compromise survival in glioblastoma ». *Brain* 139 (5): 1458-71.
- Pöpperl, Gabriele, Claudia Goetz, Walter Rachinger, Franz Josef Gildehaus, Joerg-Christian Tonn, et Klaus Tatsch. 2004. « Value of O-(2-[18F]fluoroethyl)- L-tyrosine PET for the diagnosis of recurrent glioma ». *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 31 (décembre): 1464-70.
- Prados, Michael D., Susan M. Chang, Nicholas Butowski, Rebecca DeBoer, Rupa Parvataneni, Hannah Carliner, Paul Kabuubi, et al. 2009. « Phase II Study of Erlotinib plus Temozolomide during and after Radiation Therapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme or Gliosarcoma ».

Bibliographie

- Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (4): 579-84.
- Qi, Songtao, Ye Song, Yuping Peng, Hao Wang, Hao Long, Xiaoli Yu, Zhiyong Li, et al. 2012. « ZEB2 Mediates Multiple Pathways Regulating Cell Proliferation, Migration, Invasion, and Apoptosis in Glioma ». *PLoS One* 7 (6): e38842.
- Rawat, Divya, Saurabh Kumar Chhonker, Rayees Ahmad Naik, Aditi Mehrotra, Surendra Kumar Trigun, et Raj Kumar Koiri. 2019. « Lactate as a Signaling Molecule: Journey from Dead End Product of Glycolysis to Tumor Survival ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 24: 366-81.
- Reardon, D. A., A. Omuro, A. A. Brandes, J. Rieger, A. Wick, J. Sepulveda, S. Phuphanich, et al. 2017. « OS10.3 Randomized Phase 3 Study Evaluating the Efficacy and Safety of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: CheckMate 143 ». *Neuro-Oncology* 19 (suppl_3): iii21-iii21.
- Ruan, Guo-Xiang, et Andrius Kazlauskas. 2013. « Lactate Engages Receptor Tyrosine Kinases Axl, Tie2, and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 to Activate Phosphoinositide 3-Kinase/Akt and Promote Angiogenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (29): 21161-72.
- Sabaa, Marwa, Hassan M. ELFayoumi, Shima Elshazly, Mahmoud Youns, et Waleed Barakat. 2017. « Anticancer Activity of Salicin and Fenofibrate ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 390 (10): 1061-71.
- Salas, Mónica, Patricia Obando, Lorena Ojeda, Paola Ojeda, Alejandra Pérez, Mauricio Vargas-Urbe, Coralia I. Rivas, Juan C. Vera, et Alejandro M. Reyes. 2013. « Resolution of the Direct Interaction with and Inhibition of the Human GLUT1 Hexose Transporter by Resveratrol from Its Effect on Glucose Accumulation ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 305 (1): C90-99.
- Schwartzentruber, Jeremy, Andrey Korshunov, Xiao-Yang Liu, David T. W. Jones, Elke Pfaff, Karine Jacob, Dominik Sturm, et al. 2012. « Driver Mutations in Histone H3.3 and Chromatin Remodelling Genes in Paediatric Glioblastoma ». *Nature* 482 (7384): 226-31.
- Semenza, G. L., P. H. Roth, H. M. Fang, et G. L. Wang. 1994. « Transcriptional Regulation of Genes Encoding Glycolytic Enzymes by Hypoxia-Inducible Factor 1. ». *Journal of Biological Chemistry* 269 (38): 23757-63.
- Shimizu, H., T. Kumabe, R. Shirane, et T. Yoshimoto. 2000. « Correlation between Choline Level Measured by Proton MR Spectroscopy and Ki-67 Labeling Index in Gliomas ». *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 21 (4): 659-65.
- Soeda, A., M. Park, D. Lee, A. Mintz, A. Androutsellis-Theotokis, R. D. McKay, J. Engh, et al. 2009. « Hypoxia Promotes Expansion of the CD133-Positive Glioma Stem Cells through Activation of HIF-1alpha ». *Oncogene* 28 (45): 3949-59.
- SongTao, Qi, Yu Lei, Gui Si, Ding YanQing, Han HuiXia, Zhang XueLin, Wu LanXiao, et Yao Fei. 2012. « IDH Mutations Predict Longer Survival and Response to Temozolomide in Secondary Glioblastoma ». *Cancer Science* 103 (2): 269-73.
- Stummer, Walter, Uwe Pichlmeier, Thomas Meinel, Otmar Dieter Wiestler, Friedhelm Zanella, Hans-Jürgen Reulen, et ALA-Glioma Study Group. 2006. « Fluorescence-Guided Surgery with 5-Aminolevulinic

Bibliographie

- Acid for Resection of Malignant Glioma: A Randomised Controlled Multicentre Phase III Trial ». *The Lancet. Oncology* 7 (5): 392-401.
- Stupp, Roger, Warren P. Mason, Martin J. van den Bent, Michael Weller, Barbara Fisher, Martin J. B. Taphoorn, Karl Belanger, et al. 2005. « Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma ». *The New England Journal of Medicine* 352 (10): 987-96.
- Stupp, Roger, Sophie Taillibert, Andrew Kanner, William Read, David M. Steinberg, Benoit Lhermitte, Steven Toms, et al. 2017. « Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma ». *JAMA* 318 (23): 2306-16.
- Stupp, Roger, Eric T. Wong, Andrew A. Kanner, David Steinberg, Herbert Engelhard, Volkmar Heidecke, Eilon D. Kirson, et al. 2012. « NovoTTF-100A versus Physician's Choice Chemotherapy in Recurrent Glioblastoma: A Randomised Phase III Trial of a Novel Treatment Modality ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 48 (14): 2192-2202.
- Suh, Chong Hyun, Ho Sung Kim, Seung Chai Jung, Choong Gon Choi, et Sang Joon Kim. 2018. « Perfusion MRI as a Diagnostic Biomarker for Differentiating Glioma from Brain Metastasis: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *European Radiology* 28 (9): 3819-31.
- Sun, Yiming, Zhe Liu, Xue Zou, Yadong Lan, Xiaojin Sun, Xiu Wang, Surong Zhao, Chenchen Jiang, et Hao Liu. 2015. « Mechanisms underlying 3-bromopyruvate-induced cell death in colon cancer ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 47 (4): 319-29.
- Taal, Walter, Dieta Brandsma, Hein G. de Bruin, Jacoline E. Bromberg, Annemarie T. Swaak-Kragten, Peter A. E. Sillevius Smitt, Corine A. van Es, et Martin J. van den Bent. 2008. « Incidence of Early Pseudo-Progression in a Cohort of Malignant Glioma Patients Treated with Chemoradiation with Temozolomide ». *Cancer* 113 (2): 405-10.
- Thomas, Tom M., et John S. Yu. 2017. « Metabolic Regulation of Glioma Stem-like Cells in the Tumor Micro-Environment ». *Cancer Letters* 408: 174-81.
- Tsien, Christina, Jennifer Moughan, Jeff M. Michalski, Mark R. Gilbert, James Purdy, Joseph Simpson, John J. Kresel, Walter J. Curran, Aidnag Diaz, et Minesh P. Mehta. 2009. « Phase I Three-Dimensional Conformal Radiation Dose Escalation Study in Newly Diagnosed Glioblastoma: Radiation Therapy Oncology Group Trial 98-03 ». *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 73 (3): 699-708.
- Vardjan, Nina, Helena H. Chowdhury, Anemari Horvat, Jelena Velebit, Maja Malnar, Marko Muhič, Marko Kreft, et al. 2018. « Enhancement of Astroglial Aerobic Glycolysis by Extracellular Lactate-Mediated Increase in CAMP ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11.
- Végran, Frédérique, Romain Boidot, Carine Michiels, Pierre Sonveaux, et Olivier Feron. 2011a. « Lactate Influx through the Endothelial Cell Monocarboxylate Transporter MCT1 Supports an NF-KB/IL-8 Pathway That Drives Tumor Angiogenesis ». *Cancer Research* 71 (7): 2550-60.
- Verhaak, Roel G. W., Katherine A. Hoadley, Elizabeth Purdom, Victoria Wang, Yuan Qi, Matthew D. Wilkerson, C. Ryan Miller, et al. 2010. « Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1 ». *Cancer Cell* 17 (1): 98-110.

Bibliographie

- Warburg, Otto, Franz Wind, et Erwin Negelein. 1927. « THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY ». *The Journal of General Physiology* 8 (6): 519-30.
- Wen, Patrick Y., David R. Macdonald, David A. Reardon, Timothy F. Cloughesy, A. Gregory Sorensen, Evanthia Galanis, John Degroot, et al. 2010. « Updated Response Assessment Criteria for High-Grade Gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology Working Group ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (11): 1963-72.
- Wolf, Amparo, Sameer Agnihotri, Johann Micallef, Joydeep Mukherjee, Nesrin Sabha, Rob Cairns, Cynthia Hawkins, et Abhijit Guha. 2011. « Hexokinase 2 Is a Key Mediator of Aerobic Glycolysis and Promotes Tumor Growth in Human Glioblastoma Multiforme ». *The Journal of Experimental Medicine* 208 (2): 313-26.
- Wu, Gang, Alberto Broniscer, Troy A. McEachron, Charles Lu, Barbara S. Paugh, Jared Becksfort, Chunxu Qu, et al. 2012. « Somatic Histone H3 Alterations in Pediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas and Non-Brainstem Glioblastomas ». *Nature Genetics* 44 (3): 251-53.
- Xu, Xingbo, Xiaoying Tan, Björn Tampe, Elisa Sanchez, Michael Zeisberg, et Elisabeth M. Zeisberg. 2015. « Snail Is a Direct Target of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF1 α) in Hypoxia-Induced Endothelial to Mesenchymal Transition of Human Coronary Endothelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (27): 16653-64.
- Yan, Hai, D. Williams Parsons, Genglin Jin, Roger McLendon, B. Ahmed Rasheed, Weishi Yuan, Ivan Kos, et al. 2009. « IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas ». *New England Journal of Medicine* 360 (8): 765-73.
- Yanada, Masamitsu, Jin Takeuchi, Isamu Sugiura, Hideki Akiyama, Noriko Usui, Fumiharu Yagasaki, Tohru Kobayashi, et al. 2006. « High Complete Remission Rate and Promising Outcome by Combination of Imatinib and Chemotherapy for Newly Diagnosed BCR-ABL-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: A Phase II Study by the Japan Adult Leukemia Study Group ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (3): 460-66.
- Yang, Muh-Hwa, et Kou-Juey Wu. 2008. « TWIST Activation by Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1): Implications in Metastasis and Development ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (14): 2090-96.
- Zhang, Ying, Collin Dube, Myron Gibert, Nichola Cruickshanks, Baomin Wang, Maeve Coughlan, Yanzhi Yang, et al. 2018. « The P53 Pathway in Glioblastoma ». *Cancers* 10 (9).
- Zhao, Shiguang, Huailei Liu, Yaohua Liu, Jianing Wu, Chunlei Wang, Xu Hou, Xiaofeng Chen, et al. 2013. « MiR-143 Inhibits Glycolysis and Depletes Stemness of Glioblastoma Stem-like Cells ». *Cancer Letters* 333 (2): 253-60.
- Zhu, Jianning, Zhixin Huang, Mengzhao Zhang, Weiyi Wang, Hua Liang, Jin Zeng, Kaijie Wu, et al. 2018. « HIF-1 α promotes ZEB1 expression and EMT in a human bladder cancer lung metastasis animal model ». *Oncology Letters* 15 (3): 3482-89.

TITRE DE LA THESE : La glycolyse favorise la migration des cellules tumorales dans le glioblastome

AUTEUR : Mané Ndiaye

RESUME :

L'effet Warburg, classique dans les cancers s'observe également dans le glioblastome. Ce phénomène, via l'acidification du milieu tumoral favorise la migration de certaines cellules cancéreuses.

Nous avons émis l'hypothèse qu'une glycolyse augmentée dans le glioblastome pouvait favoriser les capacités de migration de certaines cellules tumorales pouvant être à l'origine de la récurrence tumorale.

Nous avons donc évalué la capacité de glycolyse de différentes lignées humaines cellulaires de glioblastomes avec l'automate Seahorse, mesurant l'acidité dans le milieu de culture extracellulaire. La capacité de migration des cellules tumorales était mesurée avec un test de cicatrization du tapis cellulaire. L'étude de l'expression des gènes impliqués dans la glycolyse (PKM2 et LDHA) et la migration cellulaire (ZEB1, ZEB2, SNAIL, TWIST) a été réalisée par PCR avec ou sans traitement inhibant la glycolyse.

Parmi nos lignées humaines de glioblastomes, U118-MG présentait la glycolyse la plus élevée et LN229 l'une des glycolyses les plus faibles. U118-MG exprimait fortement les gènes impliqués dans la glycolyse et dans la migration cellulaire et avait une capacité de migration supérieure à LN229 sur le test de cicatrization du tapis cellulaire. Lorsque les cellules de la lignée U118-MG étaient traitées par un inhibiteur de PKM2 (fénofibrate) ou de LDHA (acide oxamique), elles migraient moins. Lorsque les cellules de la lignée LN229 étaient traitées avec du lactate, elles migraient de manière significativement plus importante et présentaient une expression accrue des gènes impliqués dans la migration cellulaire.

La glycolyse dans le glioblastome est positivement corrélée à la capacité de migration des cellules tumorales. Ce mécanisme semble être médié par le lactate comme démontré dans l'adénocarcinome du pancréas. Il serait intéressant de compléter ce travail par des expériences *in vivo*, permettant une meilleure prise en compte de l'environnement tumoral.

La glycolyse apparaît comme une cible thérapeutique adjuvante intéressante dans le glioblastome et pourrait potentiellement limiter la survenue de récurrences dans cette tumeur très agressive.

MOTS-CLES : Glioblastome, Glycolyse, Migration