



**HAL**  
open science

# Hétérogénéité métabolique des gliomes : apport de la spectroscopie RMN HRMAS

Caroline Bund

► **To cite this version:**

Caroline Bund. Hétérogénéité métabolique des gliomes : apport de la spectroscopie RMN HRMAS. Cancer. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ011 . tel-03450173

**HAL Id: tel-03450173**

**<https://theses.hal.science/tel-03450173v1>**

Submitted on 25 Nov 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*  
UMR 7357

**THÈSE** présentée par :  
**Caroline BUND**

soutenu le : **16 mars 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences médicales

**Hétérogénéité métabolique des gliomes :  
apport de la spectroscopie RMN HRMAS**

**THÈSE dirigée par :**

**Pr NAMER Izzie Jacques**

Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Pr LAPRIE Anne**

Université de Toulouse

**Pr MESNARD François**

Université de Picardie

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Pr HEGI Monika**

Université de Lausanne

**Pr KRAEBER-BODÉRE Françoise**

Université de Nantes

**Pr PIVOT Xavier**

Université de Strasbourg

## REMERCIEMENTS

M. le Pr Izzie Jacques NAMER

Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail sous votre direction. Votre disponibilité, votre écoute et votre précieux soutien au quotidien m'ont permis d'effectuer cette thèse. Je vous remercie de la confiance que vous m'accordez. Je suis ravie de pouvoir poursuivre nos recherches et sollicite la poursuite de mon abonnement café.

Mme le Pr Anne LAPRIE, M. le Pr François MESNARD, Mme le Pr Monika HEGI et Mme le Pr Françoise KRAEBER-BODÉRE

Vous me faites l'honneur d'examiner ce travail. Je vous remercie d'avoir consacré de votre temps pour participer à ce jury.

Soyez assurés de toute ma reconnaissance.

M. le Pr Xavier PIVOT

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury de thèse. Je vous remercie de nous faire bénéficier de votre expérience en oncologie.

Soyez assuré de toute ma reconnaissance.

Mme Hassiba OUTILAFI

Merci de ton aide durant cette thèse, de ta gentillesse et de ton soutien. À notre « *team <sup>13</sup>C* », qu'elle puisse avoir un bel avenir.

M. le Dr Martial PIOTTO

Merci de votre patience et de vos conseils avisés pour optimiser ! Soyez assuré de toute ma reconnaissance et de toute mon amitié.

Mme Éliane RUHLAND

Merci de ton aide pour le passage des nombreux échantillons de biopsies et encore bravo pour la « *database* ».

Mme le Pr Monique DONTENWILL et Mme le Pr Natacha ENTZ-WERLÉ

Merci de nous avoir permis de réaliser nos cultures cellulaires. Au plaisir de poursuivre notre collaboration pour nos travaux futurs.

M. le Pr François PROUST et toute l'équipe de neurochirurgie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Merci de votre collaboration indispensable à la réalisation de ce travail.

Soyez assuré de mon profond respect.

Mme le Pr Marie-Pierrette CHENARD et M. le Dr Benoît LHERMITTE

Merci de nous faire partager votre expérience d'anatomo-pathologistes.

Soyez assurés de mon profond respect.

M. le Pr Michel DE MATHELIN

Merci d'avoir soutenu et jugé ce travail lors de ma mi-thèse. Soyez assuré de mon profond respect.

À tous mes collègues de médecine nucléaire

Merci de votre soutien au quotidien et en particulier merci à M. le Dr Cyrille BLONDET qui m'a fait bénéficier de ses talents littéraires.

Mme le Dr Laura HARSAN

Merci de ton soutien.

Ça y est, je suis bientôt disponible pour notre future collaboration !

Mme Béatrice GIROZ et Mme Mylène LESAGE

Comment vous oublier ! Des secrétaires au top ! Merci de votre amitié.

M. le Dr Philippe BALTZINGER

Merci à toi cher confrère, mais néanmoins ami, pour ta relecture finale.

## Table des matières

1. Introduction .....	14
1.1. Un peu d'histoire.....	15
1.2. Les gliomes : un modèle d'hétérogénéité tumorale.....	16
1.2.1. Aspects clinico-biologiques.....	17
1.2.2. Imagerie des gliomes .....	24
1.2.3. Prise en charge thérapeutique.....	33
1.3. Métabolisme cellulaire et cancer .....	37
1.3.1. Énergétique de la cellule vivante.....	40
1.3.2. Production de biomasse.....	56
1.3.3. Rôle du microenvironnement .....	63
1.3.4. Cibles métaboliques pour la thérapie.....	66
1.4. Comment étudier le métabolisme ? .....	72
1.4.1. Métabolomique.....	73
1.4.2. Analyse des flux métaboliques.....	74
2. Objectifs .....	76
3. Matériels et méthodes.....	78
3.1. Analyse RMN HRMAS.....	79
3.1.1. Équipements .....	79
3.1.2. Séquences utilisées .....	80
3.1.3. Pré et post traitement spectral.....	96
3.1.4. Identification .....	96
3.1.5. Quantification.....	97
3.1.6. Analyses statistiques.....	98
3.2. Prélèvement et conservation des échantillons .....	101
3.3. Contrôle histologique des échantillons.....	101
3.4. Biologie moléculaire .....	101
3.5. Solutions de métabolites purs.....	103
3.6. Cultures cellulaires .....	105
3.6.1. Protocole de passage des cultures cellulaires et mise en insert .....	105
3.6.2. Étude de faisabilité .....	108
3.6.3. Étude de densité.....	109
3.6.4. Étude cinétique .....	109
4. Résultats et discussion.....	113

4.1. Étude de l'hétérogénéité métabolique des oligodendrogliomes : corrélation génomique, métabolomique et survie .....	114
4.2. Hétérogénéité métabolique des gliomes : relation entre le profil métabolique et l'imagerie fonctionnelle par TEP au <sup>18</sup> F-FDG .....	117
4.3. Utilisation de sondes moléculaires pour l'analyse des voies énergétiques ( <sup>13</sup> C-glucose, <sup>13</sup> C-glutamine).....	121
4.3.1. Mise au point sur des solutions de métabolites purs .....	121
4.3.2. Mise au point sur des cultures cellulaires .....	131
4.3.3. Mise au point sur des xénogreffes .....	153
5. Défis et perspectives.....	155
6. Bibliographie .....	159
7. Annexes .....	175

## ABRÉVIATIONS

2-HG : 2-hydroxyglutarate  
Ace : acétate  
ACLY : ATP citrate lyase  
ACP : analyse en composantes principales  
ADEMA: Algorithm to Determine Expected Metabolite level Alterations  
AKT ou PKB : protéine kinase B  
Ala : alanine  
ATRX: Alpha-Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked  
AVC : accident vasculaire cérébral  
CCNU : lomustine  
CDK : cyclin-dependent kinase  
Cho : choline  
CPMG : Carr-Purcell-Meiboom-Gill  
Cr : créatine  
CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 ou antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique  
DCE-MRI : Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DSC-MRI : Dynamic Susceptibility Contrast Magnetic Resonance Imaging  
DW-MRI : Diffusion Weighted Magnetic Resonance Imaging  
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor  
EORTC : European Organisation for Research and Treatment of Cancer  
FDG : <sup>18</sup>F -Fluorodéoxyglucose  
FDOPA : <sup>18</sup>F -Fluorodopa  
FET : O-2- <sup>18</sup>F-fluoroethyl-L-tyrosine  
FGFR3 : Fibroblast Growth Factor Receptor 3  
FID : Free Induction Decay  
FLAIR : Fluid Attenuated Inversion Recovery  
FLT : <sup>18</sup>F-fluoro-L-thymidine  
FMISO : <sup>18</sup>F-misonidazole  
GBM : glioblastome  
GLUT : GLUcose Transporter  
Gly : glycine  
GPCho/GPC : glycérophosphocholine  
GSH : glutathion  
HE : Hématoxyline-Eosine  
HIF-1 $\alpha$  : Hypoxia-Inducible Factor-1  
HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation  
HRMAS : High Resolution Magic Angle Spinning  
HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation  
IDH : Isocitrate déshydrogénase  
IRM : imagerie par résonance magnétique nucléaire  
J-RES : 2D J-RESolved correlation experiment  
KDM : histone lysine déméthylase  
Lac : lactate  
LAT : Large neutral Amino acid Transporter  
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization  
MET : <sup>11</sup>C-méthyl-méthionine  
MGMT : O<sub>6</sub>-méthylguanine-DNA-méthyl-transférase

MMTV-LTR : Mouse mammary tumor virus - terminal repeat  
 mTOR : mechanistic target of rapamycin  
 NAA : N-Acetyl-Aspartate  
 NADH : nicotinamide adénine dinucléotide  
 NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
 NCCN : National Comprehensive Cancer Network  
 NCIC : National Cancer Institute of Canada  
 NFAT1/FasL : nuclear factor of activated T cells/Fas ligand  
 OCT : Organic Cation Transporters  
 OG : oligodendrogliome  
 OXPHOS : Oxydative Phosphorylation  
 PARP : poly(ADP-ribose) polymérase  
 PBS : Tampon Phosphate Salin  
 PCho/PC : phosphocholine  
 PCV : procarbazine et vincristine  
 PD-1 : Programmed cell death 1  
 PDGF : Platelet Derived Growth Factor  
 PDK1 : Phosphoinositide-dependent protein kinase 1  
 PD-L1 : Programmed death-ligand 1  
 PEP : phosphoénolpyruvate  
 PHD : prolyl hydroxylases  
 PHGDH : phosphoglycérate déshydrogénase  
 Pi3K : phosphoinositide 3-kinase  
 PLS-DA : Partial Least Square – Discriminant Analysis  
 POCE : Proton-Observed Carbon-Editing  
 PPP : Pentose Phosphate Pathway (voie des pentoses phosphates)  
 PTEN : Phosphatase and TENsin homolog  
 PyMT-MMTV : polyomavirus middle T-antigen - Mouse mammary tumor virus  
 RANO : Response Assessment in Neuro Oncology  
 rCBF : relative Cerebral Blood Flow  
 rCBV : relative Cerebral Blood Volume  
 RF: radio-fréquence  
 RMN : résonance magnétique nucléaire  
 ROS : espèces réactives de l'oxygène  
 RTOG : RadiationTherapy Oncology Group  
 SHMT : sérine hydroxyméthyltransférase  
 SOD1 : superoxyde dismutase 1  
 SREBP : Sterol regulatory element-binding proteins  
 SVF : Sérum de veau fœtal  
 TCA : cycle de l'acide tricarboxylique  
 TEP: tomographie par émission de positons  
 THF : tétrahydrofolate  
 TOCSY : TOfal Correlated SpectroscopY  
 TP53 : tumor protein 53  
 VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
 $\alpha$ -KG :  $\alpha$ -cétoglutarate

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Extrait de la classification de WHO 2016 (13).....	19
Figure 2 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant la survie des patients avec des gliomes de bas grade et de haut grade A) selon le type histologique classique et B) selon le statut mutationnel IDH et la codéletion 1p19q (18).....	20
Figure 3 : Imagerie multimodale et «-omiques », d'après Lambin <i>et al.</i> (46).....	24
Figure 4 : Imagerie IRM d'un glioblastome temporal gauche en séquence FLAIR A) et après injection de gadolinium B). ....	26
Figure 5 : Un cas de récurrence d'oligodendrogliome de haut grade : hétérogénéité de fixation en FDG avec une plage hypométabolique et une plage hypermétabolique, alors que la TEP à la FDOPA montre une augmentation globale du métabolisme des acides aminés de l'ensemble de la tumeur.....	28
Figure 6 : Cas d'oligodendrogliome de l'hippocampe droit et cas de glioblastome frontopariétal gauche avec IRM (image pondérée T1 gadolinium (A, E) ; image FLAIR (B, F)), image de fusion TEP/IRM (C, G), TEP à la FDOPA (D), d'après Bund <i>et al.</i> (53).....	30
Figure 7 : Patient suivi pour un oligodendrogliome opéré. La cavité d'exérèse correspond aux pointillés blancs, les flèches rouges visibles sur l'IRM correspondent aux prises de contraste. Sur la TEP au <sup>18</sup> F-FDG, on constate une augmentation du métabolisme du glucose dans la partie postérieure de la tumeur et sur la TEP à la <sup>18</sup> F-FGlutamine une augmentation du métabolisme de la glutamine en pré- et rétro-tumoral, signant l'hétérogénéité de la tumeur sur le plan métabolique, d'après Venneti <i>et al.</i> (72). ....	31
Figure 8 : Un cas de glioblastome en IRM après injection de gadolinium et en TEP au FDG, à la MET et à la FLT, d'après Jacobs <i>et al.</i> (81). ....	31
Figure 9 : Cas de récurrence de glioblastome : IRM après injection de gadolinium montrant des prises de contraste hétérogènes A), la TEP au FDG qui présente une hypofixation B) et la TEP à la FCholine qui montre une augmentation du métabolisme de la choline C), d'après Tan <i>et al.</i> (84). ....	32
Figure 10 : Cas de glioblastome multifocal. L'IRM montre une prise de contraste pour les deux contingents tumoraux. Le contingent en a) est « FMISO-négatif » et le contingent en b) est « FMISO-positif » en corrélation avec les résultats de l'anatomo-pathologie montrant l'hétérogénéité de la tumeur, d'après Toyonaga <i>et al.</i> (85). ....	33
Figure 11 : Cibles thérapeutiques potentielles dans les cancers, d'après Hanahan et Weinberg (1) (2).35	
Figure 12 : Schéma simplifié des modifications métaboliques observées dans les cancers, d'après Armitage <i>et al.</i> (107). ....	39
Figure 13 : Représentation schématique des différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie (effet Warburg), d'après Vander Heiden (118).....	43
Figure 14 : Coordination entre le cycle TCA et OXPHOS, d'après Martinez-Reyes et Chandel (130).47	
Figure 15 : Influence du cycle TCA sur la chromatine et la méthylation de l'ADN, d'après Martinez-Reyes et Chandel (130).....	49
Figure 16 : Structure biochimique de la glutamine, d'après Zhang <i>et al.</i> (147).....	54
Figure 17 : La glutamine est donneuse d'azotes et de carbones pour différentes réactions de biosynthèse, d'après Zhang <i>et al.</i> (147).....	54
Figure 18 : Biosynthèse de sérine, d'après Amelio <i>et al.</i> (166). ....	58
Figure 19 : Le métabolisme monocarboné d'après Amelio <i>et al.</i> (166).....	60

Figure 20 : La membrane, modèle de la « mosaïque fluide », d'après Singer <i>et al.</i> (169) ; issu de <i>biologie-enligne.univ-lille.fr</i> .....	61
Figure 21 : Conséquences de l'hypoxie sur le métabolisme cellulaire et sur les voies de signalisation, d'après Eales <i>et al.</i> (180).....	64
Figure 22 : Régulation de HIF-1 $\alpha$ par l'oxygène, d'après Hasmim <i>et al.</i> (182).....	65
Figure 23 : Sensibilité des différentes techniques. ....	72
Figure 24 : Avantage d'une rotation à l'angle magique en RMN HRMAS. ....	79
Figure 25 : Spectromètre Bruker 500 MHz, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg A) et connectique de la sonde RMN HRMAS triple résonance : canal $^1\text{H}$ , canal $^{13}\text{C}$ , canal $^{31}\text{P}$ et canal $^2\text{H}$ pour le « lock ». On trouve également la connectique pour les différents réglages : angle magique, antennes RF, chauffage et gradient B). ....	80
Figure 26 : Protocole d'acquisition d'une séquence CPMG pour les solutions de métabolites purs. ...	81
Figure 27 : Séquence CPMG enregistrée sur une solution pure de lactate. Multiplicité du pic du lactate avec un quadruplet à 4,12 ppm.....	83
Figure 28 : Séquence d'impulsion CPMG découplée $^{13}\text{C}$ . ....	84
Figure 29 : Les satellites du $^{13}\text{C}$ en RMN du $^1\text{H}$ dans la molécule de lactate. Les différents motifs du groupement $-\text{CH}_3$ à 1,33 ppm sont présentés : absence de marquage au $^{13}\text{C}$ A) ; C-3 ou C-2 marqué : mise en évidence de 2 doublets satellites équidistants du doublet non marqué B) : C-3 et C-2 marqués: mise évidence de 2 doublets dédoublés de part et d'autre du doublet non marqué C) ; si le lactate est marqué uniformément, mise en évidence de 2 doublets de doublet dédoublés de part et d'autre du doublet non marqué D) ; exemple du glucose uniformément marqué qui se transforme en lactate uniformément marqué <i>via</i> la glycolyse E), d'après Fan et Lane (207).....	85
Figure 30 : Séquence d'impulsion POCE.....	85
Figure 31 : Séquences d'impulsion POCE 40 et 42. ....	86
Figure 32 : Protocole d'acquisition d'une séquence POCE 40 pour une solution de métabolites purs. ....	87
Figure 33 : Protocole d'acquisition d'une séquence POCE 42 pour une solution de métabolites purs. ....	87
Figure 34 : Protocole d'acquisition de la séquence ZGPR pour une solution de métabolites purs. ....	88
Figure 35 : Séquence d'impulsion HSQC-1D. ....	89
Figure 36 : Séquence HSQC classique. Détection du $^1\text{H}$ avec découplage $^{13}\text{C}$ (d'après S. Akoka, Université de Nantes). ....	90
Figure 37 : Séquence HSQC-2D enregistrée sur une solution pure de lactate. ....	91
Figure 38 : Séquence HSQC-2D enregistrée sur une solution pure de lactate (zoom).....	91
Figure 39 : Séquence HSQC-2D, $^{13}\text{C}_6$ -glucose. Glutathion (en vert) / Alanine (en violet) / Glutamate (en orange).....	92
Figure 40 : Séquence HSQC-HR du lactate et marquage du lactate (le cercle rouge plein correspondant au $^{13}\text{C}$ marqué).....	93
Figure 41 : Protocole d'acquisition de la séquence HMBC. ....	94
Figure 42 : Séquence HMBC du lactate et marquage du lactate (le cercle rouge plein correspondant au $^{13}\text{C}$ marqué). À 1,33 ppm on observe le $^1\text{H}$ du groupement $\text{CH}_3$ . Le déplacement chimique en F1 est de 185 ppm correspondant donc au groupement carbone du carbonyle (3) qui est marqué et qui couple avec le $^1\text{H}$ du $\text{CH}_3$ (flèche bleue). En F1, la constante de couplage $J_{^{13}\text{C}-^{13}\text{C}}$ est égale à 63 Hz : il s'agit donc d'un couplage entre le carbone du carbonyle et son carbone voisin (2) qui est alors marqué (on observe un doublet déformé, en lien avec des distorsions). ....	95
Figure 43 : Table des déplacements chimiques du carbone 13 (d'après S.Akoka). ....	97
Figure 44 : Principe d'ADEMA, d'après Cicek <i>et al.</i> (215).....	100

Figure 45 : Du haut vers le bas : séquence POCE 40 qui montre les <sup>12</sup> C et les <sup>13</sup> C, séquence POCE 42 qui montre les <sup>13</sup> C, soustraction des 2 précédentes puis découplage permettant de visualiser les <sup>12</sup> C.	104
Figure 46 : Protocole de réalisation de l'étude de faisabilité. ....	108
Figure 47 : Protocole de l'étude de densité. ....	109
Figure 48 : L'analyse de réseau montre l'association entre le niveau d'accumulation des métabolites dans les oligodendrogliomes et la présence de la mutation IDH1 A) et de la mutation PTEN B). Les métabolites soulignés et écrits en rouge et vert avec une flèche indiquent, respectivement, les métabolites qui devraient augmenter et diminuer. Les métabolites en bleu sont présents dans la mitochondrie.....	115
Figure 49 : Comparaison des taux de survie entre des groupes de patients avec différents statuts de marqueurs génomiques (A) IDH1, B) 1p19q, C) MGMT, D) PTEN, E) EGFR, F) TP53) mesurés dans les tissus tumoraux. La survie en présence de la mutation est représentée par des lignes noires pour les aberrations génomiques associées à un bon pronostic et par des lignes rouges pour les aberrations génomiques associées à un mauvais pronostic. ....	116
Figure 50 : Comparaison des taux de survie entre des groupes de patients présentant différents niveaux d'accumulation de six métabolites (A) 2HG, B) Sérine, C) Glycine, D) GPC/PC, E) Alanine, F) Glutamate) mesurés dans les tissus tumoraux. ....	117
Figure 51 : Analyse de réseau entre les gliomes de haut grade à faible captation de FDG par rapport aux gliomes de haut grade à forte captation de FDG. Les métabolites soulignés et écrits en rouge et bleu avec une flèche pour chacun d'eux indiquent respectivement les métabolites qui augmentent et diminuent dans les gliomes de haut grade avec une faible captation de FDG. Les métabolites en orange sont présents dans les mitochondries.....	118
Figure 52 : Trois cas représentatifs d'astrocytomes : deux patterns métaboliques différents de glioblastomes (le premier avec une faible captation de FDG et le second avec une forte captation de FDG) par rapport à un astrocytome de bas grade (3ème cas). Pour chacun d'eux : coupes transversales IRM FLAIR (A) et après injection de gadolinium (B), TEP au FDG (C), TEP à la FDOPA (D) et RMN HRMAS (E). Les spectres RMN HRMAS montrent un rapport GPC/PC clairement inversé, une augmentation de la glycine (Gly), une diminution des taux de créatine (Cr) et de myoinositol (mI) dans le glioblastome avec une faible captation du FDG (premier cas). Les niveaux d'acétate (Ace), d'alanine (Ala), de lactate (Lac) et de choline (Cho) restent similaires. L'astérisque (*) indique une contamination à l'éthanol.....	119
Figure 53 : Trois cas représentatifs d'oligodendrogliomes : deux patterns métaboliques différents d'oligodendrogliomes de haut grade (le premier avec une faible captation de FDG et le second avec une forte captation de FDG) par rapport aux oligodendrogliomes de bas grade (3ème cas). Pour chacun d'eux : coupes transversales IRM FLAIR (A) et après injection de gadolinium (B), TEP au FDG (C), TEP à la FDOPA (D) et les résultats de la RMN HRMAS (E). Les spectres RMN HRMAS montrent, comme dans les cas de glioblastome, un rapport GPC/PC inversé, une augmentation des niveaux de glycine (Gly) et une diminution des niveaux de créatine (Cr) dans les oligodendrogliomes de haut grade à faible captation du FDG (premier cas). Les taux d'acétate (Ace), d'alanine (Ala), de lactate (Lac), de myoinositol (mI) et de choline (Cho) demeurent similaires. ....	120
Figure 54 : Pourcentage de <sup>13</sup> C et de <sup>12</sup> C estimé pour les différentes séquences réalisées pour l'alanine A) à 1,48 ppm et B) à 3,78 ppm. ....	122
Figure 55 : Pourcentage de <sup>13</sup> C et de <sup>12</sup> C estimé pour les différentes séquences réalisées pour la glycine à 3,55 ppm. ....	123

Figure 56 : Pourcentage de $^{13}\text{C}$ et de $^{12}\text{C}$ estimé pour les différentes séquences réalisées pour l'acétate à 1,92 ppm. ....	123
Figure 57 : Pourcentage de $^{13}\text{C}$ et de $^{12}\text{C}$ estimé pour les différentes séquences réalisées pour le glucose A) à 3,2 ppm et B) à 4,6 ppm. ....	124
Figure 58 : Pourcentage de $^{13}\text{C}$ et de $^{12}\text{C}$ estimé pour les différentes séquences réalisées pour la glutamine A) à 2,13 ppm, B) à 2,45 ppm et C) à 3,78 ppm. ....	125
Figure 59 : Pourcentage de $^{13}\text{C}$ et de $^{12}\text{C}$ estimé pour les différentes séquences réalisées pour le glutamate A) à 2,09 ppm, B) à 2,34 ppm et C) à 3,76 ppm.....	126
Figure 60 : Pourcentage de $^{13}\text{C}$ et de $^{12}\text{C}$ estimé pour les différentes séquences réalisées pour l'aspartate à 3,89 ppm. ....	127
Figure 61 : Pourcentage de $^{13}\text{C}$ et de $^{12}\text{C}$ estimé pour les différentes séquences réalisées pour le lactate A) à 1,33 ppm et B) à 4,12 ppm. ....	128
Figure 62 : Pourcentage de $^{13}\text{C}$ et de $^{12}\text{C}$ estimé pour les différentes séquences réalisées pour le mélange glutamine/glycine.....	129
Figure 63 : Pourcentage de $^{13}\text{C}$ et de $^{12}\text{C}$ estimé pour les différentes séquences réalisées pour le mélange glutamine/glutamate.....	130
Figure 64 : Séquences HSQC-1D pour le glucose froid <i>versus</i> glucose marqué au $^{13}\text{C}$ et pour la glutamine froide <i>versus</i> glutamine marquée au $^{13}\text{C}$ .....	131
Figure 65 : Identification sur la séquence HSQC-1D avec du $^{13}\text{C}_6$ -glucose. On visualise les $^1\text{H}$ portés par les $^{13}\text{C}$ . ....	132
Figure 66 : Glucose froid avec $5 \cdot 10^6$ cellules et $1 \cdot 10^6$ cellules A) et glucose marqué au $^{13}\text{C}$ avec $5 \cdot 10^6$ cellules et $1 \cdot 10^6$ cellules B). ....	134
Figure 67 : Étude cinétique 1 avec spectres HSQC-1D obtenus à $t=2\text{h}$ , $t=4\text{h}$ , $t=6\text{h}$ , $t=24\text{h}$ et $t=48\text{h}$ . ....	135
Figure 68 : Évolution de la concentration de métabolites marqués au $^{13}\text{C}$ dans le milieu A) et les cellules B).....	136
Figure 69 : Étude cinétique 2 avec spectres HSQC-1D obtenus à $t=2\text{h}$ , $t=6\text{h}$ , $t=24\text{h}$ et $t=48\text{h}$ avec le $^{13}\text{C}_6$ -glucose en normoxie A) et en hypoxie B). ....	138
Figure 70 : Étude cinétique 2 avec spectres HSQC-1D obtenus à $t=2\text{h}$ , $t=6\text{h}$ , $t=24\text{h}$ et $t=48\text{h}$ avec la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en normoxie A) et en hypoxie B). ....	139
Figure 71 : Séquences POCE 40 et 42 pour le $^{13}\text{C}_6$ -glucose en normoxie. ....	140
Figure 72 : Séquences POCE 40 et 42 pour le $^{13}\text{C}_6$ -glucose en hypoxie. ....	141
Figure 73 : Séquences POCE 40 et 42 pour la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en normoxie.....	142
Figure 74 : Séquences POCE 40 et 42 pour la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en hypoxie. ....	143
Figure 75 : Représentation du marquage cellulaire, sur le schéma métabolique simplifié, des résultats du marquage au $^{13}\text{C}_6$ -glucose en normoxie. ....	145
Figure 76 : Représentation du marquage cellulaire, sur le schéma métabolique simplifié, des résultats du marquage au $^{13}\text{C}_6$ -glucose en hypoxie.....	147
Figure 77 : Représentation du marquage cellulaire, sur le schéma métabolique simplifié, des résultats du marquage à la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en normoxie.....	149
Figure 78 : Représentation du marquage cellulaire, sur le schéma métabolique simplifié, des résultats du marquage à la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en hypoxie. ....	150
Figure 79 : Évolution du rapport $^{13}\text{C}/(^{13}\text{C}+^{12}\text{C})$ estimé avec la séquence POCE pour les différents métabolites d'intérêt à $t=2\text{h}$ , $t=6\text{h}$ , $t=24\text{h}$ et $t=48\text{h}$ pour le $^{13}\text{C}_6$ -glucose en normoxie.....	151
Figure 80 : Évolution du rapport $^{13}\text{C}/(^{13}\text{C}+^{12}\text{C})$ estimé avec la séquence POCE pour les différents métabolites d'intérêt à $t=2\text{h}$ , $t=6\text{h}$ , $t=24\text{h}$ et $t=48\text{h}$ pour le $^{13}\text{C}_6$ -glucose en hypoxie. ....	151

Figure 81 : Évolution du rapport $^{13}\text{C}/(^{13}\text{C}+^{12}\text{C})$ estimé avec la séquence POCE pour les différents métabolites d'intérêt à t=2h, t=6h, t=24h et t=48h pour la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en normoxie.....	152
Figure 82 : Évolution du rapport $^{13}\text{C}/(^{13}\text{C}+^{12}\text{C})$ estimé avec la séquence POCE pour les différents métabolites d'intérêt à t=2h, t=6h, t=24h et t=48h pour la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en hypoxie.....	152
Figure 83 : Exemple de spectre obtenu : POCE 40 et 42 pour la souris MMP11 +/+. POCE 40 : on observe les hydrogènes portés par les $^{12}\text{C}$ et au $^{13}\text{C}$ . Le pic visible à 1,3 ppm correspond à la graisse. POCE 42 : on observe les hydrogènes portés par les $^{13}\text{C}$ .....	154
Figure 84 : Schéma du protocole d'acheminement d'un échantillon jusqu'à l'analyse spectrale avec perfusion pré-chirurgicale du $^{13}\text{C}_6$ -glucose. ....	157
Figure 85 : Imagerie MALDI : exemple de la distribution spatiale de 4 métabolites de gliomes d'origine astrocytaire.....	158

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des tumeurs du système nerveux à partir de l'embryologie (15).....	18
Tableau 2 : Paramètres d'acquisition de la séquence CPMG pour les différentes expériences réalisées....	82
Tableau 3 : Paramètres d'acquisition des séquences POCE.....	86
Tableau 4 : Paramètres d'acquisition de la séquence ZGPR.....	88
Tableau 5 : Paramètres d'acquisition de la séquence HSQC pour les différentes expériences réalisées. ...	90
Tableau 6 : Paramètres d'acquisition de la séquence J-RES.....	93
Tableau 7 : Paramètres d'acquisition HMBC.....	94
Tableau 8 : Pourcentage de carbone marqué et non marqué au $^{13}\text{C}$ avec les concentrations respectives.	103
Tableau 9 : Listing des métabolites incorporant le $^{13}\text{C}_6$ -glucose. Les cercles noirs représentent les $^{12}\text{C}$ de la molécule, les cercles rouges représentent les $^{13}\text{C}$ d'abondance naturelle et les cercles rouges remplis représentent les $^{13}\text{C}$ du $^{13}\text{C}_6$ -glucose.....	133
Tableau 10 : Caractéristiques de l'échantillon utilisé pour l'étude cinétique 1.....	135
Tableau 11 : Caractéristiques de l'échantillon utilisé pour l'étude cinétique 2 en normoxie qui sera marqué au $^{13}\text{C}_6$ -glucose. ....	137
Tableau 12 : Caractéristiques de l'échantillon utilisé pour l'étude cinétique 2 en hypoxie qui sera marqué au $^{13}\text{C}_6$ -glucose. ....	137
Tableau 13 : Caractéristiques de l'échantillon utilisé pour l'étude cinétique 2 en normoxie qui sera marqué à la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine.....	137
Tableau 14 : Caractéristiques de l'échantillon utilisé pour l'étude cinétique 2 en hypoxie qui sera marqué à la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine.....	137
Tableau 15 : Listing des métabolites incorporant le $^{13}\text{C}_6$ -glucose en normoxie aux différents temps. Les cercles noirs représentent les $^{12}\text{C}$ de la molécule, les cercles rouges représentent les $^{13}\text{C}$ d'abondance naturelle et les cercles rouges remplis représentent les $^{13}\text{C}$ du $^{13}\text{C}_6$ -glucose.....	144
Tableau 16 : Listing des métabolites incorporant le $^{13}\text{C}_6$ -glucose en hypoxie aux différents temps. Les cercles noirs représentent les $^{12}\text{C}$ de la molécule, les cercles rouges représentent les $^{13}\text{C}$ d'abondance naturelle et les cercles rouges remplis représentent les $^{13}\text{C}$ du $^{13}\text{C}_6$ -glucose.....	146
Tableau 17 : Listing des métabolites incorporant la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en normoxie aux différents temps. Les cercles noirs représentent les $^{12}\text{C}$ de la molécule, les cercles rouges représentent les $^{13}\text{C}$ d'abondance naturelle et les cercles rouges remplis représentent les $^{13}\text{C}$ de la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine.....	148
Tableau 18 : Listing des métabolites incorporant le $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en hypoxie aux différents temps. Les cercles noirs représentent les $^{12}\text{C}$ de la molécule, les cercles rouges représentent les $^{13}\text{C}$ d'abondance naturelle et les cercles rouges remplis représentent les $^{13}\text{C}$ de la $^{13}\text{C}_5$ -glutamine.....	150

## **1. INTRODUCTION**

## 1.1. Un peu d'histoire...

La résistance aux médicaments anticancéreux constitue un enjeu majeur en oncologie. L'hétérogénéité tumorale en est une des causes principales. En effet, les tumeurs constituent un système aux interactions complexes. Elles s'adaptent et évoluent en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent (1) (2).

Quelques repères historiques apportent un éclairage sur l'évolution conceptuelle de la tumorigénèse. En 1966, Charles Huggins obtient le prix Nobel de médecine et de physiologie pour ses travaux portant sur le traitement hormonal dans le cancer prostatique (3). Il réussit à montrer que le blocage de la production endogène de testostérone ralentit l'évolution de certains adénocarcinomes prostatiques. Par ce biais, il cible de façon particulière un sous type de cancer. Ces publications constituent le point de départ de la médecine personnalisée.

Deux conceptions de la définition du cancer se sont succédé ces dernières décennies. Les années 60 et 90 voient l'avènement de la théorie réductionniste ou uniciste du développement tumoral. Le paradigme était « un gène unique est suffisant pour générer une tumeur » (4). La leucémie myéloïde chronique en est un exemple. En 1960, le chromosome Philadelphie t(9-22) (q34q11) était découvert comme le générateur de cette tumeur (5). Le traitement par Imatinib (inhibiteur de l'activité de la tyrosine kinase de l'oncogène c-abl) inaugure l'avènement des thérapies ciblées (6). Or des publications mettent en évidence que l'étiogénèse tumorale n'est pas toujours due à un gène unique.

Vogelstein *et al.* (7) précisent dans leur étude l'altération séquentielle de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes, concomitante à l'évolution tumorale et histologique. Cette description a été étendue à plusieurs types de tumeurs solides (sein, poumon, prostate) (8). Le caractère hétérogène de la génétique moléculaire commence alors à prendre une place de choix dans la tumorigénèse.

L'étude de 2012 de Gerlinger *et al.* (9) bouscule ce principe unitaire et de linéarité évolutive et montre une diversité tumorale. Les auteurs expliquent qu'une seule biopsie ne permet d'identifier qu'une fraction des mutations qui seraient mises en évidence par l'analyse de l'ensemble de la tumeur. Sur 128 mutations détectées dans l'ensemble de la tumeur, 60% n'auraient pas été retrouvées si l'analyse n'avait été réalisée que sur un prélèvement, ce qui modifierait le pronostic et pourrait conduire à une prise en charge inadaptée. Cette hétérogénéité génétique est ainsi mise en exergue par le modèle progressif tumoral. Les

auteurs ne constatent plus une progression linéaire mais des ramifications évolutives générant différentes populations de cellules néoplasiques.

L'apparition de la pathologie ne se définit alors plus par les seules modifications génomiques mais aussi par le changement comportemental cellulaire. Kroemer et Pouyssegur (10) ont mis en évidence ce rôle joué par des facteurs non oncogénétiques, comme l'hypoxie qui exerce des actions multiples par le biais de la stabilisation du facteur transcriptionnel HIF (Hypoxia-Inducible Factor), de la stimulation de l'angiogénèse, de la survie cellulaire, de la protection contre l'acidose (11).

La tumeur n'est plus une entité composée uniquement de cellules cancéreuses homogènes : elle contient un contingent hétérogène de cellules stromales de type fibroblastique, des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des vaisseaux sanguins irriguant la tumeur et des cellules immunitaires (12). Cette vision fut complétée en 2011 (2) par l'intégration du microenvironnement, de l'échappement immunitaire, de l'instabilité génomique et mutationnelle et de la reprogrammation métabolique cellulaire.

## **1.2. Les gliomes : un modèle d'hétérogénéité tumorale**

L'incidence des tumeurs intracrâniennes primitives de l'adulte est d'environ 10/100 000 habitants/an. Les tumeurs cérébrales malignes représentent 1 à 2% de l'ensemble des cancers. Environ 40% des tumeurs primitives intracrâniennes sont des méningiomes, 30% des gliomes et 10% des adénomes hypophysaires. Deux tiers sont bénignes (gliomes de bas grade, méningiomes, adénomes de l'hypophyse).

Les gliomes sont des tumeurs cérébrales développées aux dépens des cellules gliales, qui sont les cellules du tissu de soutien neuronal. Le diagnostic de certitude des gliomes repose sur l'examen anatomo-pathologique du tissu tumoral, prélevé par biopsie ou exérèse chirurgicale. Les gliomes sont classés selon des critères anatomopathologiques et selon la biologie moléculaire depuis 2016 (13). Celle-ci demeure toutefois imparfaite pour l'évaluation du pronostic et pour la prédiction de l'efficacité thérapeutique. Au cours des dernières années, la recherche a en effet révélé le caractère hétérogène de ces tumeurs gliales, notamment grâce à leur étude biologique ; ce fait complexifie leur analyse. Au sein d'une tumeur, on constate aussi des différences de populations cellulaires et moléculaires permettant

à la tumeur de croître dans des environnements différents : on parle alors d'hétérogénéité intra-tumorale (comparativement à l'hétérogénéité inter-tumorale) (14).

### **1.2.1. Aspects clinico-biologiques**

Les symptômes révélateurs de gliomes sont aspécifiques. Ils dépendent du volume tumoral et de la localisation de la tumeur. Dans les gliomes de bas grade, l'épilepsie représente le symptôme inaugural le plus fréquent. Des troubles cognitifs sont fréquemment objectivés notamment *via* les tests neuropsychologiques. Des céphalées rebelles et inhabituelles sont également décrites. Dans les gliomes de haut grade, on parle d'évolution « en tâche d'huile » avec un début progressif. L'épilepsie est là aussi le symptôme le plus fréquent. Des déficits neurologiques peuvent être observés ainsi qu'une hypertension intracrânienne.

Concernant le pronostic, les gliomes de bas grade ont une survie très souvent supérieure à 10 ans. Si l'évolution vers une forme de haut grade est la règle, celle-ci est souvent lente, sur plusieurs années pendant lesquelles le patient reste asymptomatique. Les gliomes de haut grade ont une survie de 2 (glioblastomes) à 7 ans (oligodendrogliomes de haut grade). Malgré une meilleure corrélation entre la survie et la nouvelle classification OMS 2016, il n'est pas rare d'observer des gliomes de bas grade de mauvais pronostic avec une évolution péjorative en seulement quelques années, ou inversement des gliomes de haut grade présentant une survie proche des gliomes de bas grade. Il est alors crucial d'estimer le comportement évolutif de la tumeur dès le diagnostic initial afin d'optimiser la prise en charge : soit agressive avec une chirurgie la plus complète possible associée à une radio-/chimiothérapie, soit conservatrice avec un suivi rapproché afin de favoriser la qualité de vie.

### 1.2.1.1. Classifications des gliomes

L'étude des gliomes fait appel à différentes classifications : cela signe leur hétérogénéité.

On peut classer les tumeurs du système nerveux à partir de leur origine embryologique (Tableau 1) :

<b><u>Blastème</u></b>				Tumeurs embryonnaires
<b><u>Neuroectoderme</u></b>				
	<b>Neurones</b>			Tumeurs neuronales et glioneuronales
	<b>Glie</b>	Interstitielle	Astrocyte	Astrocytome, glioblastome
			Oligodendrocyte	Oligodendrogliomes
				Tumeurs mixtes
		Épithéliale	Épendyme	Épendymomes
			Plexus choroïdes	Papillomes et carcinomes
<b><u>Mésenchyme</u></b>	<b>Méninges</b>			Méningiome
	<b>Vaisseaux</b>			Tumeurs mésenchymateuse et hémangioblastome
				Tumeurs mélanocytaires
<b><u>Nerfs périphériques</u></b>				Schwannome, neurofibrome et péricéurinome
<b><u>Hypophyse, épiphyse</u></b>				Tumeurs sellaires, pinéales et germinomes

Tableau 1 : Classification des tumeurs du système nerveux à partir de l'embryologie (15).

On classe les gliomes en fonction de l'anatomo-pathologie, qui reste le gold standard. La classification histologique est fondée sur 4 critères principaux (14) (16):

- le nombre de mitoses ;
- la présence d'atypies nucléaires ;
- la présence ou non de nécrose ;
- l'hyperplasie endothéliale (altérations vasculaires).

La classification histologique présente des limites. En effet, elle repose sur l'analyse d'un échantillon tumoral qui n'est pas forcément le reflet de la totalité de la tumeur. De plus une variabilité inter-observateur dans l'interprétation est rapportée (17).

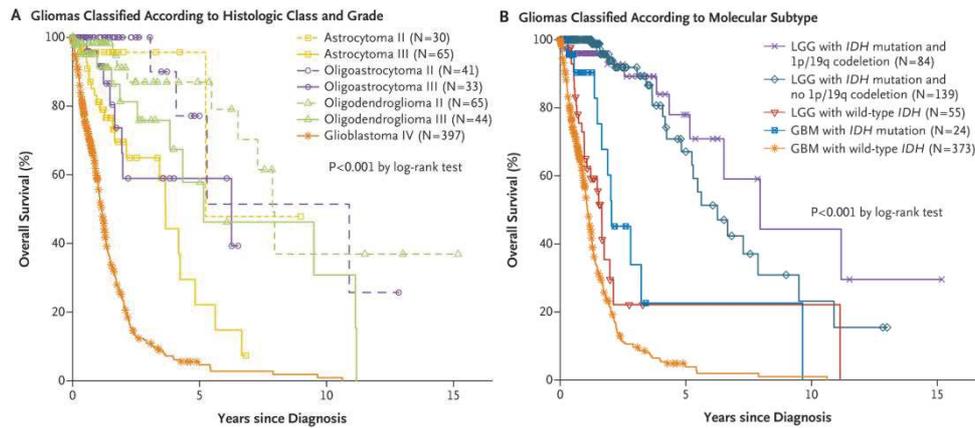
Les sous-types tumoraux présentent un aspect morphologique hétérogène au sein d'une classification histologique homogène. Les différentes sous-populations tumorales expriment des gènes différents en faveur d'un comportement biologique différent. La classification histologique seule est alors incomplète.

Ainsi, la classification des tumeurs cérébrales primitives utilisée actuellement dans le monde est celle de l'OMS (classification de WHO 2016) (13) (Figure 1). Au cours des

dernières années, l'identification de mutations fréquemment acquises montre que les patients atteints d'oligodendrogliomes et glioblastomes ont une biologie divergente avec des pronostics différents (18) (Figure 2). Par conséquent, depuis 2016, les caractéristiques moléculaires pour les oligodendrogliomes sont incluses dans la classification de l'OMS (13), et de nouvelles entités apparaissent : oligodendrogliomes IDH-mutant et codéléte 1p19q et oligodendrogliomes anaplasiques IDH-mutant et codéléte 1p/19q. Comme ces caractéristiques moléculaires fournissent des données pronostiques et/ou prédictives, elles sont cruciales pour le choix du traitement en raison de leur relation avec la survie (18). D'autres mutations génétiques sont étudiées en routine clinique, mais leur impact n'est pas bien compris. Il est essentiel de mieux comprendre les caractéristiques moléculaires ainsi que les voies métaboliques impliquées.

<b>Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours</b>	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3
<i>Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9400/3
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3
<i>Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9401/3
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3
Giant cell glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
<i>Epithelioid glioblastoma</i>	9440/3
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*
Glioblastoma, NOS	9440/3
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	9385/3*
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3
Oligodendroglioma, NOS	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3
<i>Anaplastic oligodendroglioma, NOS</i>	9451/3
<i>Oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3
<i>Anaplastic oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3

Figure 1 : Extrait de la classification de WHO 2016 (13).



**Figure 2 : Courbes de Kaplan-Meier illustrant la survie des patients avec des gliomes de bas grade et de haut grade A) selon le type histologique classique et B) selon le statut mutationnel IDH et la codéletion 1p19q (18).**

De nombreuses altérations génétiques sont observées dans les gliomes : six d'entre elles sont mentionnées ici et le lien entre la métabolique, la survie et ces altérations génétiques a été étudié dans notre travail.

### 1.2.1.2. Altérations génétiques

#### Mutation IDH1

IDH1 (isocitrate déshydrogénase) et IDH2 sont des oxydoréductases qui catalysent la conversion de l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ -KG). IDH1 agit au niveau du cytosol et IDH2 agit au niveau de la mitochondrie. Cette réaction va générer la production de NADPH. La substitution de l'arginine en position 132 (R132H) de la séquence codante du gène IDH1 conduit à la conversion de l' $\alpha$ -KG en 2-hydroxyglutarate (2-HG). Le 2-HG est considéré comme un oncométabolite, son accumulation détectable en spectroscopie RMN *in vivo* étant liée à la présence de la mutation IDH1. Cette mutation est retrouvée essentiellement dans les oligodendrogliomes (19) (20) ; elle est considérée comme la plus fiable pour discriminer les glioblastomes primaires (IDH-1 non mutés ou sauvages) des glioblastomes secondaires (IDH-1 muté) (21). Elle est de pronostic favorable dans les gliomes de l'adulte.

Dans les gliomes, IDH1 est impliquée dans le cycle de TCA (cycle de l'acide tricarboxylique). Elle entraîne une hyperméthylation de l'ADN, une augmentation de la méthylation de la queue des histones, une diminution de l'hydroxylation du collagène et une augmentation des facteurs induits par l'hypoxie. Analogue de l' $\alpha$ -KG, le 2-HG permet alors de stabiliser le facteur HIF1- $\alpha$ , qui a, rappelons-le, notamment pour rôle de stimuler la glycolyse,

l'angiogenèse et la croissance cellulaire. Le 2-HG sensibilise les cellules tumorales à la chimiothérapie en augmentant le stress oxydatif cellulaire (22) (23) (24).

La recherche de la mutation IDH1 est incluse dans la classification OMS 2016 (13). Néanmoins, on constate qu'au sein des gliomes IDH, mutés ou non, il persiste des variabilités pronostiques. Romo *et al.* (25) ont décrit un cas intéressant de gliome, classé oligodendrogliome anaplasique initialement compte tenu de la présence de mutations d'IDH1 et de TP53 et d'anomalie de 1p19q. D'autres tests moléculaires ont en effet montré par la suite des caractéristiques plutôt compatibles avec un glioblastome : de multiples aberrations chromosomiques avec notamment la perte du chromosome 1 et de 2q, l'amplification de MYCN, MET et CDK4, la perte de CDKN2A/B et une mutation ATRX. Cet exemple montre l'importance de la standardisation de l'analyse moléculaire et met en évidence les avantages qu'il pourrait y avoir à étendre les tests moléculaires au-delà des biomarqueurs moléculaires validés en pratique courante. Actuellement, seules la codéletion 1p19q ou la perte d'hétérozygotie, les mutations IDH1/2 et la méthylation du promoteur MGMT doivent être évaluées selon les directives actuelles du *National Comprehensive Cancer Network*<sup>®</sup> (NCCN<sup>®</sup>) (26). Ce cas illustre parfaitement l'hétérogénéité moléculaire des gliomes et soulève la question de la réalisation de biopsies multiples.

### **Codéletion 1p19q**

La co-déletion 1p19q est associée à un bon pronostic (27). Bien que l'effet biologique de la co-déletion 1p19q demeure incertain, elle est considérée comme la signature moléculaire diagnostique des oligodendrogliomes. Elle représente un marqueur de bonne réponse à la chimiothérapie. Deux essais cliniques randomisés, le *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) 9402 et l'étude 26 951 de l'*European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC), ont montré un bénéfice significatif pour la survie lorsqu'une chimiothérapie par lomustine (CCNU) , procarbazine et vincristine (PCV) a été ajoutée à la radiothérapie en présence de la co-déletion 1p19q alors qu'il n'y a pas eu de bénéfice significatif en l'absence de la co-déletion 1p19q (28).

Au sein des gliomes 1p19q co-délétés, on met en évidence des pronostics cliniques différents (18) (29). Hu *et al.* (30) ont identifié la signature de 35 gènes qui permettent de discriminer les catégories à haut risque et à faible risque chez des patients atteints de gliomes 1p19q co-délétés. Ils ont ainsi montré l'hétérogénéité d'un sous-type de gliome.

### **Mutation de TP53**

Le gène suppresseur de tumeur p53 (TP53) est inactivé dans de nombreux cancers. La mutation de TP53 est fréquente dans les gliomes (60% des mutations). Elle est de moins bon pronostic que la co-délétion 1p19q. Ce sont deux altérations moléculaires exclusives (31). Les mutations de TP53 sont significativement plus fréquentes dans les gliomes de bas grade et les glioblastomes secondaires, qui en sont dérivés, que dans les glioblastomes primaires. Notons que l'amplification de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) est, quant à elle, plus fréquente dans les glioblastomes primaires : cependant, les deux altérations géniques peuvent coexister (32).

Ce gène est bien connu pour son rôle dans le contrôle de la prolifération et de la mort cellulaire. Plusieurs types de stress activent les fonctions trans-activatrices de p53, qui est alors activatrice de divers gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, l'autophagie ou encore l'angiogenèse. Elle module la glycolyse, la voie des pentoses phosphates (PPP), la phosphorylation oxydative (OXPHOS), le métabolisme des lipides ou de la glutamine (33).

Han *et al.* (34) ont montré, dans une étude sur des cultures cellulaires de gliomes, que le témozolomide combiné à une faible dose de lithium induit la mort des cellules de gliomes TP53 sauvage *via* la signalisation NFAT1/FasL. Le lithium est un inhibiteur de la glycogène synthase kinase qui active cette voie de signalisation. Ces données orientent vers une stratégie potentielle de traitement des gliomes TP53 sauvage. La connaissance du statut génétique des gliomes est essentielle pour adapter les traitements.

### **Méthylation du promoteur MGMT**

Le gène MGMT (O<sub>6</sub>-méthylguanine-DNA-méthyl-transférase) se situe sur le chromosome 10. Dans la plupart des glioblastomes, un allèle de ce chromosome est perdu. Les études récentes semblent montrer que l'expression de ce gène est liée à la méthylation de son promoteur. La probabilité d'être méthylé *versus* non méthylé est de 50%.

Le gène MGMT code pour une protéine de réparation de l'ADN qui bloque le processus d'alkylation. La méthylation du promoteur inactive ce gène, qui est alors incapable de réparer les dommages provoqués par le témozolomide (agent alkylant entraînant la mort cellulaire).

Dès lors, la présence de la méthylation du promoteur de MGMT est prédictive de bonne réponse au traitement par témozolomide. Elle permettrait de sélectionner des

glioblastomes à partir des données de la biologie moléculaire pour le traitement des patients dans la perspective d'une médecine personnalisée (35). L'utilisation du statut MGMT en routine clinique pour le traitement des glioblastomes reste néanmoins complexe (36). La méthylation MGMT est utilisée comme seuil de stratification dans les essais cliniques testant le témozolomide ; néanmoins, il persiste un problème de détermination de seuil. Une étude a été réalisée afin de trouver une méthode fiable de quantification de MGMT (36). Un nombre croissant d'essais cliniques incluant les glioblastomes MGMT non méthylés utilisent d'autres traitements dans ce sous-groupe (37) (38) (39).

### **Amplification de EGFR**

Le gène relatif au récepteur EFG (EGFR) est situé sur le chromosome 7. La mutation responsable de l'amplification de ce gène est plus fréquente dans les glioblastomes primaires. Elle est présente dans plus de 90 % des glioblastomes (40) mais demeure exceptionnelle dans les oligodendrogliomes.

La mutation EGFR est associée à une augmentation du métabolisme cellulaire (glycolyse, fermentation de l'acide lactique, métabolisme des acides aminés, métabolisme des lipides) et à un mauvais pronostic dans les gliomes (41).

Cette amplification est à l'origine de mécanismes de radio-/chimio-résistance (42).

### **Méthylation de PTEN**

PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) est un gène suppresseur de tumeur situé sur le bras long du chromosome 10, 10q23, antagoniste de PI3K. Il empêche les cellules de se diviser trop rapidement.

On observe la mutation de PTEN ou la perte d'hétérozygotie dans 60% des glioblastomes. Elle est de mauvais pronostic (43). La perte de la fonction PTEN entraîne l'activation de la voie de signalisation AKT/PKB et l'activation de HIF1- $\alpha$ , favorisant ainsi la croissance, la survie, la migration et la néoangiogénèse des cellules tumorales (44) (45). L'activation de PI3K augmente la résistance à la mort cellulaire induite par le rayonnement et, inversement, l'inhibition de PI3K augmente la sensibilité des tumeurs au rayonnement. Les tumeurs PTEN mutées sont donc radio-résistantes.

### 1.2.2. Imagerie des gliomes

L'imagerie médicale au cours des dernières années a permis d'étudier et de mieux comprendre l'hétérogénéité des gliomes. Diverses approches peuvent être utilisées pour étudier les cancers en imagerie médicale, notamment en fonction de l'appareil d'imagerie et de l'échelle (46), comme illustré dans la Figure 3.

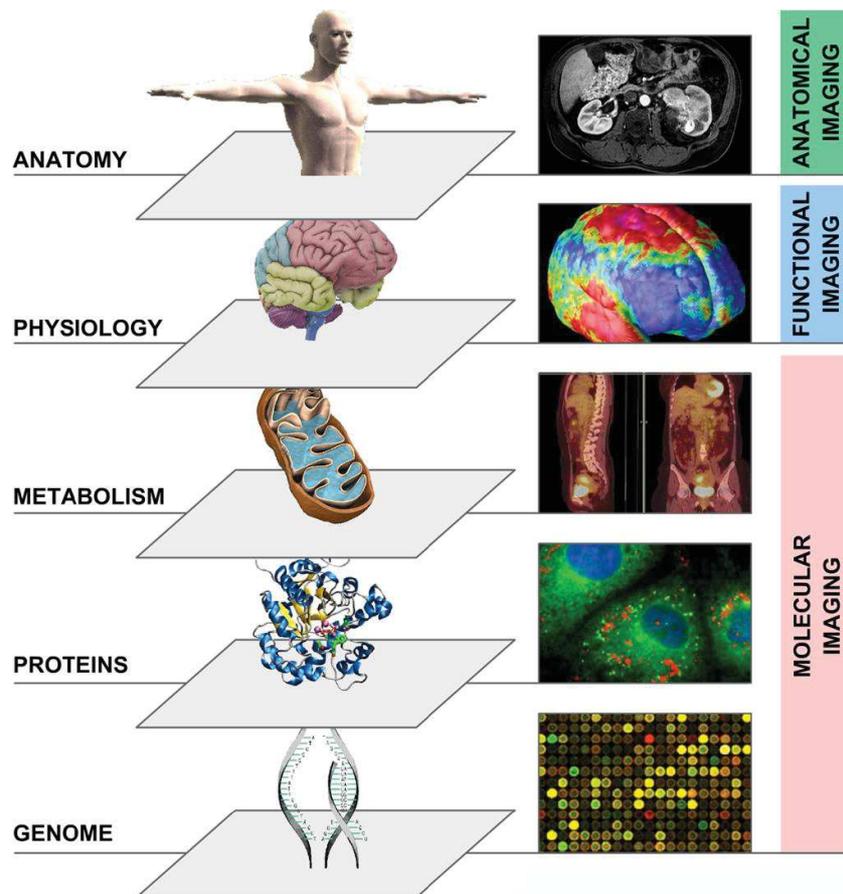


Figure 3 : Imagerie multimodale et «-omiques », d'après Lambin *et al.* (46).

Les avancées dans la connaissance de la biologie des gliomes nécessitent des critères de neuroimagerie plus fiables pour diagnostiquer les tumeurs, pour suivre leur évolution et pour évaluer la réponse aux traitements. Les essais cliniques pour les patients atteints de glioblastomes intègrent désormais les techniques d'imagerie par résonance magnétique (IRM) et de tomographie par émission de positons (TEP) (47).

### 1.2.2.1. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM est l'examen de référence dans l'évaluation et le suivi du glioblastome. Elle permet le diagnostic, de délimiter l'infiltration tumorale, de visualiser l'hétérogénéité intratumorale afin de guider la biopsie ou la résection chirurgicale, pour planifier la radiothérapie et pour surveiller la réponse aux traitements. Elle a été intégrée dans la classification de l'hôpital Sainte-Anne (48).

#### *Critères d'interprétation :*

Lors du diagnostic initial, le bilan comprend une séquence spin écho T<sub>1</sub> avant et après injection de chélates de Gadolinium, une séquence T<sub>2</sub> ou FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*), une séquence de perfusion, plus ou moins une séquence 3D (écho de gradient) T<sub>1</sub> après Gadolinium et reconstructions dans les 3 plans de l'espace (49).

Classiquement, on observe un hyposignal T<sub>1</sub> développé aux dépens de la substance blanche avec un signal central hétérogène (nécrose, hémorragie intra-tumorale), un rehaussement périphérique et irrégulier après injection de Gadolinium et un hypersignal T<sub>2</sub> FLAIR (50) (Figure 4).

La prise de contraste après injection de Gadolinium reflète une rupture de la barrière hémato-encéphalique. Une prise de contraste est généralement associée à un grade élevé. Néanmoins, certains gliomes de haut grade ne prennent pas le contraste en IRM (51) (52) (53).

Les séquences DCE-MRI (*dynamic contrast-enhanced*), DSC-MRI (*dynamic susceptibility contrast*), DW-MRI (*diffusion weighted*) permettent d'apporter des informations supplémentaires. Cette dernière est surtout utile pour le diagnostic différentiel avec les pathologies vasculaires de type AVC. La séquence DSC permet de calculer une cartographie du rCBV et rCBF (*relative Cerebral Blood Volume* et *relative Cerebral Blood Flow*) : elle donne des informations sur la perfusion de la tumeur. Une séquence de spectroscopie peut également être réalisée au cours du bilan IRM.

En pratique clinique, les critères de RANO (*Response Assessment in Neuro Oncology*) permettent d'homogénéiser l'interprétation de l'IRM, qui reste délicate en raison de l'hétérogénéité morphologique des gliomes (54).

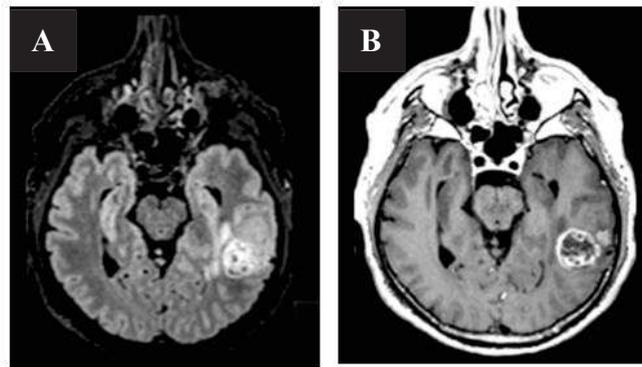


Figure 4 : Imagerie IRM d'un glioblastome temporal gauche en séquence FLAIR A) et après injection de gadolinium B).

La spectroscopie est une technique non invasive de mesure relative et absolue de la concentration de métabolites *in vivo*, notamment la choline (Cho), le N-acétyl-aspartate (NAA), la créatine (Cr), le lactate (Lac), les lipides et le myoinositol. Elle est réalisée en complément des séquences IRM classiques.

La choline est un marqueur du turnover membranaire (synthèse et destruction). On en retrouve dans la substance blanche et de façon moindre dans la substance grise. Le pic augmente avec l'âge. Elle est augmentée dans les tumeurs, en cas d'inflammation chronique ou d'hypoxie chronique, en raison de la prolifération cellulaire. Le NAA est un marqueur neuronal localisé dans les mitochondries. Il diminue en cas de perte et/ou de dysfonctionnement neuronal : c'est le reflet indirect non spécifique de la perte neuronale (ischémie, traumatisme, inflammation, infection, tumeurs, démences, etc.). Créatine et phosphocréatine sont le reflet du métabolisme énergétique global et un index de cellularité. Leurs quantités sont globalement stables, c'est pourquoi on l'utilise comme référence en général. Leurs diminutions signifient l'hypoxie. Les lactates reflètent l'effet Warburg et/ou le métabolisme anaérobie. On les retrouve dans les lésions ischémiques, inflammatoires et dans les tumeurs. Les lipides ne sont pas détectés dans le cerveau normal car le  $T_2$  des lipides structurés comme la myéline est de l'ordre de la  $\mu s$ . La destruction de la myéline engendre la présence de lipides libres, témoins de la nécrose cellulaire. Le pic de lipides est parfois détectable avant les anomalies morphologiques en IRM. Le myoinositol est élevé dans les astrocytomes et en cas d'activation gliale (55).

L'augmentation des taux de 2-HG dans les gliomes mutés IDH1 peut être utilisée comme biomarqueur en utilisant la spectroscopie RMN. La détection de 2-HG permet

d'identifier de manière fiable le statut mutationnel IDH1 d'une tumeur sans avoir recours à une biopsie (56) (57).

Les informations biochimiques données par la spectroscopie RMN permettent d'améliorer la prise en charge du patient en complément de l'anatomopathologie.

#### **1.2.2.2. Tomographie par émission de positons (TEP) (58)**

L'imagerie fonctionnelle permet une étude non invasive de l'hétérogénéité métabolique des gliomes. Un nombre croissant d'études ont été publiées sur l'imagerie TEP dans le cadre du diagnostic, de la biopsie et de la résection ainsi que de la planification de la radiothérapie et de l'évaluation de la réponse thérapeutique (58). La TEP aux acides aminés présente de meilleures performances que la TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG (fluorodéoxyglucose). D'autres radiotraceurs peuvent être utilisés en fonction du métabolisme ciblé : traceur du métabolisme de la glutamine, analogue de la thymidine, traceur du métabolisme de la choline et traceur de l'hypoxie par exemple.

En ce sens, nous accordons plus d'importance à l'information recueillie à l'occasion d'une exploration utilisant des radiotraceurs, image *in vivo* du métabolisme, où un traceur équivaut à un métabolite et/ou une voie métabolique.

#### **TEP au FDG**

Le  $^{18}\text{F}$ -FDG, 2-deoxy-D-glucose (analogue du glucose) marqué au fluor 18, est le radiotraceur le plus largement utilisé et validé en cancérologie. Il est internalisé (*via* les protéines GLUT) de façon identique au glucose. Le FDG est ensuite phosphorylé par l'hexokinase en fluorodéoxyglucose-6-phosphate. Il est ainsi piégé dans la cellule où il s'accumule et sera détectable en TEP. Dans les processus tumoraux, c'est l'augmentation des GLUT et de l'activité de phosphorylation qui est responsable en majeure partie de l'accumulation du glucose visible en TEP au FDG (59). Le FDG reflète ainsi le métabolisme cellulaire du glucose, classiquement augmenté dans les processus tumoraux. Une augmentation du métabolisme du glucose est en général liée à une agressivité plus importante.

Lors du diagnostic, la TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG permet de donner des informations sur la malignité. Des études ont montré que les lymphomes cérébraux présentent une fixation

supérieure aux gliomes. Il est important de signaler que la corticothérapie réduit la fixation du FDG et diminue ainsi la sensibilité de la technique.

La TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG est indiquée pour la détection, en cas de suspicion de récurrence, de gliomes de grades de malignité élevés (grades III ou IV de la classification OMS). En revanche, la performance du FDG dans les gliomes de bas grade est limitée à la fois par l'importante fixation physiologique du FDG dans le cortex cérébral et par la faible activité glycolytique de ce type de tumeurs (58). De plus, la TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG a une spécificité limitée pour distinguer les gliomes des lésions inflammatoires ou infectieuses.

Dans les tumeurs cérébrales de haut grade, on observe classiquement une augmentation du métabolisme du glucose. Cette propriété a été utilisée pour classifier les gliomes, guider les biopsies, évaluer la réponse thérapeutique et distinguer la récurrence d'une radionécrose (60) (61) (62) (63) (64) (65). Néanmoins, certains gliomes de haut grade présentent une diminution du métabolisme du glucose en TEP au FDG laissant supposer l'utilisation d'autres voies métaboliques. On peut observer ces deux patterns métaboliques (hypercaptation et hypocaptation du FDG) au sein même d'un gliome ou d'une récurrence de gliome (Figure 5).

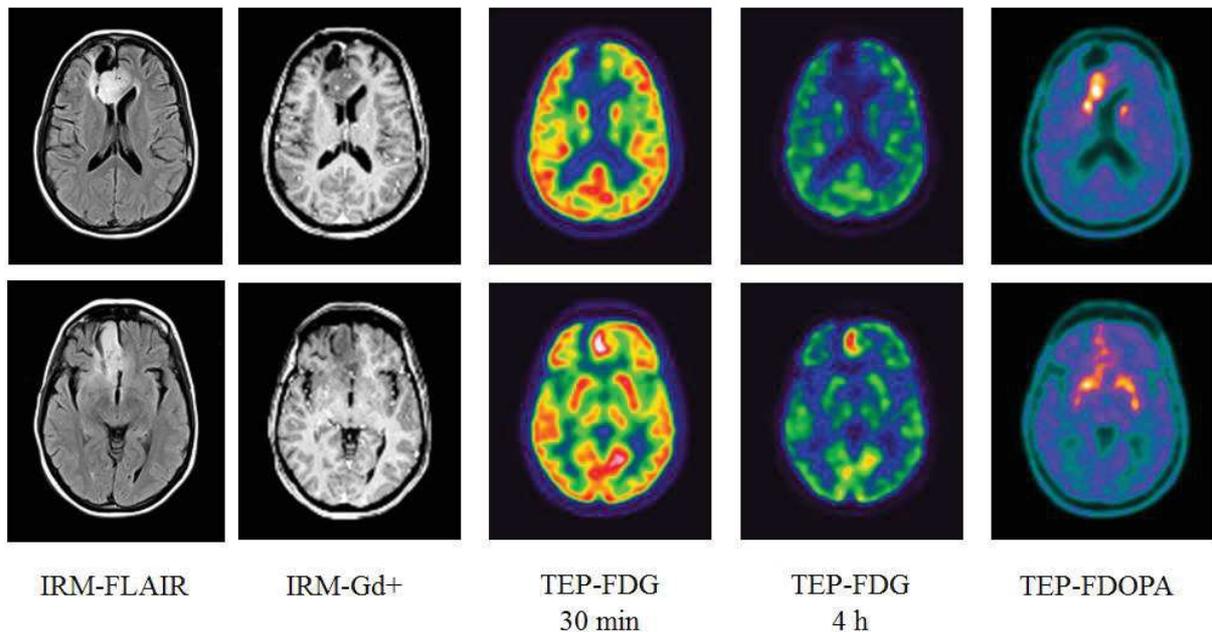


Figure 5 : Un cas de récurrence d'oligodendrogliome de haut grade : hétérogénéité de fixation en FDG avec une plage hypométabolique et une plage hypermétabolique, alors que la TEP à la FDOPA montre une augmentation globale du métabolisme des acides aminés de l'ensemble de la tumeur.

## TEP aux analogues des acides aminés

En raison d'une fixation physiologique cérébrale relativement faible, les radiotraceurs du métabolisme des acides aminés peuvent apporter des informations supplémentaires dans la prise en charge des glioblastomes. Les radiotraceurs les plus utilisés en clinique sont la  $^{11}\text{C}$ -méthyl-méthionine ( $^{11}\text{C}$ -MET), la O-2- $^{18}\text{F}$ -fluoroethyl-L-tyrosine ( $^{18}\text{F}$ -FET) et la 3,4-dihydroxy-6- $^{18}\text{F}$ -fluoro-L-phénylalanine ( $^{18}\text{F}$ -FDOPA).

Ces radiotraceurs permettent de différencier les processus tumoraux des autres lésions de façon non invasive. On observe parfois une élévation modérée de ces radiotraceurs dans les lésions inflammatoires mais moins fréquemment qu'en FDG. Une étude a montré qu'un tiers des gliomes de bas grade ne présentait toutefois pas d'élévation de la  $^{18}\text{F}$ -FET (66), illustrant à nouveau l'hétérogénéité des gliomes, cette fois-ci à l'échelle métabolique.

La  $^{18}\text{F}$ -FDOPA, que nous avons utilisée dans ce travail, est incorporée dans la cellule par les transporteurs d'acides aminés LAT, qui sont surexprimés par les cellules tumorales, et sa captation est indépendante de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Concernant le « *grading* » tumoral lors du diagnostic initial, une corrélation significative entre l'intensité de captation de la  $^{18}\text{F}$ -FDOPA et le grade du gliome a été décrite (67) (68) avec une fixation plus importante en cas de gliome de haut grade. La TEP à la  $^{18}\text{F}$ -FDOPA trouve également son utilité dans l'évaluation post-thérapeutique et dans la différenciation entre récurrence et radionécrose.

Ledezma *et al.* (69) ont évalué les avantages diagnostiques des images de fusion  $^{18}\text{F}$ -FDOPA/IRM dans une large cohorte de patients. Ils ont signalé le cas d'un glioblastome récurrent ne prenant pas le contraste en IRM mais présentant une augmentation accrue de la fixation de la FDOPA.

La Figure 6 montre un oligodendrogliome et un glioblastome qui présentent une augmentation pathologique de la fixation de FDOPA, sans franche prise de contraste à l'IRM après injection de gadolinium.

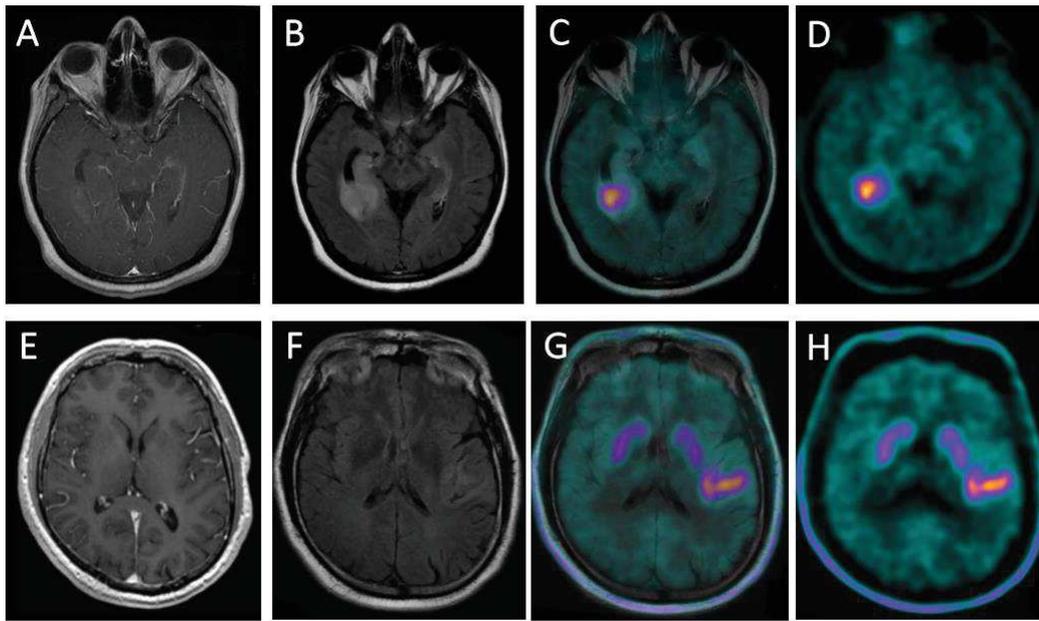


Figure 6 : Cas d'oligodendrogliome de l'hippocampe droit et cas de glioblastome frontopariétal gauche avec IRM (image pondérée T1 gadolinium (A, E) ; image FLAIR (B, F)), image de fusion TEP/IRM (C, G), TEP à la FDOPA (D), d'après Bund *et al.* (53).

### TEP à la fluoroglutamine

Comme le glucose, l'augmentation de la consommation de glutamine dans les cancers peut être visualisée en imagerie. En plus de ses implications thérapeutiques, l'absorption accrue de glutamine par certaines tumeurs offre un potentiel unique pour l'imagerie tumorale. La glutamine fluorée,  $^{18}\text{F}$ -Fluoroglutamine, a été utilisée avec succès pour la détection de tumeurs dans des modèles murins de gliomes et pour des patients atteints de gliomes (70) (71), ce qui valide son utilisation comme outil diagnostique. Dans les gliomes en particulier, l'utilisation de la  $^{18}\text{F}$ -fluoroglutamine semble prometteuse (72) (Figure 7). Elle permet de s'affranchir de la fixation physiologique cérébrale de la TEP au FDG (73). Elle peut être utilisée dans différents types de cancer et confère un rôle de biomarqueur à la glutamine (74).

La glutamine peut également être marquée au  $^{13}\text{C}$  afin d'évaluer sa consommation par les différents métabolites dans les cellules tumorales (75) (76) (77) (78). Elle sera utilisée comme sonde moléculaire dans notre travail.

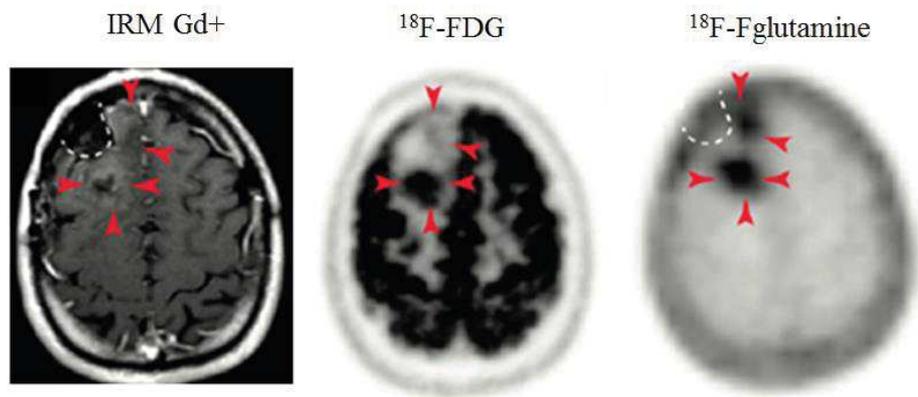


Figure 7 : Patient suivi pour un oligodendrogliome opéré. La cavité d'exérèse correspond aux pointillés blancs, les flèches rouges visibles sur l'IRM correspondent aux prises de contraste. Sur la TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG, on constate une augmentation du métabolisme du glucose dans la partie postérieure de la tumeur et sur la TEP à la  $^{18}\text{F}$ -Fglutamine une augmentation du métabolisme de la glutamine en pré- et rétro-tumoral, signant l'hétérogénéité de la tumeur sur le plan métabolique, d'après Venneti *et al.* (72).

### TEP à la fluoro-L-thymidine (FLT)

La FLT est un analogue de la thymidine, base constitutive de l'ADN. Son accumulation dans la cellule reflète l'activité de la thymidine kinase (impliquée dans la phase S de la synthèse de l'ADN). C'est un marqueur de la prolifération cellulaire *in vivo* corrélé au Ki67. La  $^{18}\text{F}$ -FLT est utilisée dans le suivi des gliomes. Elle améliore le « grading » au sein des gliomes de haut-grades en complément des séquences rCBV, de la diffusion et de la SRM (79). Elle semble supérieure au  $^{18}\text{F}$ -FDG pour prédire la progression tumorale (80). Toutefois elle n'est pas spécifique des tumeurs. La Figure 8 montre l'utilisation de différents radiotraceur pour le diagnostic non invasif des gliomes.

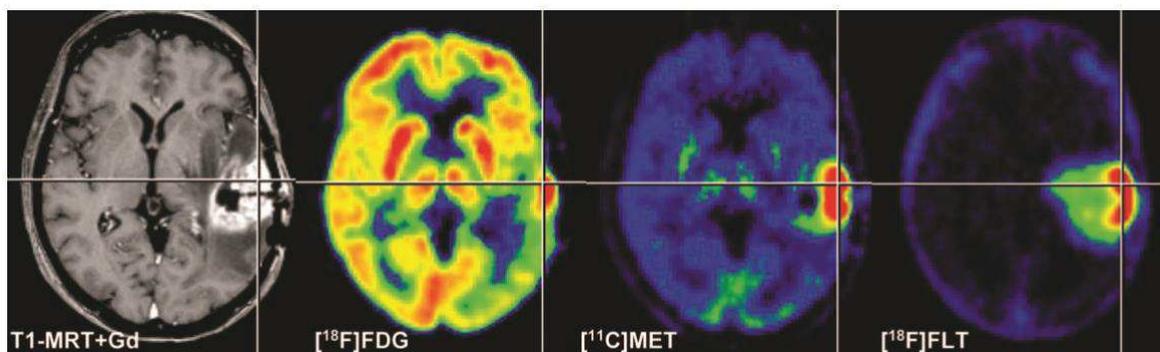


Figure 8 : Un cas de glioblastome en IRM après injection de gadolinium et en TEP au FDG, à la MET et à la FLT, d'après Jacobs *et al.* (81).

### TEP à la fluorocholine

En médecine nucléaire, on utilise la  $^{18}\text{F}$ -Fluorocholine essentiellement dans l'évaluation des récives de cancer de la prostate. Une étude récente a montré une complémentarité entre les informations apportées par la spectroscopie RMN *in vivo* et la TEP à la  $^{18}\text{F}$ -Fluorocholine dans l'étude de gliomes pour le ciblage des biopsies notamment (82). Des corrélations entre l'activité de la choline kinase  $\alpha$  et les résultats de l'imagerie n'ont pu être démontrées, vraisemblablement en raison d'une faible expression de cette enzyme dans les gliomes.

Garcia Vicente *et al.* (83) ont récemment montré que les informations métaboliques obtenues par TEP à la  $^{18}\text{F}$ -Fluorocholine pourraient prédire le pronostic des patients atteints de gliomes.

La Figure 9 montre un cas de récive de glioblastome hypofixant en FDG et qui présente une augmentation du métabolisme membranaire *via* une hyperfixation en TEP à la FCholine.

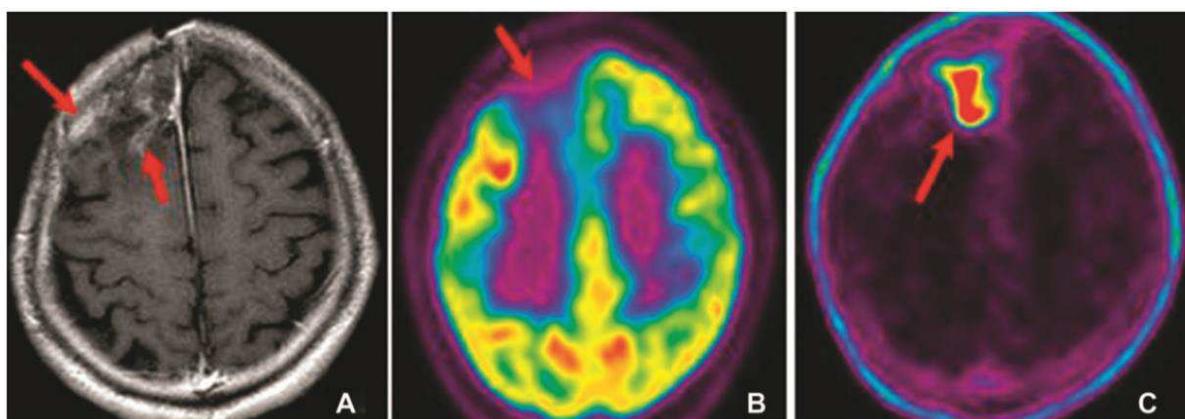


Figure 9 : Cas de récive de glioblastome : IRM après injection de gadolinium montrant des prises de contraste hétérogènes A), la TEP au FDG qui présente une hypofixation B) et la TEP à la FCholine qui montre une augmentation du métabolisme de la choline C), d'après Tan *et al.* (84).

### TEP au FMISO

Le  $^{18}\text{F}$ -misonidazole (FMISO) est un traceur de l'hypoxie. On observe une augmentation de la captation dans les tumeurs hypoxiques. Ce radiotracer permet une évaluation non invasive de l'hypoxie autour de la nécrose intra tumorale. L'hypoxie est un facteur de résistance au traitement et il a une valeur pronostique sur la localisation de la récive (85) (Figure 10).

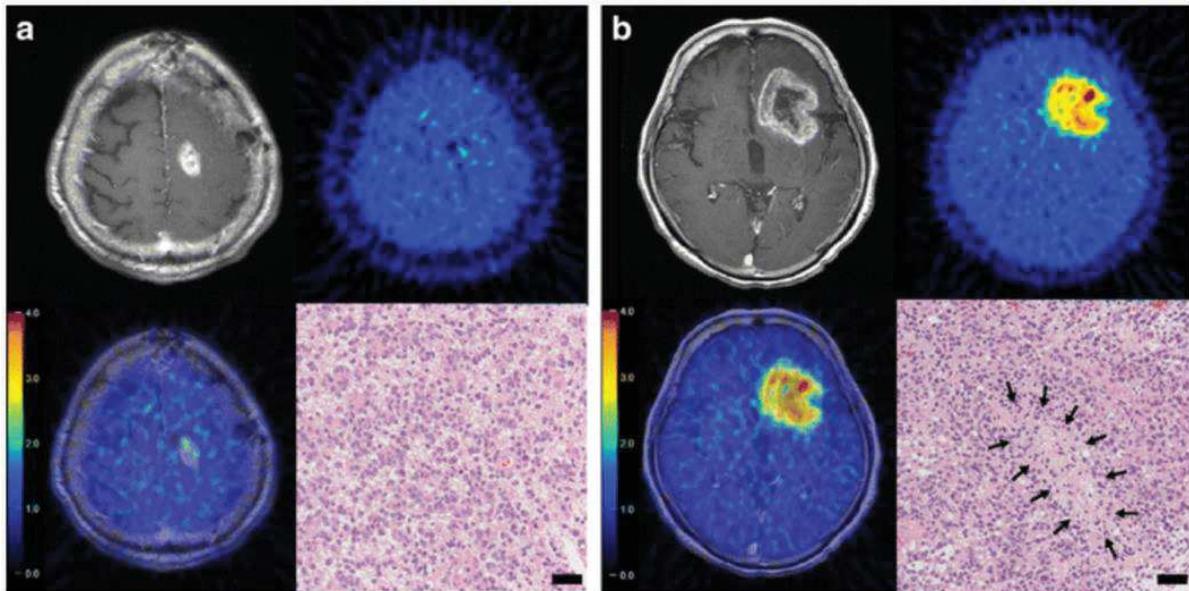


Figure 10 : Cas de glioblastome multifocal. L'IRM montre une prise de contraste pour les deux contingents tumoraux. Le contingent en a) est « FMISO-négatif » et le contingent en b) est « FMISO-positif » en corrélation avec les résultats de l'anatomo-pathologie montrant l'hétérogénéité de la tumeur, d'après Toyonaga *et al.* (85).

### 1.2.3. Prise en charge thérapeutique

Le gold standard du traitement des gliomes est la chirurgie. Une résection maximale est recommandée, la survie étant corrélée à la qualité de l'exérèse (86) (87). L'objectif fondamental est toutefois de préserver la qualité de vie, chez des patients ayant une espérance de vie réduite. Une chirurgie maximaliste ne doit alors pas être entreprise si elle altère le pronostic fonctionnel du patient. L'obtention d'une meilleure résection chirurgicale a été permise grâce à l'imagerie fonctionnelle et aux techniques de cartographie. La chirurgie éveillée a aussi permis d'améliorer le pronostic fonctionnel. Le traitement adjuvant standard des glioblastomes repose sur une radiothérapie externe concomitante à un traitement par témozolomide, selon le protocole EORTC/NCIC (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer/National Cancer Institute of Canada*) (88). Pour les glioblastomes, le protocole classique est le protocole STUPP (88). La radiothérapie externe délivre une dose totale de 60 Gray (Gy) en 30 fractions de 2 Gy, une fraction par jour, 5 jours par semaine. Une chimiothérapie adjuvante par témozolomide est délivrée par cure de 5 jours, tous les mois pendant 6 mois.

Les nitroso-urées sont un traitement de deuxième choix après le témozolomide pour le traitement des gliomes. Des analyses rétrospectives ou de sous-groupes suggèrent néanmoins une efficacité supérieure de la procarbazine, de la lomustine et de la vincristine par

rapport au témozolomide seul chez les patients « de bon pronostic » atteints de gliome anaplasiques (89).

Concernant la récurrence, le bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>) est le traitement standard dans les gliomes de haut grade. Néanmoins, il reste controversé et fait l'objet d'études avec prise en compte notamment du profil génétique. Seystahl *et al.* (90) ont montré que les agents alkylants ont une activité dans les glioblastomes récurrents, en particulier si une méthylation du promoteur MGMT est retrouvée.

Les dernières années ont vu l'avènement du développement des thérapies ciblées et personnalisées. L'étude des mécanismes moléculaires, des interactions entre les cellules tumorales et les cellules effectrices immunitaires dans le microenvironnement tumoral, a conduit à une nouvelle génération d'immunothérapies, y compris à des stratégies vaccinales et immunomodulatrices ainsi qu'à des traitements à base de lymphocytes T (47). L'utilisation de radioéléments en médecine nucléaire offre des perspectives pour les thérapies ciblées des gliomes (91) ; actuellement, les essais de phase III sont à développer.

Une méta-analyse a comparé le pronostic des patients atteints d'un glioblastome nouvellement diagnostiqué traité par thérapie ciblée combinée à la radiothérapie par rapport au témozolomide en monothérapie. Plusieurs essais thérapeutiques randomisés ont été réalisés afin de valider l'efficacité du bevacizumab en traitement de première et de deuxième intention, mais les résultats sont controversés en ce qui concerne la survie globale et la survie sans progression. D'autres médicaments anti-angiogéniques, dont le dasatinib (inhibiteur de tyrosine kinase ciblant le récepteur du PDGF), l'évérolimus (inhibiteur de mTOR), le cilengitide (ciblant des intégrines) et le cediranib et le valatinib (inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant le récepteur du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)) ont été étudiés dans plusieurs essais. La survie sans progression était meilleure, malgré un taux plus élevé d'effets indésirables, avec l'ajout de thérapies ciblées par rapport au traitement standard chez les patients porteurs d'un glioblastome nouvellement diagnostiqué. Néanmoins, par rapport au groupe témoin, le schéma posologique n'a pas prolongé la survie globale de façon significative (92).

Actuellement, les progrès dans le traitement des gliomes dépendent de la connaissance du métabolisme et de la biologie moléculaire de la tumeur. Il est nécessaire de comprendre les mécanismes de résistance au traitement. On peut travailler à différentes

échelles : ADN, ARN, protéines ou microenvironnement par exemple et cibler différents mécanismes, comme illustré ci-dessous (2) (Figure 11).

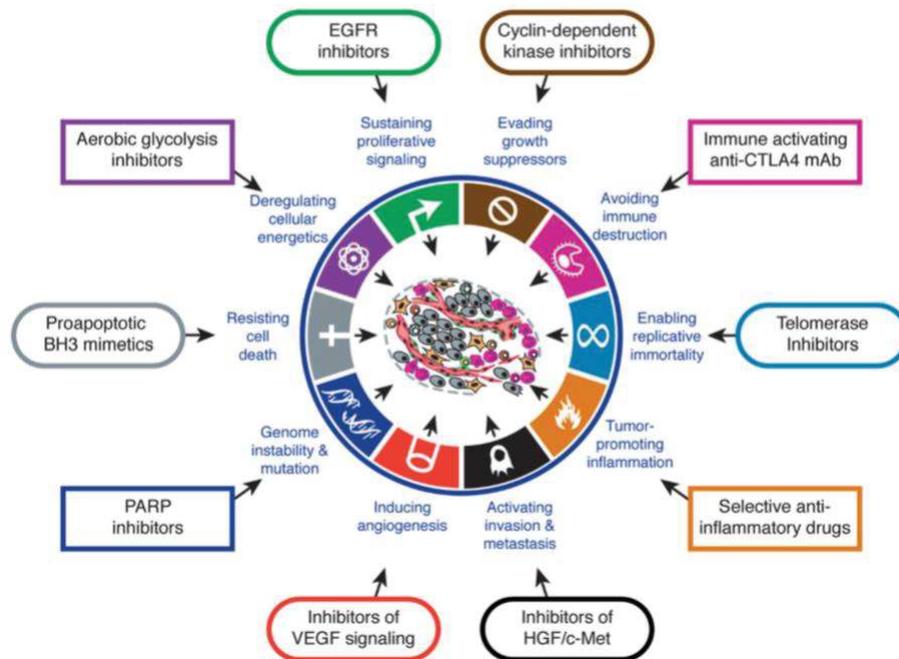


Figure 11 : Cibles thérapeutiques potentielles dans les cancers, d'après Hanahan et Weinberg (1) (2).

De nombreux essais thérapeutiques sont effectués dans les gliomes pour le développement de thérapies ciblées (93) (94). Quelques cibles potentielles sont exposées ici.

### 1.2.3.1. Cibler les voies de signalisation

La voie de signalisation de la PI3K est fréquemment activée de façon aberrante dans le glioblastome multiforme par mutation ou perte de PTEN. Les effets de LY294002, un inhibiteur biochimique de la PI3K, sur la réponse aux irradiations ont été examinés dans la lignée cellulaire U251 MG de gliome mutant PTEN. De faibles doses de LY294002 ont sensibilisé les cellules U251 MG à des doses de rayonnement pertinentes sur le plan clinique. L'inhibition de la PKB/Akt offre une excellente cible pour améliorer la radiosensibilité (95).

La voie mTOR peut être ciblée via l'utilisation du temsirolimus, analogue de la rapamycine (antibiotique inhibiteur de mTOR). Wick *et al.* (38) ont ainsi mis en évidence un sous-groupe de gliomes bénéficiant de l'inhibition de mTOR.

#### **1.2.3.2. Cibler les mutations**

La mutation IDH1 à l'origine d'une accumulation de 2-HG peut être ciblée (96). L'ivosidenib, utilisé dans les leucémies aiguës myéloïdes, est un inhibiteur d'IDH1. Ce médicament est en phase de développement pour le traitement des gliomes. D'autres approches peuvent être utilisées pour cibler IDH1 : ciblage de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), du métabolisme de la glutamine et des protéines de la famille Bcl-2. Ces approches offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Le traitement peut aussi être adapté en fonction du statut mutationnel MGMT. On a vu que la présence de la méthylation du promoteur de MGMT est prédictive de bonne réponse au traitement par témozolomide (97). Le statut MGMT a surtout une importance dans le choix du traitement pour les patients âgés (98).

EGFR peut être ciblée par radioimmunothérapie (99) en utilisant des radiotraceurs à visée thérapeutique. À cette fin, un anticorps monoclonal est utilisé comme traceur et marqué avec un isotope radioactif.

#### **1.2.3.3. Cibler le microenvironnement**

Le microenvironnement est également ciblé à différents niveaux.

L'importance de la néo-angiogénèse tumorale et la forte expression intra-tumorale du VEGF qui caractérisent les glioblastomes justifient tout particulièrement les approches thérapeutiques du blocage de la voie du VEGF. L'hypoxie est aussi une cible de choix et son étude peut être utilisée pour adapter la radiothérapie.

Les immunothérapies « anti-checkpoints » du microenvironnement sont des anticorps monoclonaux dirigés contre les points de contrôle du système immunitaire. Ils ciblent des récepteurs inhibiteurs présents à la surface des lymphocytes (CTLA-4, PD-1) ou leur ligands (PD-L1). Les inhibiteurs de CTLA-4, PD-L1 et PD-1 peuvent améliorer la survie des glioblastomes (100).

#### **1.2.3.4. Autres cibles possibles**

Différentes immunothérapies fondées sur l'utilisation de vaccins ont été testées dans les gliomes. À l'heure actuelle, aucune étude randomisée de phase III n'a montré un réel bénéfice de l'utilisation des vaccins dans le traitement des gliomes (101). Les études sont poursuivies notamment *via* l'utilisation de thérapies combinées.

De nombreux événements cellulaires sont contrôlés par les intégrines, comme la migration, l'adhérence cellulaire ou la prolifération et la différenciation. Le ciblage des intégrines est une autre option thérapeutique. Le ciblage de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  impliquée dans la néoangiogénèse a été étudié sur un modèle de xélogreffe de glioblastome de souris par marquage d'un anticorps monoclonal à l'Yttrium 90 (102).

Les cellules souches de gliomes peuvent aussi être ciblées. La résistance aux traitements est liée en partie aux cellules souches tumorales (103). L'identification de mécanismes épigénétiques moléculaires qui contrôlent l'auto-renouvellement des cellules souches de glioblastomes permet le développement d'approches thérapeutiques ciblées (104).

Une stratification du traitement des gliomes en fonction de l'âge et du statut fonctionnel (échelle de Karnofsky par exemple) est à prendre en compte (93). Les traitements actuels ne sont pas curatifs mais certains sous-groupes de patients pourraient bénéficier de protocoles thérapeutiques optimisés, de thérapies ciblées ou de l'immunothérapie dans certaines conditions.

L'hétérogénéité multimodale des tumeurs gliales constitue un défi thérapeutique majeur. Relever ce défi suppose une analyse fine des mécanismes de la tumorigénèse. La compréhension de la reprogrammation métabolique considérée comme une des propriétés fondamentales des cellules cancéreuses, intégrée par Hanahan *et al.* (2), est l'une des clés de ce défi. Gerlinger *et al.* (9) insistent sur la nécessité d'analyser de manière exhaustive la tumeur.

### **1.3. Métabolisme cellulaire et cancer**

Le cancer est une maladie complexe induisant de nombreuses modifications spatio-temporelles de la physiologie cellulaire et conduisant à une croissance anormale. Dans une étude historique, Hanahan et Weinberg (1) ont suggéré que six altérations essentielles de la physiologie cellulaire pourraient être à la base de la croissance cellulaire anormale dans la plupart des cancers : 1) autosuffisance en signaux de croissance, 2) insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, 3) fuite de l'apoptose, 4) potentiel de réplication illimitée, 5) néoangiogénèse et 6) invasion tissulaire et métastases. L'instabilité du génome, conduisant à une augmentation de la capacité de mutations, a été considérée comme le point essentiel permettant d'alléguer ces six caractéristiques.

Outre les six caractéristiques reconnues du cancer, la glycolyse aérobie (effet Warburg), résultant d'une respiration mitochondriale endommagée, constitue également une caractéristique métabolique commune de la plupart des tumeurs. Bien qu'aucune mutation génétique spécifique ou anomalie chromosomique ne soit commune à tous les cancers, presque tous expriment une glycolyse aérobie avec une surexpression des gènes impliqués. La glycolyse aérobie dans les cellules cancéreuses entraîne une absorption élevée de glucose avec la production d'acide lactique en présence d'oxygène. Ce phénotype métabolique sous-tend l'imagerie TEP au FDG et est devenu un outil important pour la détection et la gestion de la plupart des cancers.

Otto Warburg avait initialement proposé que la glycolyse aérobie fût l'épiphénomène d'un problème plus fondamental de physiopathologie des cellules cancéreuses, c'est-à-dire une respiration altérée ou endommagée liée à un dysfonctionnement mitochondrial. Un flux glycolytique accru a été considéré comme un mécanisme compensatoire essentiel de la production d'énergie afin de maintenir la viabilité des cellules tumorales. Bien que la glycolyse aérobie et la glycolyse anaérobie soient similaires en ce qui concerne la production d'acide lactique, la glycolyse anaérobie découle de l'absence d'oxygène (fermentation lactique, effet Pasteur) alors que la glycolyse aérobie peut survenir dans les cellules tumorales au cours d'une respiration endommagée. Seules les cellules capables d'augmenter la glycolyse au cours d'une respiration endommagée ont été considérées comme susceptibles de former des cancers. En revanche, les cellules normales, incapables d'élever le niveau de glycolyse en réponse à des troubles respiratoires, périraient en raison d'un manque d'énergie. Les cellules cancéreuses proviendraient donc de cellules normales subissant un endommagement progressif et irréversible de leurs capacités respiratoires. La glycolyse aérobie, résultant d'une respiration endommagée, est le phénotype le plus répandu dans le cancer. Aujourd'hui, il est largement admis que l'effet Warburg et les anomalies métaboliques exprimées dans les cellules cancéreuses résultent principalement des mutations génomiques survenues au cours de la progression tumorale.

Pour se développer, les tumeurs ont besoin d'énergie (*via* l'ATP) et de biomasse (acides aminés) pour produire des protéines et des membranes nécessaires à leur développement. Le glucose et la glutamine sont les deux substrats essentiels pour la croissance des cellules tumorales, notamment pour la glycolyse et le cycle de TCA. D'autres nutriments (lipides et acides aminés par exemple) sont aussi des sources importantes d'ATP

et/ou des précurseurs pour la biosynthèse de métabolites dans différentes voies. Les lipides, dont les acides gras, contribuent à la croissance cellulaire tumorale. Les cellules présentant la protéine *Ras* mutée (protéine oncogène) récupèrent par exemple les acides gras libres de l'environnement extracellulaire pour proliférer (105). Différentes voies métaboliques sont utilisées pour la production d'acides aminés indispensables pour la prolifération cellulaire. Concernant le métabolisme anabolique, la voie de la sérine est ainsi cruciale pour la conversion du glucose (106). La Figure 12 représente une version simplifiée des changements métaboliques classiquement observés dans les cancers, avec notamment une augmentation de la glycolyse aérobie, une augmentation de la production de lactate, une augmentation de l'anabolisme des nucléotides, des acides aminés et des lipides et une augmentation de la glutaminolyse. La voie des pentoses phosphates (PPP) est plus sollicitée également (2).

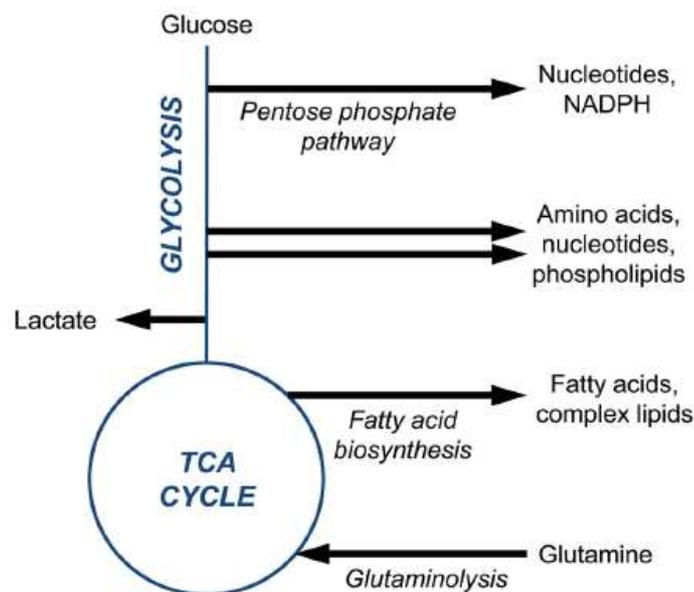


Figure 12 : Schéma simplifié des modifications métaboliques observées dans les cancers, d'après Armitage *et al.* (107).

Le métabolisme lui-même peut influencer l'initiation et la progression d'un cancer. Des études cliniques ont établi un lien entre l'altération du métabolisme de l'ensemble de l'organisme, le développement du cancer et la réponse au traitement. Par exemple, l'obésité, l'hyperglycémie et l'insulinorésistance sont toutes associées à un risque accru de développer un cancer et sont associées à un mauvais pronostic (108).

### 1.3.1. Énergétique de la cellule vivante

Pour que les cellules restent viables et puissent remplir leurs fonctions programmées génétiquement, elles doivent produire de l'énergie utilisable. Cette énergie est généralement stockée dans l'ATP et est libérée lors de l'hydrolyse de la liaison phosphate terminale. L'énergie standard de l'hydrolyse de l'ATP dans des conditions physiologiques est appelée  $\Delta G'_{ATP}$  et est étroitement régulée dans les cellules à -56 kJ/mol (109). La majeure partie de cette énergie est utilisée pour alimenter les pompes ioniques de la membrane cellulaire. Dans les cellules dotées de mitochondries fonctionnelles, cette énergie provient principalement de la phosphorylation par oxydation, qui produit environ 88% de l'énergie cellulaire totale (28 des 32 molécules d'ATP). Les 12% restant de l'énergie sont produits à peu près également par la phosphorylation au cours de la glycolyse dans le cytoplasme (2 ATP) et par le cycle de TCA dans la matrice mitochondriale (2 ATP).

La constance du  $\Delta G'_{ATP}$  de -56 kJ/mol est fondamentale pour l'homéostasie cellulaire, quels que soient les types cellulaires, quel que soit le potentiel membranaire, que la cellule soit dotée de mitochondries ou non (érythrocyte), qu'elle soit normale ou cancéreuse. Le maintien du  $\Delta G'_{ATP}$  est le « point final » des processus tant génétiques que métaboliques et toute perturbation de ce niveau d'énergie compromettrait le fonctionnement et la viabilité des cellules. Les cellules peuvent mourir aussi bien de trop peu d'énergie que de trop d'énergie. Trop peu d'énergie conduira à la mort cellulaire par des mécanismes nécrotiques ou apoptotiques, alors qu'une surproduction d'ATP perturbera l'équilibre de Gibbs-Donnan, modifiera le fonctionnement des pompes membranaires, inhibera la respiration et la viabilité. La glutaminolyse, comme la glycolyse, sert également à maintenir un  $\Delta G'_{ATP}$  suffisant pour assurer la viabilité des cellules souffrant d'une déficience mitochondriale. Ceci peut compenser les carences en glycolyse ou en phosphorylation oxydative, et peut représenter une source d'énergie majeure pour les cancers dépendant de la glutamine. Une dépendance prolongée à la glutamine provoque l'instabilité du génome, des troubles cellulaires et une entropie accrue, tous caractéristiques du cancer.

En résumé, la différence majeure entre le métabolisme d'une cellule normale et d'une cellule cancéreuse réside dans l'origine de l'énergie produite plutôt que dans la quantité d'énergie produite. La cellule cancéreuse, qui a des difficultés dans la phosphorylation par oxydation au niveau de la mitochondrie, utilise principalement la glycolyse aérobie et/ou la glutaminolyse pour produire de l'énergie. Même s'il est admis que ces modifications ne sont

que le symptôme du cancer et non la cause, les recherches sur le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses suscitent un regain d'intérêt, notamment dans la perspective des approches thérapeutiques qui ciblent spécifiquement ces voies énergétiques.

Il est essentiel de comprendre quelles sont les voies métaboliques utilisées et comment les cellules tumorales régulent leur métabolisme pour mieux adapter les traitements.

Le contrôle de la croissance cellulaire dépend aussi des différents régulateurs du métabolisme avec notamment le niveau d'oxygène qui joue un rôle déterminant dans le contrôle de la croissance cellulaire. Les mutations génétiques impliquées dans les tumeurs jouent également un rôle majeur. L'environnement tumoral doit également être considéré.

#### ***1.3.1.1. Métabolisme du glucose***

Le glucose est le principal substrat utilisé par les cellules tumorales pour se développer. Son métabolisme est complexe. Il est stocké dans le foie et dégradé dans le cytosol puis dans la mitochondrie où il est utilisé pour la phosphorylation oxydative à des fins de production énergétique. Ce catabolisme glucidique se fait *via* la glycolyse. Outre la production d'énergie le métabolisme glucidique permettra la production de différents acides aminés notamment par l'augmentation de la synthèse des intermédiaires de la glycolyse dans les cellules tumorales. Ceux-ci seront utilisés par d'autres voies métaboliques (voie de la sérine-glycine ou voie des pentoses phosphates par exemple). L'état d'oxydoréduction des cellules se verra modifié également.

#### **Transporteurs du glucose : GLUT 1**

Les transporteurs GLUT sont un large groupe de protéines membranaires qui assurent le transport du glucose dans la cellule. Parmi eux, le transporteur GLUT1, codé par le gène *SLC2A1*, permet une diffusion facilitée du glucose sanguin vers les cellules. La plupart des cellules tumorales sur-expriment GLUT1. La visualisation de l'augmentation du glucose en TEP au FDG est liée en majeure partie à cette sur-expression.

L'expression des transporteurs du glucose et des enzymes impliquées dans la glycolyse est contrôlée par l'oncogène *Ras* et HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) (110) (111) (112). La protéine *Ras* mutée conduit à une augmentation de GLUT1. La voie Pi3Akt favorise l'expression du transporteur de glucose GLUT1.

## Glycolyse

La glycolyse est la principale voie du métabolisme glucidique, c'est la première étape d'oxydation du glucose. Elle permet la synthèse de pyruvate et de molécules riches en énergie (4 ATP et 2 NADH, H<sup>+</sup>). Une molécule de glucose conduit à 2 pyruvates.

*En aérobiose* : le pyruvate est utilisé comme substrat du cycle de TCA, pour la synthèse de lipides et pour la synthèse d'acides aminés. Le métabolisme du pyruvate conduit à la formation d'un NADH, H<sup>+</sup>.

Le cycle de TCA fonctionne uniquement en condition aérobie. Le cycle de TCA est le point final commun de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphates, du métabolisme lipidique et des acides aminés. Il se déroule dans la mitochondrie. À partir de l'acétyl-CoA, il conduit à la production d'ATP par des oxydations successives avec libération d'énergie. Les hydrogènes et les électrons riches en énergie sont alors pris en charge par FAD et NAD<sup>+</sup>. Cette énergie est ensuite utilisée lors de la phosphorylation oxydative pour la production d'ATP. La glycolyse aérobie *via* la phosphorylation oxydative permet classiquement la production de 36 ATP pour une molécule de glucose dans les cellules « normales. ». L'oxygène est nécessaire comme accepteur final d'électrons pour oxyder complètement le glucose, il est essentiel pour ce processus.

*En anaérobiose* : le pyruvate sera transformé en lactate par la lactate déshydrogénase avec consommation d'un NADH, H<sup>+</sup>. Le bilan énergétique total de la glycolyse anaérobie est de 2 ATP (113).

La glycolyse et la respiration mitochondriale (cycle de TCA et phosphorylation oxydative) sont les deux voies principales pour la production énergétique dans les cellules « normales ». Lors de l'étude du métabolisme tumoral, on observe une hypercaptation de glucose par les cellules cancéreuses. En effet, la glycolyse aérobie est empruntée par différents cancers. Mais, les cellules cancéreuses utilisent également la fermentation lactique pour la production d'énergie, avec une production de lactate indépendamment de la présence d'oxygène. On parle d'effet Warburg (114) (115).

Le lactate est probablement le seul composé métabolique impliqué et nécessaire dans toutes les principales étapes de la cancérogenèse, notamment l'angiogenèse, l'immunité, la migration cellulaire, la formation de métastases et le métabolisme autosuffisant (116).

## Effet Warburg

En 1926, Warburg observait pour la première fois une hyperactivité glycolytique dans les cellules tumorales avec une surproduction de lactate même en présence d'oxygène (117) (Figure 13). Le cycle de TCA et la respiration mitochondriale ne semblaient pas privilégiés par les cellules tumorales. La glycolyse étant stimulée, on observe alors une surconsommation de glucose, visible en TEP au FDG.

*Pourquoi les cellules tumorales préfèrent-elles un métabolisme moins efficace ?*

Une des explications possibles serait que la production limitée d'ATP poserait uniquement un problème en cas de ressources limitées. Or les cellules tumorales sont exposées à un apport continu de glucose et autres nutriments *via* les modifications métaboliques qu'elles induisent. Le problème de ressources n'est ainsi pas un réel facteur limitant (118).

Une seconde explication pour le switch vers la glycolyse aérobie est que les demandes métaboliques des cellules proliférantes vont au-delà de l'ATP avec des besoins en nucléotides, lipides et acides aminés. En sus de la production d'ATP, le glucose va alors être utilisé pour générer de la biomasse. L'effet Warburg représenterait donc la réorientation du métabolisme cellulaire vers la production de précurseurs carbonés pour la biosynthèse des nucléotides et des lipides (118) (119) (120).

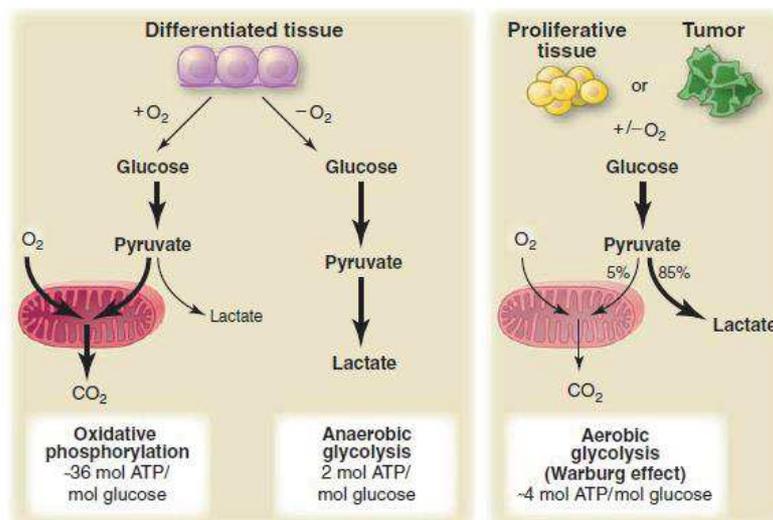


Figure 13 : Représentation schématique des différences entre la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie et la glycolyse aérobie (effet Warburg), d'après Vander Heiden (118).

Il est important de préciser que malgré l'effet Warburg, les cellules cancéreuses génèrent quand même de l'ATP à partir de la chaîne de transport des électrons, mais en quantité moindre. Il existe par exemple un sous type de tumeurs gliales associé à une translocation chromosomique impliquant le gène codant le récepteur FGFR3 qui présente un métabolisme OXPHOS (121). Ceci reflète l'hétérogénéité métabolique des tumeurs, confirmée dans des modèles de greffes orthotopiques de glioblastomes (122).

### Régulation enzymatique de la glycolyse

Les tumeurs modifient l'expression de plusieurs enzymes glycolytiques : l'hexokinase 2 (HK2), la phosphofruktokinase 2 (PFK2) et la pyruvate kinase isoenzyme type M2 (PKM2).

- **Hexokinases** : ce sont des enzymes cytosoliques qui interviennent lors de la première étape de la glycolyse pour convertir le glucose en glucose-6-phosphate. Le glucose est leur principal substrat dans le métabolisme cellulaire normal. Ces enzymes ont 2 isoformes : HK1 et HK2. Dans les cellules tumorales, leur expression est modifiée avec par exemple une surexpression de HK2 dans les glioblastomes induisant une augmentation de la prolifération cellulaire tumorale. C'est la voie de signalisation PI3/Akt qui est à l'origine de cette dernière (123).
- **PFK2** : c'est une enzyme codée par le gène PFKFB3, situé sur le chromosome 10. Elle est responsable de la transformation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate. L'inhibition de PFK2 entraîne une diminution du taux de 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate, un des produits de la voie des pentoses phosphates et un des précurseurs pour la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Ainsi, la surexpression de PFK2 est à l'origine d'une augmentation de la prolifération cellulaire tumorale (124).
- **PKM2** : cette enzyme est impliquée dans la dernière étape de la glycolyse avant transformation en pyruvate. C'est l'isoforme M2, retrouvée dans les cellules cancéreuses, qui entraîne une augmentation de la production d'énergie (ATP) *via* l'effet Warburg s'il est actif (tétramère). On peut aussi observer une accumulation d'intermédiaires vers d'autres voies métaboliques (diminution du flux de carbone à travers la glycolyse) lorsque PKM2 est sous forme de dimère. Les facteurs de croissance agissent alors sur la pyruvate kinase et facilitent la redirection vers la voie

des PPP ainsi que vers la biosynthèse des acides aminés (125). PKM2 est une autre cible thérapeutique potentielle en cancérologie (126).

### **Cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) (127) (128) (129) (130) (131)**

Le cycle TCA, également connu sous le nom de cycle d'acide citrique ou cycle de Krebs, est une série de réactions en boucle fermée qui forme un moteur métabolique dans les cellules (Figure 14). Le cycle TCA constitue le centre du métabolisme cellulaire. Le cycle TCA commence par la réaction qui combine l'acétyl-CoA à 2 carbones (générés à partir d'acides gras, d'acides aminés ou d'oxydation du pyruvate) avec un oxaloacétate (OAA) à 4 carbones pour produire le citrate, molécule à 6 carbones. Dans la deuxième étape, le citrate est converti en son isomère, l'isocitrate. Le cycle se poursuit avec deux décarboxylations oxydatives au cours desquelles l'isocitrate est converti en  $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ -KG) à 5 carbones puis en succinyl-CoA à 4 carbones et la libération de 2 molécules de CO<sub>2</sub> et la génération de 2 molécules NADH. Ensuite, le succinyl-CoA est converti en succinate et génère du GTP, qui peut être converti en ATP. Le succinate est oxydé en fumarate à 4 carbones. Dans cette réaction, 2 atomes d'hydrogène sont transférés au FAD, produisant 2 FADH. Il est important de noter que l'enzyme qui effectue cette étape, la succinate déshydrogénase (SDH), fait également partie de la chaîne de transport d'électrons. Ensuite, le fumarate est converti en malate et plus loin en OAA qui se combine avec une autre molécule d'acétyl-CoA pour perpétuer le cycle TCA.

Au cours du cycle, les métabolites du cycle sont transportés dans le cytosol où ils fournissent les éléments de base de la synthèse des macromolécules. Il est important de noter que lorsque les intermédiaires du cycle TCA sont éloignés des mitochondries à des fins de biosynthèse, le cycle doit être renouvelé pour qu'il continue de fonctionner (réaction anaplérotique). Il y a plusieurs entrées dans le cycle TCA, mais deux mécanismes anaplérotiques importants sont la conversion du pyruvate en OAA mitochondrial par la pyruvate décarboxylase et l'activation de la glutaminolyse, qui convertit la glutamine en glutamate puis en  $\alpha$ -KG. Ce dernier mécanisme est souvent utilisé lorsque les niveaux d' $\alpha$ -KG chutent en raison de l'exportation de citrate des mitochondries dans le cytosol pour la synthèse *de novo* des lipides. Fait intéressant, dans les cas où la chaîne de transport d'électrons est altérée, la génération de certains intermédiaires du cycle TCA peut être maintenue par un processus appelé carboxylation réductrice dépendante de la glutamine. Dans cette voie, le

cycle s'inverse partiellement pour générer du citrate à partir de  $\alpha$ -KG dérivé de la glutamine par deux réactions ultérieures catalysées par l'isocitrate déshydrogénase 2 (IDH2) dépendant du NADPH et par l'aconitase (ACO).

Du point de vue de la génération d'énergie, la fonction principale d'un tour du cycle du TCA est d'oxyder l'acétyl-CoA en deux molécules de  $\text{CO}_2$ . L'achèvement du cycle TCA génère de l'ATP et des sous-produits (3 NADH et 1  $\text{FADH}$ ,  $\text{H}^+$ ) qui alimentent davantage le complexe I (NADH déshydrogénase) et le complexe II (SDH) de la chaîne de transport d'électrons. Les complexes I et II passent ensuite leurs électrons à travers la chaîne de transport d'électrons pour finalement produire de l'ATP par phosphorylation oxydative (OXPHOS). Le cycle TCA et OXPHOS sont couplés car l'oxydation de NADH et  $\text{FADH}$ ,  $\text{H}^+$  dans les complexes I et II est nécessaire pour que le cycle TCA continue de fonctionner.

La régulation du cycle TCA et sa rétroaction constante avec OXPHOS est essentielle pour maintenir les cellules dans un état stable. Il existe plusieurs régulateurs du flux métabolique dans le cycle TCA. Le NADH inhibe toutes les enzymes régulatrices du cycle TCA. Ainsi, dans les situations de dysfonctionnement de la chaîne de transport d'électrons, le NADH s'accumule et le cycle TCA s'arrête. Comme le NADH génère de l'ATP *via* la chaîne de transport d'électrons et l'OXPHOS, l'ATP est également un inhibiteur de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et de l'IDH. Ainsi, lorsque les cellules ont suffisamment de NADH et d'ATP, le cycle ralentit. En revanche, les demandes élevées d'ATP augmentent le rapport  $\text{ADP} / \text{ATP}$  et les niveaux d'AMP, ce qui entraîne une stimulation des enzymes régulatrices du cycle TCA. L'acétyl-CoA abondant inhibe la PDH mais active la pyruvate carboxylase pour augmenter la formation d'OAA à partir du pyruvate et ainsi coupler les niveaux des deux métabolites initiateurs du cycle. Un autre régulateur intrinsèque est le succinyl-CoA, qui inhibe à la fois la citrate synthase et l' $\alpha$ -KG déshydrogénase pour ralentir le cycle. De même, une augmentation de l'OAA inhibe la SDH et ralentit le cycle.

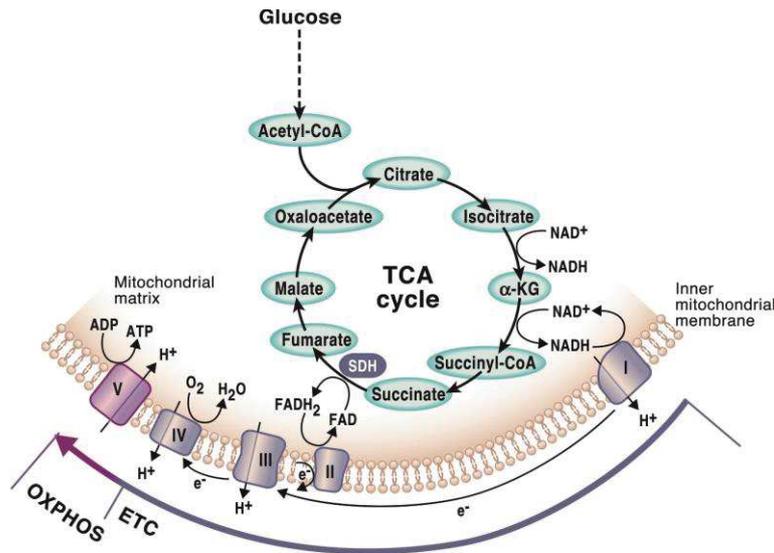


Figure 14 : Coordination entre le cycle TCA et OXPHOS, d'après Martinez-Reyes et Chandel (130).

#### *Acétyl-CoA :*

L'acétyl-CoA est un thioester entre le groupe acétyle à deux carbones ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) et un thiol, la coenzyme A (CoA). Le maintien d'un pool d'acétyl-CoA est crucial pour maintenir l'activité du cycle TCA. Pour ce faire, dans les mitochondries, l'acétyl-CoA peut être généré par l'oxydation du pyruvate, par l'oxydation des acides gras, par la dégradation des acides aminés (leucine, isoleucine et tryptophane) ou par le biais de la famille des chaînes courtes de l'enzyme mitochondriale acétyl-CoA synthétase à partir de la conversion de l'acétate. L'acétyl-CoA peut également être généré dans le cytosol, soit à partir du citrate, soit à partir de l'acétate. Bien que ce ne soit pas une voie physiologique courante, les cellules cancéreuses dépendent de cette dernière voie pour répondre au stress métabolique provoqué par la disponibilité limitée des nutriments. L'acétyl-CoA agit comme intermédiaire métabolique et comme précurseur des réactions anaboliques dans la synthèse des acides gras et des stéroïdes, et de certains acides aminés, dont le glutamate, la proline et l'arginine.

Par ailleurs, les dernières études mettent en évidence que l'acétyl-CoA n'est pas seulement un donneur passif de groupe acétyle mais plutôt une molécule de signalisation importante impliquée dans la régulation de l'activité de facteurs de transcription spécifiques et de marques d'histones qui dictent finalement les fonctions cellulaires en régulant l'expression des gènes. Une acétylation élevée des histones due à des niveaux élevés d'acétyl-CoA amène les cellules à un état pro-anabolique augmentant l'expression des gènes impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaires, y compris les enzymes glycolytiques. Ainsi, les

cellules cancéreuses régulent positivement les enzymes génératrices d'acétyl-CoA pour augmenter leur capacité de prolifération.

*α-cétoglutarate (α-KG) :*

L'α-KG, également connu sous le nom de 2-oxoglutarate, est un co-substrat obligatoire pour un grand groupe d'enzymes (2-OGDD, *2-oxoglutarate dependent dioxygenases*) qui catalysent les réactions d'hydroxylation sur divers types de substrats, y compris les protéines, acides nucléiques, lipides et intermédiaires métaboliques produisant du CO<sub>2</sub> et du succinate. Ces réactions d'hydroxylation nécessitent également du Fe<sup>2+</sup> comme cofacteur et de l'O<sub>2</sub> comme co-substrat. L'acide ascorbique (vitamine C) participe également à ces réactions en réduisant le Fe<sup>3+</sup> oxydé en Fe<sup>2+</sup>.

L'activité des 2-OGDD dépend du rapport intracellulaire de l'α-KG au succinate ou à d'autres inhibiteurs tels que le fumarate et le 2-HG. Chez l'Homme, les 2-OGDD jouent un rôle clé dans les réponses à l'hypoxie *via* la régulation du facteur de transcription HIF-1, maître régulateur de l'homéostasie de l'O<sub>2</sub>. Dans des conditions d'hypoxie relative ou à des niveaux réduits d'α-KG ou de Fe<sup>2+</sup>, l'activité des 2-OGDD est altérée, ce qui entraîne une accumulation et une translocation de HIF-1α ou HIF-2α vers le noyau où les changements dans l'expression des gènes liés au métabolisme seront favorisés.

L'α-KG est également un substrat requis de certaines enzymes modifiant la chromatine (KDM2-7), y compris le domaine Jumonji C contenant des lysine déméthylases, qui sont impliquées dans la déméthylation de l'ADN. Il a été récemment rapporté que l'activité des certaines KDM sont sensibles aux changements des niveaux d'O<sub>2</sub>. La méthylation de l'ADN modifie les structures chromatiques et diminue généralement l'expression des gènes en changeant la structure d'un seul nucléotide. La disponibilité de l'α-KG a donc un impact direct sur l'expression des gènes et peut donc moduler la décision du devenir cellulaire (Figure 15).

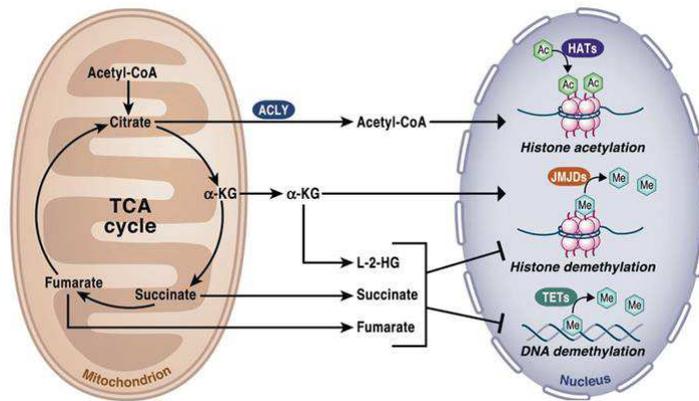


Figure 15 : Influence du cycle TCA sur la chromatine et la méthylation de l'ADN, d'après Martinez-Reyes et Chandel (130).

### 2-hydroxyglutarate (2-HG) :

Bien que le 2-HG ne fasse pas partie intégrante du cycle TCA, ce métabolite dérivé de l' $\alpha$ -KG peut être généré par des enzymes dans la matrice mitochondriale et le cytosol. Le 2-HG inhibe de manière compétitive les 2-OGDD et influence la méthylation de l'ADN. Il existe deux isomères : L-2-HG et D-2-HG, dont l'abondance est limitée dans les tissus normaux. Mais ils peuvent atteindre des concentrations milli-molaires dans certaines conditions pathologiques : l'isomère D-2-HG est accumulé à la suite de mutations dans les isoformes cytosolique (IDH1) et mitochondriale (IDH2). Fait intéressant, IDH1 et IDH2 sont les gènes métaboliques les plus fréquemment mutés dans les cancers chez l'Homme, y compris dans les gliomes. IDH1 ou IDH2 provoquent une affinité accrue pour le NADPH et favorisent la réduction de l' $\alpha$ -KG au détriment de son substrat principal, l'isocitrate. L'accumulation de D-2-HG dans les tumeurs, notamment les gliomes, a incité la communauté scientifique à utiliser pour la première fois le terme d'onco-métabolite. Actuellement, le D-2-HG est utilisé comme biomarqueur pour surveiller la progression des gliomes et des inhibiteurs spécifiques aux mutants IDH1 / IDH2 sont en cours d'essais cliniques. De plus, le D-2-HG peut être produit par l'activité la phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH), une enzyme fréquemment surexprimée dans le cancer. Normalement, cette enzyme catalyse la première étape de la voie *de novo* de la biosynthèse des sérines où le 3-phosphoglycérate (3PG) est converti en 3-phosphohydroxypyruvate (3PHP) couplé à une réduction de  $\text{NAD}^+$ .

Les malate déshydrogénases (MDH1 et MDH2) et les lactate déshydrogénases (LDH-A et LDH-C) peuvent générer du L-2-HG. La MDH2 et la MDH1 catalysent

normalement la conversion de l'OAA en malate dans les mitochondries et le cytosol. La conversion de  $\alpha$ -KG en L-2-HG par les MDH est couplée à l'oxydation du NADH en NAD<sup>+</sup>. Dans des conditions normales, les LDH catalysent l'inter conversion du lactate et du pyruvate. Cependant, en conditions d'hypoxie, la LDH-A peut générer du L-2-HG. La capacité des cellules à augmenter le L-2-HG dans des conditions hypoxiques pour réguler les niveaux de méthylation des histones et pour réduire le stress cellulaire réducteur en inhibant les voies métaboliques clés indique un rôle physiologique important. Le pH acide a également été décrit comme un puissant moteur de la production de L-2-HG en favorisant l'activité des enzymes LDH-A et MDH qui utilisent l' $\alpha$ -KG comme substrat alternatif. L'inhibition des enzymes impliquées dans la reconversion du L-2-HG en  $\alpha$ -KG explique également l'accumulation résultante de L-2-HG observée dans les microenvironnements acides (132) (133). Il est important de noter que les niveaux accumulés de L-2-HG à pH acide conduisent à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  en normoxie. Comme la disponibilité de l' $\alpha$ -KG influence directement la production de L-2-HG, ces résultats offrent la possibilité de manipuler les niveaux d' $\alpha$ -KG comme stratégie thérapeutique potentielle dans l'acidose.

Le 2-HG peut être reconverti en  $\alpha$ -KG grâce à l'action de l'enzyme liée au FAD 2-hydroxyglutarate déshydrogénase (2-HGDH), D-2-HGDH et L-2-HGDH, toutes deux situées dans la mitochondrie. Une carence en l'une ou l'autre de ces deux enzymes peut conduire à une maladie connue sous le nom d'acidurie 2-hydroxyglutarique (L-2-HGA). Il a notamment été signalé que des enfants atteints de L-2-HGA développaient un médulloblastome ou un glioblastome ou une tumeur de Wilms. De plus, des niveaux accrus de L-2-HG résultant d'une expression réduite de L-2-HGDH ont été observés dans le cancer du rein, ce qui suggère également un effet oncogène potentiel pour cet isomère.

#### *Succinate :*

Le succinate est un métabolite du cycle TCA qui a de multiples fonctions intracellulaires, ainsi que des fonctions organiques. Le succinate est aussi considéré comme un onco-métabolite qui s'accumule en raison des mutations inactivantes de la SDH. Les mutations SDH se retrouvent couramment dans plusieurs cancers, dont le paragangliome héréditaire et le phéochromocytome. L'accumulation de succinate a un impact sur la régulation de l'expression des gènes et favorise la tumorigenèse par le biais de deux mécanismes principaux. Premièrement, il est le produit de réactions enzymatiques du 2-

OGDD et donc son accumulation inhibe ces enzymes. Par conséquent, les variations quantitatives dans le succinate ont des effets profonds sur les histones et la méthylation de l'ADN, qui changent le paysage épigénétique des cellules et l'expression des gènes. L'hyperméthylation de l'ADN a été associée au silence de gènes clés impliqués dans la différenciation neuroendocrine favorisant la malignité. Deuxièmement, l'inhibition des 2-OGDD par le succinate favorise l'accumulation de HIF-1 $\alpha$  en présence d'oxygène, un phénomène connu sous le nom de pseudohypoxie.

#### *Fumarate :*

Le fumarate favorise la croissance tumorale grâce à diverses fonctions de signalisation. En concentration millimolaire, l'accumulation de fumarate due à des mutations inactivatrices de la fumarate hydratase (FH) est présente dans le trouble génétique nommé acidurie fumarique, ainsi que dans le cancer papillaire du rein, pathologies dans lesquelles le fumarate provoque une hyperméthylation de l'ADN. Le fumarate est un inhibiteur des enzymes 2-OGDD et ainsi contribue également à l'état de pseudohypoxie qui caractérisait les tumeurs déficientes en FH en permettant la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  aussi en conditions normoxiques. Le fumarate est un électrophile et peut provoquer la succination des protéines, un processus où le fumarate se lie aux résidus réactifs de cystéine de la protéine thiol et les inactive.

D'autres études ont montré que des niveaux élevés de fumarate augmentent la production des ROS en liant le glutathion (GSH).

#### **1.3.1.2. Métabolisme de la glutamine**

La glutamine est l'acide aminé circulant le plus abondant du corps humain ; il représente plus de 20% des acides aminés libres du sang, et 40% de ceux du muscle (134).

Elle est également l'acide aminé le plus consommé par les cellules cancéreuses. La glutamine est utilisée pour la synthèse des nucléotides (bases puriques et pyrimidiques fabriquées à partir d'azote réduit) et des lipides et pour synthétiser du glutamate qui peut être converti en  $\alpha$ -KG, substrat du cycle de TCA. Le glutamate, quant à lui, est le donneur d'azote primaire de biosynthèse des acides aminés non essentiels.

La glutamine est considérée comme un acide aminé non essentiel, car elle peut être recyclée à partir du glutamate et de l'ammoniac dans une réaction catalysée par la glutamine synthétase. Cependant, la glutaminolyse (conversion de la glutamine en glutamate pour la production d'énergie *via* le lactate) est augmentée dans les cellules cancéreuses (135) et certaines sont incapables de croître en l'absence de glutamine (136) (137) (138) (139) (137) (140) (141) (142). La conversion de la glutamine en glutamate a par exemple été explorée dans les carcinomes hépatocellulaires qui présentent une « addiction à la glutamine » (77).

### **Métabolisme énergétique : glutamine pour la production d'ATP**

La glutamine contribue à la production d'ATP en utilisant des réactions d'oxydation. En effet, dans les cellules proliférantes, la déplétion en glutamine réduit considérablement le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> et inhibe la consommation d'oxygène (143). La phosphorylation oxydative induite par la glutamine est un moyen majeur de production d'ATP même dans les cellules cancéreuses hypoxiques (143).

Mais la glutamine a surtout un rôle important, en tant que donneur de carbone, pour fournir des intermédiaires du cycle de TCA lorsque ceux-ci sont diminués (108) (144). La glutaminase permet la conversion de la glutamine en glutamate qui est transformée en  $\alpha$ -KG. La glutaminase a 2 principales isoformes : glutaminase 1 et glutaminase 2 qui peuvent avoir des effets opposés sur la prolifération cellulaire (145). C'est l'oncogène MYC qui entraîne la désamination de la glutamine en glutamate *via* son action sur la glutaminase 1 (137) (140). La glutaminase 2 est régulée par le gène suppresseur de tumeur p53 et influence l'état d'oxydo-réduction de la cellule (146). Concernant l'état d'oxydo-réduction de la cellule, les produits du métabolisme de la glutamine jouent un rôle de défense contre le stress oxydatif *via* la synthèse *de novo* de glutathion, la facilitation de l'augmentation de la cystine *via* le transporteur xCT et la stimulation de la production de NADPH (147).

Le cycle du TCA, alimenté par la glutamine, est surtout utilisé dans les cellules cancéreuses, pour la production d'intermédiaires de biosynthèses (biomasse), indispensables aux cellules prolifératives.

### **Synthèse des nucléotides et des acides aminés**

La glutamine intervient dans la synthèse des nucléotides en tant que donneur d'azote (N réduit). Elle participe également à la biosynthèse d'acides aminés nécessaires à la

croissance des cellules tumorales. L'utilisation d'atomes marqués a permis de montrer qu'au moins 50% des acides aminés non essentiels utilisés dans la synthèse des protéines dans des cellules cancéreuses *in vitro* peuvent être directement dérivés de la glutamine (148) (149).

L'utilisation accrue de l'azote glutaminique dans la production de nucléotides est facilitée par les signaux favorisant la croissance. Par exemple, des niveaux élevés de l'oncogène MYC induisent l'expression d'un certain nombre d'enzymes dans les voies de biosynthèse des nucléotides (147).

Les cellules proliférantes qui dépendent des glutaminases (mentionnées précédemment) pour produire du glutamate à partir de la glutamine ont la capacité de maintenir un ratio élevé de conversion du glutamate en  $\alpha$ -KG, nécessaire pour la production d'autres acides aminés non essentiels. L'azote du glutamate, issu de l'azote « alpha » de la glutamine, peut être transféré à différents alpha-kétoacides pour produire ces autres acides aminés non essentiels par des réactions de transamination : notamment l'alanine, l'aspartate, la sérine et par extension la glycine. On remarquera que l'aspartate est également important pour la synthèse des purines et des pyrimidines (celle-ci se faisant *via* l'aspartate ou directement avec un azote de la glutamine), ceci révélant la complexité du métabolisme de la glutamine et les différentes voies d'adaptation possibles pour les cellules tumorales proliférantes.

L'aspartate est formé par transamination de l'oxaloacétate *via* l'aspartate aminotransférase. L'aspartate peut être un métabolite limitant pour la croissance tumorale. Sa disponibilité pourrait être ciblée. Le degré d'hypoxie semble inhiber la synthèse d'aspartate. En effet, Garcia-Bermudez *et al.* (150) ont montré que le taux d'aspartate était corrélé à l'hypoxie de façon négative chez l'Homme. Or l'hypoxie peut entraver la croissance tumorale. Par conséquent, l'aspartate pourrait être un métabolite limitant la croissance des tumeurs et la disponibilité de l'aspartate pourrait être ciblée pour le traitement du cancer.

La proline peut également être synthétisée à partir du glutamate (151). L'oncogène MYC induit l'expression d'enzymes impliquées dans la biosynthèse de proline (152). La transamination conduit également à la synthèse de l'ornithine, précurseur de l'arginine.

En plus de la biosynthèse des nucléotides, l'azote « gamma » de la glutamine est également nécessaire pour synthétiser le NAD, le glucosamine-6-phosphate, précurseur de la glycosylation des protéines, et l'asparagine, un autre acide aminé non essentiel (153) (154)

(Figure 16 et Figure 17). Ainsi la glutamine joue également un rôle dans la biosynthèse des osamines qui sont des sucres présents dans les parois cellulaires et les glycoprotéines.

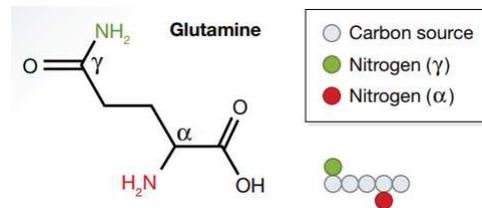


Figure 16 : Structure biochimique de la glutamine, d'après Zhang *et al.* (147).

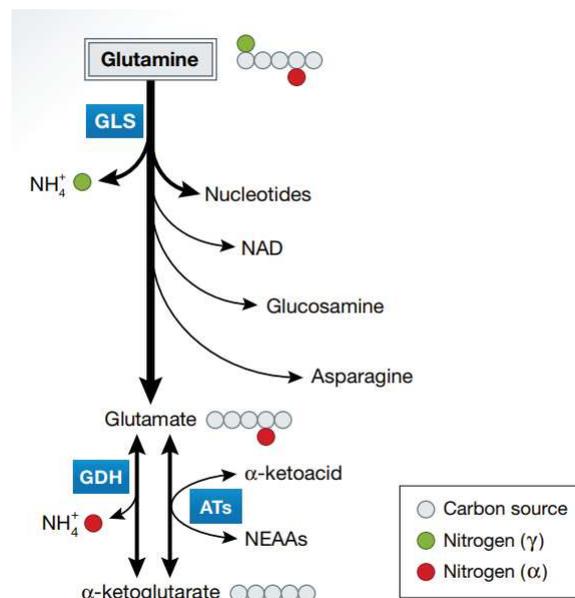


Figure 17 : La glutamine est donneuse d'azotes et de carbones pour différentes réactions de biosynthèse, d'après Zhang *et al.* (147).

### Implication de la glutamine dans la voie de synthèse des acides gras

Comme mentionné *supra*, la glutamine est une source importante de carbone pour le métabolisme énergétique de la cellule et pour la synthèse de biomasse. Mais la glutamine est aussi une source de carbone pour alimenter la synthèse des acides gras dans le cycle de TCA. Le citrate ainsi généré dans le cycle de TCA est converti en acétyl-CoA dans le cytosol, précurseur de la synthèse des acides gras et du cholestérol (144)

### Modifications génétiques

Les cellules tumorales dont la croissance est contrôlée par l'oncogène C-MYC sont particulièrement sensibles à la suppression en glutamine (139). Le facteur de transcription C-MYC, surexprimé dans les cellules prolifératives et amplifié dans de nombreux cancers,

induit la transcription des transporteurs importateurs de glutamine. C-MYC favorise également l'expression des enzymes du métabolisme de la glutamine. *Ras* et l'hypoxie sont à l'origine d'une diminution du flux de glucose. La glutamine est alors utilisée comme substrat du cycle de TCA et comme précurseur anabolique de la lipogénèse (155) (156).

### ***1.3.1.3. Métabolisme des acides gras***

La lipogénèse à partir du glucose est un ensemble de voies métaboliques :

- l'entrée du glucose dans les cellules (transporteurs, glucokinase ou hexokinases)
- la glycolyse cytoplasmique (du glucose 6-phosphate au pyruvate)
- la sortie du citrate hors de la mitochondrie
- la synthèse des acides gras
- la synthèse des triglycérides

La lipogénèse a lieu principalement dans deux organes : foie essentiellement et tissu adipeux, toujours en présence d'insuline.

La majeure partie du carbone utilisé pour la synthèse des acides gras provient du glucose. Le glucose est d'abord converti en acétyl-CoA dans la mitochondrie et utilisé pour synthétiser le citrate dans le cycle de TCA. Lorsque l'ATP/ADP et le NADH/NADH<sup>+</sup> sont élevés dans les cellules les plus proliférantes, le citrate est excrété dans le cytosol où les lipides sont générés. Dans le cytosol, l'acétyl-CoA est recapturé à partir du citrate et utilisé comme source de carbone. La synthèse de l'acétyl-CoA à partir du citrate nécessite l'enzyme ATP citrate lyase (ACLY). La perturbation de l'ACLY entrave la croissance tumorale (157).

L'absorption de glutamine est également essentielle à la synthèse des lipides : elle fournit du carbone dans l'oxaloacétate mitochondrial pour maintenir la production de citrate dans la première étape du cycle de TCA (144). Le citrate ainsi généré dans le cycle de TCA est converti en acétyl-CoA dans le cytosol, précurseur de la synthèse des acides gras et du cholestérol.

Ainsi, le métabolisme de la glutamine et du glucose soutient la production de l'acétyl-CoA et du NADPH nécessaires à la synthèse des acides gras. Dans les cellules tumorales, on observe une augmentation importante de la production de lipides, ce qui confère des avantages conséquents à ces cellules en terme de croissance et de survie (réserve énergétique) (158) (159).

### 1.3.2. Production de biomasse

Les cellules cancéreuses subissent une reprogrammation métabolique spécifique pour soutenir la croissance et la prolifération cellulaire. En plus du besoin énergétique important, les cellules cancéreuses accumulent également des éléments de base pour la construction de nouveaux composants cellulaires, y compris les acides nucléiques, les protéines et les lipides, ainsi que les cofacteurs pour le maintien du statut redox cellulaire.

On compte 22 acides aminés dans les organismes vivants dont 20 dits « standards » : alanine, asparagine, aspartate ou acide aspartique, cystéine, glutamate ou acide glutamique, glutamine, glycine, proline, sérine, tyrosine, qui sont des acides aminés « non essentiels » et 8 acides aminés dits « essentiels » chez l'être humain, c'est-à-dire que l'organisme ne peut pas les synthétiser lui-même, et a donc besoin d'un apport externe. Il s'agit de l'isoleucine, de la leucine, de la lysine, de la méthionine, de la phénylalanine, de la thréonine, du tryptophane et de la valine. L'arginine et l'histidine sont dits « semi-essentiels ». La pyrrolysine et la sélénocystéine sont spécifiques à certaines protéines.

Outre les voies du glucose et de la glutamine décrites précédemment, d'autres voies sont utilisées pour la production de biomasse.

#### 1.3.2.1. *La voie des pentoses phosphates*

La glycolyse fournit de nombreux substrats pour la synthèse des constituants de la cellule, notamment le glucose-6-phosphate pour la synthèse de nucléotides. C'est la voie des pentoses phosphates.

La voie des pentoses phosphates :

- peut fonctionner pour oxyder du glucose en bicarbonate pour réduire le NADP<sup>+</sup> en NADPH utilisé lors de la biosynthèse des acides gras, du cholestérol et pour la réduction du glutathion, (160) ;
- convertir le fructose en pentoses (ribose, ribulose, xylulose) pour la synthèse des acides nucléiques ;
- produit l'érythrose-4-phosphate, précurseur d'acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine par exemple).

La voie des PPP est composée de 2 branches : oxydative et non oxydative (161).

La voie oxydative débute par l'entrée du glucose-6-phosphate *via* la glucose 6 phosphodéshydrogénase avec pour finalité le ribose 5 phosphate ; 3 molécules de NADPH sont alors formées. Ce ribose est impliqué dans la synthèse des nucléotides et le NADPH dans la lutte antioxydante *via* la production de glutathion et la biosynthèse des lipides. Or l'excès de GSH favorise la progression tumorale : des taux élevés de GSH sont en corrélation avec une augmentation des métastases (162).

La voie non oxydative est à l'origine de la production de fructose-6-phosphate et de glycéraldéhyde-3-phosphate qui peuvent être utilisés par la glycolyse et les voies métaboliques en aval. La voie des PPP est donc donneuse de substrat pour la glycolyse. Elle est utilisée comme voie alternative lors de cancers et intervient dans de nombreux aspects du métabolisme cancéreux (163).

La surexpression de PFK2 stimule la voie des PPP comme mentionné précédemment.

#### **1.3.2.2. Métabolisme Sérine - Glycine**

La glycolyse fournit de l'ATP dans la plupart des types de cellules, mais les cellules cancéreuses l'utilisent largement pour l'anabolisme, nécessaire à la croissance tumorale. La biosynthèse de la sérine fait partie de ces voies détournées de la glycolyse à partir de 3-phosphoglycérate (83). Il s'agit d'un tournant crucial dans la conversion du glucose qui permet d'oxyder le 3-phosphoglycérate grâce à la phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH) et le NAD en le convertissant en précurseur de la sérine. Il semble que la régulation positive de la PHGDH et la biosynthèse de la sérine soient nécessaires pour soutenir la croissance de certains cancers et soient responsables de la moitié du flux anaplérotique vers le cycle TCA. La surexpression de PHGDH est observée dans le cancer du sein triple négatif, dans le mélanome et les gliomes et est associée à un mauvais pronostic (164).

La sérine peut être ensuite convertie en glycine par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT), et la sérine et la glycine fournissent les précurseurs pour la synthèse des protéines, des acides nucléiques et des lipides, indispensables à la croissance cellulaire. Elles jouent également un rôle dans le contrôle de l'état redox de la cellule (165) (166). Par ailleurs, la glycine sert à la synthèse du noyau purine, donc des bases puriques de

l'ADN et de l'ARN, à la synthèse de la créatine musculaire, réserve d'énergie, à la synthèse du noyau porphyrine, donc de l'hémoglobine, des cytochromes et à la synthèse du GSH, tripeptide comprenant de la cystéine, de la glycine et du glutamate.

Le carbone du groupement méthyl de la glycine peut alimenter le cycle du folate, qui est utilisé par les cellules cancéreuses pour la synthèse des protéines, des acides nucléiques, des lipides et leurs cofacteurs. L'importance de cette voie métabolique est soulignée par le fait que la chimiothérapie anti-folate est largement utilisée dans le traitement du cancer depuis sa découverte il y a plus de 50 ans (166). Sérine et glycine sont aussi impliquées dans la synthèse des antioxydants en augmentant la survie des cellules cancéreuses en milieu hypoxique. De plus, le glutamate est un produit de synthèse de la sérine et sa conversion en  $\alpha$ -KG alimente le cycle TCA et ainsi la production d'énergie (Figure 18).

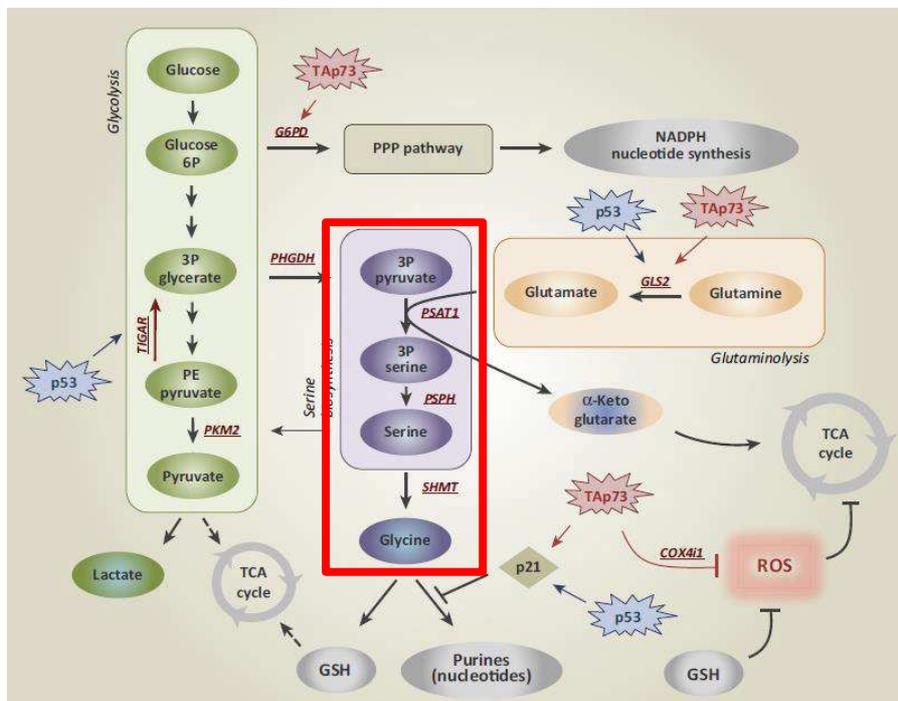


Figure 18 : Biosynthèse de sérine, d'après Amelio *et al.*(166).

### TP53 et sérine

Le gène suppresseur de tumeur p53 est un acteur clé dans la réponse cellulaire au stress, dont les dommages à l'ADN, l'hypoxie et l'activation des oncogènes. Ce gène a été associé à la capacité des cellules cancéreuses à faire face à l'absence de nutriments et au stress oxydatif. En l'absence de nutriments, l'activation de l'axe p53 – p21 conduit à l'arrêt du cycle

cellulaire, ce qui favorise la survie cellulaire en canalisant efficacement les faibles réserves de sérine vers la synthèse du GSH. L'idée que les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme pour contrer la production de ROS correspond à l'hypothèse que la glycolyse aérobie (l'effet Warburg) est adoptée pour éviter la génération de ROS. Ces événements soulignent la pertinence de p53 dans la coordination de la reprogrammation métabolique en réponse au stress métabolique. Récemment, il a été rapporté que le membre de la famille p53 appelé p73 joue un rôle dans la biosynthèse de la sérine en entraînant une augmentation des niveaux intracellulaires de sérine, de glycine et de GSH. Par conséquent, ensemble p53 et p73 semblent aider les cellules cancéreuses à faire face au stress oxydatif associé à la famine. Ce concept indique que de nombreuses cellules cancéreuses peuvent montrer une sensibilité à la déplétion en sérine, en particulier lorsque l'activité de p53 et/ou p73 est modifiée.

### **Sérine et PKM2**

La régulation allostérique (positive et négative) est largement utilisée pour réguler rapidement les voies métaboliques. La sérine peut ajuster de façon allostérique le taux de glycolyse des cellules cancéreuses. La pyruvate kinase catalyse la dernière étape de la glycolyse pour convertir le phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate et produire une molécule d'ATP. L'isoforme M2 du pyruvate kinase (PKM2) est surexprimée dans les cellules proliférantes (167). La sérine est un activateur allostérique de PKM2. Lorsque la sérine est abondante, la PKM2 est entièrement activée et permet la consommation de glucose par glycolyse aérobie. En cas de privation en sérine, l'activité de la PKM2 est réduite et le pyruvate est détourné vers un mode économe en carburant dans les mitochondries ; les métabolites de la glycolyse sont détournés vers les voies de synthèse de sérine pour soutenir la prolifération cellulaire (mécanisme adaptatif qui répond aux besoins de la tumorigenèse). *Via* ce mécanisme, la sérine favorise la glycolyse aérobie et la production de lactate, des événements essentiels à la croissance et à la survie des cellules cancéreuses.

### **« One-carbon » metabolism ou métabolisme monocarboné**

Le couplage du cycle des folates au cycle de la méthionine constitue une voie bicyclique qui fait circuler des unités de carbone et est appelée le métabolisme monocarboné. Le folate est une vitamine B que l'on trouve soit naturellement dans de nombreux aliments, soit dans les compléments alimentaires. Dans les cellules, le folate est réduit par une série

d'enzymes, conduisant à la génération de tétrahydrofolate (THF). Le THF contribue à de nombreuses réactions métaboliques qui déplacent les carbones d'une position à une autre, générant ainsi le cycle des folates. Le cycle des folates est chargé de la conversion de sérine en glycine (activité SHMT) et du système de clivage de la glycine qui produit de l'ammoniac, du CO<sub>2</sub> et une unité de carbone pour la méthylation du THF (activité de la glycine déshydrogénase). Le cycle des folates est ensuite couplé au cycle de la méthionine, le méthyl-THF donnant un carbone à l'homocystéine (Figure 19).

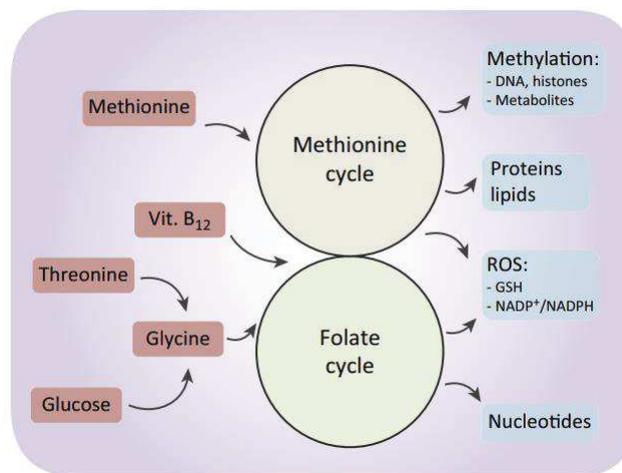


Figure 19 : Le métabolisme monocarboné d'après Amelio *et al.* (166).

La production du métabolisme monocarboné comprend une myriade de composants essentiels à la synthèse de toutes les macromolécules, telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques, utilisés dans la croissance et la prolifération cellulaire. Le cycle de la méthionine est nécessaire à la synthèse de la phosphatidylcholine, qui contribue à 50% du contenu de la membrane lipidique. La méthionine elle-même est nécessaire à la synthèse des protéines, mais est également un donneur de méthyle pour d'autres voies métaboliques, y compris la méthylation des histones, de l'ADN, de l'ARN, de la lysine, de l'arginine et la synthèse de polyamine. Le métabolisme monocarboné joue également un rôle important dans l'équilibre redox. La réduction du THF par la tétrahydrofolate réductase produit une molécule de NADP<sup>+</sup> pour chaque tour du cycle des folates. La modulation du rapport NADP<sup>+</sup>/NADPH contribue au maintien du statut redox qui est assuré principalement par le GSH.

### 1.3.2.3. Valine, Isoleucine et Leucine

Ils forment le groupe des acides aminés branchés (ou à chaînes ramifiées). Ces acides aminés, comme la méthionine, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, sont transportés par les transporteurs LAT-1 (L-amino acid transporter) à travers la barrière hémato-encéphalique (168). Ils peuvent être entièrement oxydés dans la mitochondrie et former de l'énergie.

### 1.3.2.4. Production de membrane

La membrane, milieu complexe, fluide, aux fonctions multiples, assure la communication entre les milieux intracellulaire et extracellulaire (échange d'ions, protéines spécifiques, message intracellulaire...). Elle est l'enjeu du renouvellement membranaire permanent. Elle est composée de deux couches de phospholipides (avec des protéines surfaciques et transmembranaires, des polysaccharides attachés aux lipides ou aux protéines et du cholestérol).

C'est Singer et Nicholson en 1970 (169) qui ont montré que les protéines sont enchâssées dans la bicouche avec leurs extrémités hydrophiles exposées au milieu aqueux externe et leurs régions hydrophobes intégrées dans la membrane : c'est le modèle de la « mosaïque fluide » (Figure 20).

Les phospholipides membranaires sont représentés par l'acide phosphatidique, les phosphoglycérides et les sphingolipides dans une moindre mesure. Dans le feuillet externe, on trouve essentiellement la phosphatidylcholine et la sphingomyéline. Dans le feuillet interne, on trouve de la phosphatidylsérine et du phosphatidylinositol.

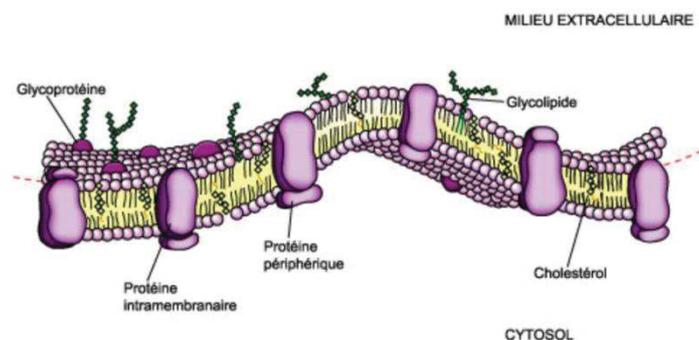


Figure 20 : La membrane, modèle de la « mosaïque fluide », d'après Singer *et al.* (169) ; issu de *biologie-enligne.univ-lille.fr*.

La phosphocholine est un intermédiaire de la biosynthèse de la phosphatidylcholine, phospholipide essentiel pour la production de membranes cellulaires (170). Elle est formée par la choline kinase  $\alpha$  par phosphorylation de la choline à l'aide d'ATP. La choline kinase  $\alpha$  est connue comme un oncogène qui promeut la carcinogénèse. Sa surexpression conduit à l'augmentation de la phosphocholine et de la choline totale (totaleCho) dans différentes tumeurs (171). Plusieurs autres enzymes du métabolisme phospholipidique sont impliquées dans la carcinogénèse et la progression tumorale. Ces enzymes sont des cibles thérapeutiques potentielles (172). La prolifération cellulaire dérégulée dans les cellules malignes est associée à une augmentation du renouvellement de la membrane et à des concentrations plus élevées de composants membranaires fabriqués par les voies de Kennedy (173). La synthèse des glycérolipides (lipides membranaires, triglycérides) à partir du glycérol a été décrite par Kennedy.

La choline est aisément observée en spectroscopie RMN *in vivo*. Elle reflète le turnover membranaire et est associée à un profil agressif. La visualisation de la choline totale en spectroscopie RMN résulte de l'observation du signal de la phosphocholine (PCho), de la glycérophosphocholine (GPCho) et de la choline (Cho) (174). En médecine nucléaire, la  $^{18}\text{F}$ -Fluorocholine peut être utilisée pour étudier le métabolisme de la choline.

La compréhension des modifications du métabolisme membranaire doit être améliorée ; l'utilisation de la spectroscopie RMN HRMAS est une piste pour améliorer les connaissances dans ce domaine.

Les cellules disposent de capacités adaptatives métaboliques pour répondre aux besoins énergétiques et macromoléculaires. Cette réorientation du métabolisme est sous la double emprise :

- des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur agissant directement sur les enzymes des voies métabolique ou par l'intermédiaire des voies de signalisation ;
- du microenvironnement ou compartiment cellulaire hétérogène composé de la matrice: extracellulaire (polysaccharides, protéines fibreuses, protéines d'adhérence), des compartiments mésenchymateux (fibroblastes, myofibroblastes, adipocytes, cellules endothéliales et péricytes) et immunitaire (lymphocytes, plasmocytes, macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, polynucléaires).

Lorsque la tumeur se développe, ces éléments du microenvironnement interagissent à des degrés divers avec les cellules tumorales (12).

### 1.3.3. Rôle du microenvironnement

Les cellules tumorales détournent les cellules saines et les voies métaboliques à leur avantage. Elles sont capables de faire croître de nouveaux vaisseaux sanguins *via* la néoangiogénèse pour subvenir à leurs besoins en oxygène et en nutriments, de détourner les cellules immunitaires pour mieux se développer ou d'utiliser les fibroblastes pour mieux disséminer dans l'organisme. L'oxygénation de la tumeur et la diffusion des nutriments diffèrent selon que les cellules cancéreuses sont situées à proximité des vaisseaux sanguins ou dans des zones éloignées de ceux-ci ; ce fait entraîne une hétérogénéité métabolique spatiale au sein de la tumeur.

#### 1.3.3.1. *Niche vasculaire*

Le rôle du réseau vasculaire est essentiel dans le développement des cancers. Les interactions entre cellules cancéreuses et cellules endothéliales sont fondamentales pour la prolifération tumorale. Le réseau vasculaire a essentiellement une fonction d'échange mais contribue aussi à la régénération et à la croissance des tissus (175). La sécrétion du VEGF par les cellules tumorales est le mécanisme principal de l'angiogénèse, bien qu'associé à d'autres mécanismes, propres à chaque tumeur (invagination par exemple). Le VEGF conduit à une augmentation de la perméabilité vasculaire *via* l'activation d'une cascade de signalisation à l'origine du démantèlement des jonctions cellulaires (176).

Un concept intéressant est celui des cellules souches tumorales et la notion de « niches ». Ce modèle de cellules souches tumorales a été établi à partir des modèles issus de la leucémogénèse. Les cellules souches tumorales sont localisées dans des régions particulières au sein des tumeurs, appelées niches (177). On distingue la niche périvasculaire et la niche hypoxique. Elles participent à la survie et à la protection des cellules souches. L'environnement de ces niches est fondamental pour le devenir des cellules.

La niche vasculaire est constituée de cellules tumorales souches et non souches, mais aussi d'un microenvironnement comportant des cellules endothéliales, des péricytes, des fibroblastes, des astrocytes, des cellules microgliales et des cellules inflammatoires (177). Dans les glioblastomes, les cellules endothéliales sécrètent des facteurs maintenant la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches.

### 1.3.3.2. Hypoxie

L'hypoxie tumorale est une composante majeure du microenvironnement de nombreuses tumeurs solides (178). Elle est définie par une baisse de la pression en oxygène au-dessous de 5 à 10 mm Hg. Des périodes de réoxygénation faisant suite à l'hypoxie promeuvent la progression tumorale. L'implication de l'hypoxie dans la progression tumorale et dans la résistance aux traitements anticancéreux et son association à un mauvais pronostic clinique sont établies (179). Les cellules tumorales s'adaptent aux conditions d'oxygénation, ce qui conduit à une hétérogénéité métabolique intra-tumorale.

L'hypoxie provoque des altérations métaboliques multiples (Figure 21) : augmentation de la glycolyse anaérobie, diminution de la phosphorylation oxydative, augmentation de la production de ROS, augmentation de la production d'acétyl-CoA et augmentation de la synthèse des lipides (156). En hypoxie c'est la voie de la glutamine (réduction de la glutamine) qui est privilégiée pour la synthèse d'acides gras par rapport à la voie d'oxydation du glucose. En effet, *Ras* et l'hypoxie entraînent une diminution du flux de glucose en agissant sur la pyruvate déshydrogénase dans le cycle du TCA.

L'hypoxie conduit à une augmentation de la formation de ROS. Ces dernières sont générées s'il y a réduction incomplète de l'oxygène lorsque le NADH transfère un électron aux complexes de la chaîne de transport. La réduction incomplète conduit soit à la formation d'un anion superoxyde ( $O_2^-$ ), soit à la formation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), soit à la formation d'un radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ), qui sont appelés les ROS.

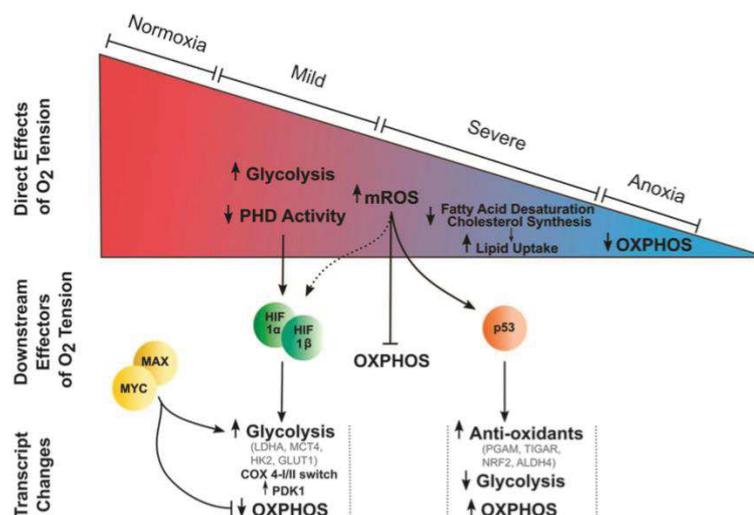


Figure 21 : Conséquences de l'hypoxie sur le métabolisme cellulaire et sur les voies de signalisation, d'après Eales *et al.* (180)

Les cellules s'adaptent à l'hypoxie en stabilisant les facteurs de transcription HIF qui vont activer l'expression d'un certain nombre de gènes nécessaires au maintien et à la survie cellulaire.

Le facteur de transcription HIF-1 induit par l'hypoxie est essentiel à la régulation de la réponse tumorale à l'hypoxie (angiogenèse, glycolyse accrue, résistance à l'apoptose) (181). Son activité est régulée par la disponibilité de la sous unité HIF-1- $\alpha$ , présente en grande quantité en conditions d'hypoxie. En normoxie, les prolyl hydroxylases (PHD) hydroxylent HIF-1- $\alpha$  qui est ensuite dégradé. Ce processus est inhibé en hypoxie. De plus, HIF-1- $\alpha$  active l'enzyme PDK1 (pyruvate deshydrogénase kinase 1) qui inhibe PHD, permettant d'augmenter la biodisponibilité du pyruvate qui pourra ainsi être converti en lactate (Figure 22).

Le VEGF impliqué dans l'angiogenèse est également ciblé par HIF-1- $\alpha$  ainsi que certaines enzymes de la glycolyse, l'inhibition de l'apoptose, la transition épithélio-mésenchymateuse et la résistance aux traitements classiques.

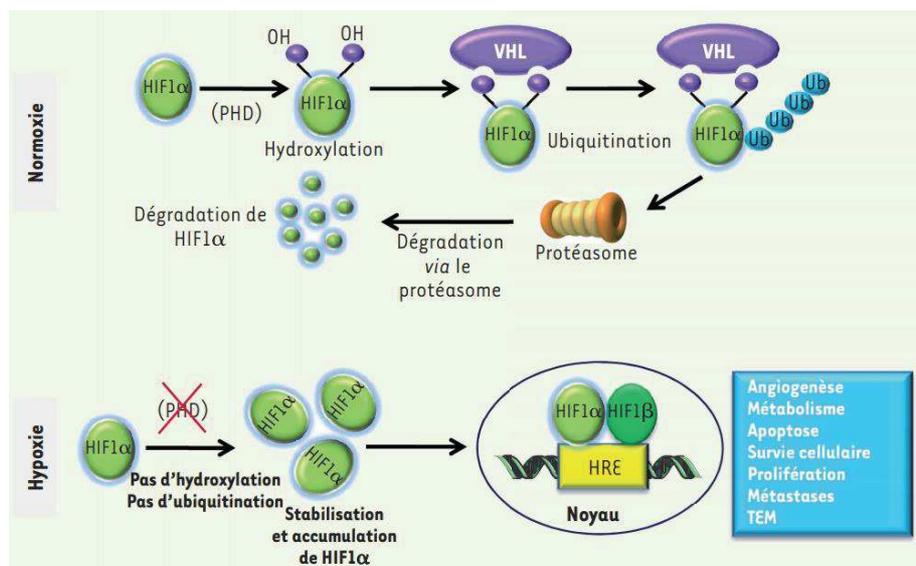


Figure 22 : Régulation de HIF-1 $\alpha$  par l'oxygène, d'après Hasmim *et al.* (182).

#### Rôle de l'hypoxie dans les glioblastomes :

Les glioblastomes sont caractérisés par la présence de nécrose intra tumorale résultant de l'hypoxie (183). Les tumeurs peuvent se développer dans des environnements variés et changeants, notamment en cas de modification de la pression en oxygène. HIF-1- $\alpha$  est surexprimé dans les gliomes en normo- et en hypoxie, ce qui en fait une cible thérapeutique (184) (185).

#### 1.3.4. Cibles métaboliques pour la thérapie

Dans les cancers on observe une reprogrammation métabolique, nécessaire pour la survie et la prolifération cellulaire (2). Ainsi, les objectifs thérapeutiques de ces dernières années sont orientés vers le développement de molécules ciblant directement les voies métaboliques altérées.

Il y a quelques éléments à considérer pour déterminer efficacement une cible métabolique dans le traitement du cancer. L'inhibition de certaines enzymes métaboliques est susceptible d'être systémiquement toxique en raison de leurs fonctions dans les tissus normaux. La faisabilité du ciblage thérapeutique de ces voies dépend de la tolérance du blocage systémique de la voie. Les cellules immunitaires et les cellules souches ont un métabolisme programmé similaire aux cellules cancéreuses. Les inhibiteurs métaboliques ne devraient probablement pas interférer avec le système immunitaire adaptatif. Néanmoins, il existe d'excellents exemples de voies dont la reprogrammation offre une fenêtre thérapeutique adéquate dans le cancer. L'amélioration de la synthèse des nucléotides et de l'ADN dans les cellules tumorales est ciblée par les anti-folates (par exemple le méthotrexate). Bien que ces médicaments soient à l'origine d'une toxicité dans les tissus prolifératifs normaux comme l'épithélium intestinal et la moelle osseuse, ils sont des composants essentiels des schémas efficaces de chimiothérapie.

À ce titre, une approche consiste à cibler une enzyme métabolique dans une voie dérégulée spécifique aux cellules cancéreuses. À ce jour, de nombreuses interventions génétiques et pharmacologiques sur les enzymes métaboliques ont été réalisées sur des xénogreffes dérivées des cellules cancéreuses humaines. Il est important de multiplier ces expériences sur des modèles avec système immunitaire intact, compte tenu des résultats prometteurs de l'immunothérapie.

Un thème émergent est que les cellules cancéreuses présentent une plasticité métabolique et peuvent modifier leur profil métabolique au cours de la tumorigenèse et de l'invasion métastatique. Il est tout à fait concevable que les cellules cancéreuses puissent développer une résistance à l'inhibition d'une voie métabolique particulière en exprimant des isoformes protéiques alternatives ou des voies métaboliques compensatoires. Par conséquent, une stratégie thérapeutique rationnelle du cancer devrait impliquer de cibler simultanément

plusieurs voies métaboliques ou de cibler une voie métabolique particulière en combinaison avec des thérapies contre les voies oncogéniques ou de signalisation.

Nous pouvons citer quelques cibles métaboliques prometteuses au niveau du métabolisme glycolytique, du métabolisme monocarboné, du métabolisme mitochondrial et du métabolisme redox.

#### ***1.3.4.1. Cibler la glycolyse***

La glycolyse était une cible attrayante précoce pour le traitement du cancer étant donné l'observation en TEP-FDG que de nombreuses tumeurs présentent une augmentation significative de l'absorption du glucose par rapport aux tissus normaux adjacents. La lactate déshydrogénase-A (**LDH-A**), une enzyme métabolique qui convertit le pyruvate, produit final de la glycolyse, en lactate, a été identifiée comme la première cible métabolique de l'oncogène MYC. Il a été démontré que l'inhibition génétique ou pharmacologique de la LDH-A diminue les tumeurs induites par MYC dans les modèles de xénogreffes (186) et dans les modèles murins génétiquement modifiés, sans toxicité systémique (187).

Une autre cible thérapeutique potentielle est la protéine glycolytique, hexokinase 2 (**HK2**). De nombreuses cellules tumorales surexpriment HK2. L'étude de modèles de souris précliniques de cancers bronchiques non à petites cellules et de cancers du sein génétiquement modifiés a montré que l'inhibition de HK2 retarde la progression tumorale sans entraîner de conséquences physiologiques néfastes (188)

Cependant, l'effet de LDH-A et HK2 sur le système immunitaire adaptatif est actuellement inconnu.

#### ***1.3.4.2. Cibler le métabolisme monocarboné***

Le métabolisme monocarboné est une voie importante pour soutenir les besoins anaboliques des cellules cancéreuses. La D-3-phosphoglycérate déshydrogénase (**PHGDH**) est une enzyme dans la voie de synthèse *de novo* de la sérine et pourrait être également une cible intéressante dans un sous-ensemble de cancers du sein qui présentent des niveaux élevés de PHGDH (189). La synthèse *de novo* ou l'absorption exogène de sérine peut pénétrer dans les mitochondries où la sérine hydroxy-méthyl-transférase 2 (**SHMT2**) la convertit en glycine pour générer des intermédiaires de folate. Dans de nombreux cancers, l'expression de SHMT2 est élevée et est en corrélation avec un mauvais pronostic. Actuellement, on ne sait pas si le

ciblage de PHGDH, SHMT2 ou d'autres enzymes du métabolisme monocarboné serait efficace pour retarder ou diminuer la progression tumorale dans les modèles de cancer génétiquement modifiés sans entraîner de toxicité systémique.

#### *1.3.4.3. Cibler le métabolisme mitochondrial*

Le métabolisme mitochondrial est également devenu une cible clé pour le traitement du cancer. En effet, il a été montré que la **metformine**, médicament antidiabétique, avait un effet anticancéreux (190). Des études récentes indiquent que la metformine agit comme un agent anticancéreux en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui inhibe la production d'ATP mitochondrial et induit la mort des cellules cancéreuses lorsque les niveaux d'ATP glycolytique diminuent en raison d'une disponibilité limitée du glucose (191). La metformine inhibe également la capacité des mitochondries à générer des macromolécules (lipides, acides aminés et nucléotides) dans les cellules cancéreuses (192). Le profil d'innocuité remarquable de la metformine est dû à son absorption par les transporteurs de cations organiques (organic cation transporters, OCT), qui ne sont présents que dans quelques tissus, tels que le foie et les reins. Donc seules les cellules tumorales exprimant des OCT permettent l'absorption de la metformine pour inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Comme la metformine, la **phénformine** présente des propriétés anticancéreuses en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (193). Contrairement à la metformine, la phénformine est facilement transportée dans les cellules tumorales. La phénformine a été retirée des pharmacies dans la plupart des pays en raison des complications liées à l'acidose lactique. Cependant, la piste de la phénformine reste d'actualité comme traitement anticancéreux possible, car l'acidose lactique peut être surveillée.

Une autre stratégie thérapeutique potentielle pour inhiber le métabolisme mitochondrial dans certaines tumeurs serait d'utiliser des **inhibiteurs de l'autophagie**. L'autophagie fournit des acides aminés, tels que la glutamine, qui alimentent le cycle TCA dans le cancer bronchique non à petites cellules et le cancer du pancréas. L'inhibition de l'autophagie à court terme s'est révélée efficace pour ralentir la progression tumorale sans entraîner de toxicité systémique dans les modèles animaux.

Certaines tumeurs sont dépendantes de l'utilisation de la glutamine pour soutenir le métabolisme du cycle TCA, même en l'absence d'autophagie. Les **inhibiteurs de la glutaminase** (transformation de la glutamine en glutamate) peuvent réduire la charge tumorale dans ces modèles tumoraux (194).

Une autre approche consiste à cibler le métabolisme de l'acétate. Bien que la fonction principale des mitochondries consiste à fournir de l'acétyl-CoA à la cellule, les cellules cancéreuses peuvent également utiliser de l'acétate pour soutenir la croissance et la survie des cellules pendant le stress métabolique (hypoxie ou privation de nutriments). L'enzyme acétyl-CoA synthétase 2 (ACCS2), qui convertit l'acétate en acétyl-CoA, est indispensable pour un développement normal. Les **inhibiteurs de l'ACCS2** réduisent la charge tumorale dans les modèles de carcinome hépatocellulaire (195). Les glioblastomes humains peuvent oxyder l'acétate et pourraient être également sensibles à ces inhibiteurs (196).

Étant donné que les inhibiteurs mitochondriaux ne sont probablement pas des thérapies efficaces contre le cancer en tant qu'agents uniques, la thérapie combinée est probablement la meilleure approche. Par exemple, l'utilisation de la metformine avec les inhibiteurs cliniques actuels de la phosphoinositide 3-kinase (**PI3K**), qui réduisent l'absorption du glucose et la glycolyse, est une approche qui nuirait aux deux sources d'ATP dans les cellules cancéreuses. Les thérapies ciblées contre les oncogènes tels que KRAS, BRAF et NOTCH1 détruisent une grande majorité de cellules cancéreuses mais produisent finalement des cellules résistantes qui présentent une sensibilité accrue aux inhibiteurs qui altèrent le métabolisme mitochondrial.

#### *1.3.4.4. Cibler le métabolisme rédox*

Pour contrebalancer la production accrue de ROS rencontrée lors de la tumorigénèse et de l'invasion métastatique, les cellules cancéreuses augmentent leur capacité anti-oxydante. Ainsi, une approche thérapeutique supplémentaire consiste à désactiver sélectivement la capacité anti-oxydante des cellules cancéreuses, provoquant une augmentation des niveaux de ROS et induisant la mort des cellules cancéreuses.

Le **NADPH** est nécessaire pour maintenir plusieurs systèmes de défense antioxydants. Le cytosol a de multiples sources de génération de NADPH : la voie des pentoses phosphates, l'enzyme malique 1, l'IDH1 et le métabolisme à « 1 carbone ». En revanche, la génération de NADPH dans les mitochondries est contrôlée en partie par le

métabolisme à « 1 carbone » et l'IDH2. Beaucoup de ces systèmes générateurs de NADPH sont essentiels à la survie et au fonctionnement normal des cellules. Néanmoins, il existe deux systèmes générateurs de NADPH qui peuvent servir de cibles thérapeutiques. On estime que 400 millions de personnes dans le monde sont déficientes en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), une enzyme de la voie des pentoses phosphates qui convertit le NADP<sup>+</sup> en NADPH. Certaines tumeurs dépendent de cette voie comme source principale de NADPH cytosolique. En la désactivant, il est possible d'induire un stress oxydatif et de diminuer la croissance tumorale.

Une approche intéressante pour épuiser les niveaux de NADPH et augmenter les ROS consiste à administrer des doses élevées de **vitamine C** (ascorbate). La vitamine C est importée dans les cellules *via* des transporteurs de vitamine C dépendants du sodium, tandis que la forme oxydée de la vitamine C, le déhydroascorbate (DHA), est importée dans les cellules *via* des transporteurs de glucose tels que le GLUT1. Lorsque la cellule absorbe le DHA, elle est réduite en vitamine C par le glutathion. Comme le sang est un environnement oxydant, la vitamine C s'oxyde en DHA avant d'être absorbée par la cellule. Ainsi, des doses élevées de vitamine C diminuent la tumorigenèse des tumeurs colorectales qui abritent des mutations oncogéniques KRAS et expriment des niveaux élevés de GLUT1 en épuisant les pools de NADPH et de GSH. La vitamine C administrée à fortes doses par voie intraveineuse est sans danger pour l'homme et, en association avec un traitement conventionnel au paclitaxel-carboplatine, a démontré un bénéfice chez un petit nombre de patientes atteintes de cancer de l'ovaire (197).

D'autres stratégies pour diminuer le **GSH** comprennent l'administration de buthionine sulfoximine, un inhibiteur irréversible de la gamma-glutamylcystéine synthétase, qui peut être administré en toute sécurité chez l'Homme.

De nombreux types de cancer utilisent la voie du facteur de transcription **NRF2** (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) pour maintenir l'équilibre redox. La superoxyde dismutase 1 (**SOD1**) est surexprimée dans le cancer bronchique non à petites cellules. Comme les souris knockout NRF2 et SOD1 se développent normalement, l'inhibition à court terme de ces voies pourrait être un moyen efficace de détruire ces cellules cancéreuses.

Une considération importante est que les cellules souches normales sont sensibles aux niveaux quantitatifs de ROS. Il est donc important de stratifier les patients en fonction de

leurs niveaux d'expression d'une protéine anti-oxydante ou d'une voie anti-oxydante particulière, afin de cibler efficacement les cellules cancéreuses.

#### **1.3.4.5. Cibler les voies de signalisation**

L'hétérogénéité tumorale repose aussi sur la mise en œuvre des voies de suppléance multiples pilotées par un système de régulation.

La voie PI3/AKT/mTOR, par exemple, est une voie de signalisation intracellulaire impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire, de l'apoptose et de l'angiogénèse. Elle est composée de différentes kinases activées en cascade.

PI3K est également régulateur du métabolisme du glucose, par l'expression des transporteurs du glucose, l'augmentation de la capture de glucose *via* l'hexokinase et la stimulation de l'activité de la phosphofructokinase (118). Différentes anomalies de la voie PI3K/AKT/mTOR peuvent favoriser le développement d'une tumeur. On peut par exemple observer une activation de récepteurs à tyrosine-kinase qui deviennent autonomes par rapport aux facteurs de croissance, une surexpression de *Ras*, une perte de fonction de PTEN, ou encore une mutation de PI3K ou d'AKT. (198)

PTEN, inhibiteur naturel de PI3/AKT/mTOR, limite la prolifération cellulaire et est muté dans certaines tumeurs, notamment les gliomes de haut grade. Cette voie de signalisation est ainsi également une cible thérapeutique.

On peut aussi mentionner le gène suppresseur de tumeur TP53. Il inhibe la glycolyse en réprimant la transcription des gènes codant les transporteurs du glucose (199) et redirige le flux glycolytique vers la voie des pentoses phosphates et la production de NADPH. Ceci permet alors de protéger la cellule contre le stress oxydatif : NADPH est en effet nécessaire pour produire du glutathion, qui lutte contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (200). D'autres voies oncogéniques ou de signalisation peuvent être ciblées et sont mentionnées au sein des différents chapitres de cette thèse.

L'hétérogénéité des gliomes pose le défi des nouvelles thérapeutiques dont une approche serait le développement de thérapies personnalisées en ciblant le métabolisme.

#### 1.4. Comment étudier le métabolisme ?

Par rapport aux autres « -omiques » (génomique, transcriptomique, protéomique), la métabolomique est un domaine relativement récent et en plein essor depuis le développement de la technique HRMAS (High Resolution Magic Angle Spinning) en spectroscopie RMN. Cette technique, même si sa sensibilité est largement inférieure à celle de la spectrométrie de masse, permet de travailler à haut débit sur des échantillons tissulaires intacts avec deux approches complémentaires :

- Phénotypage métabolique, pour identifier et quantifier le métabolome dans un cadre et des conditions précises ;
- Biologie intégrative, pour étudier les liens avec la génomique et la transcriptomique afin d'avoir la vision globale d'un organisme dans son état physiologique ou pathologique.

Ces approches, en utilisant des méthodes d'analyses statistiques multivariées (PLS : Partial Least Square) et/ou d'analyses de réseau (algorithme ADEMA : Algorithm to Determine Expected Metabolite level Alterations), permettent ainsi d'identifier des empreintes spécifiques de diagnostic, de pronostic et/ou de réponse thérapeutique.

La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse sont les techniques les plus utilisées dans les plateformes techniques qui travaillent en métabolomique, notamment de par leur excellente sensibilité (Figure 23).

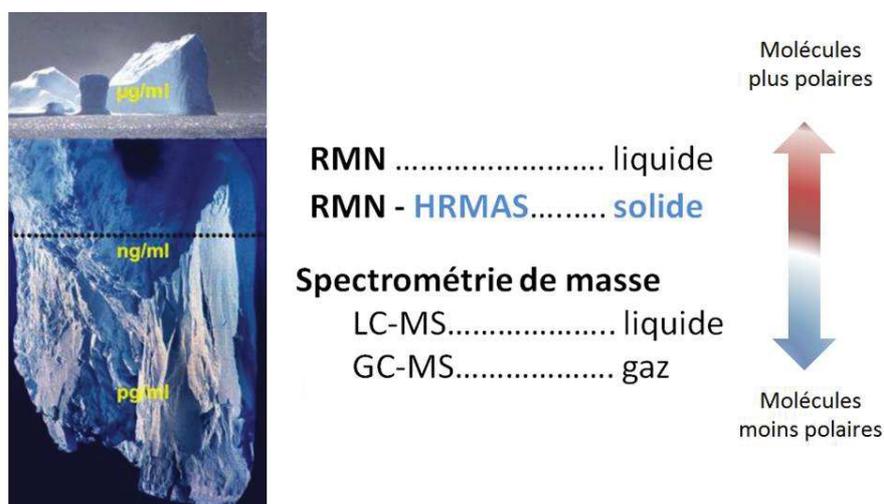


Figure 23 : Sensibilité des différentes techniques.

La spectroscopie par RMN haute résolution présente néanmoins de nombreux avantages. C'est une technique robuste qui permet l'analyse d'échantillons en plus grand nombre. Elle est non destructrice (analyses effectuées sur des tissus intacts) et quantitative. La préparation est facile, rapide (moins de 2 minutes) et reproductible. Grâce à la technique HRMAS, on obtient un gain en résolution. L'acquisition est rapide : une utilisation en routine clinique est ainsi envisageable (201) (202). L'utilisation de l'angle magique ( $54,7^\circ$ ) permet de s'affranchir des contraintes liées à la RMN classique du solide. En effet, l'analyse d'un matériel biologique solide est problématique car il existe une susceptibilité magnétique variable en lien avec l'hétérogénéité tissulaire et les noyaux ont une mobilité réduite avec d'importantes interactions dipolaires. Ces phénomènes induisent un élargissement spectral, réduit par la bascule à l'angle magique.

Deux approches complémentaires et non interchangeable sont utilisées pour détecter les métabolites et les activités métaboliques : la quantification des métabolites (c'est-à-dire **la métabolomique**) et la mesure des activités des voies métaboliques (c'est-à-dire **l'analyse des flux métaboliques**). On ne peut pas déduire l'activité métabolique de changements en mesurant le niveau des métabolites, et les flux métaboliques modifiés peuvent ou non provoquer des changements dans le niveau de métabolites. Ces deux approches ont fourni d'importantes informations récentes sur le métabolisme du cancer et l'utilisation conjointe des deux approches fournit l'évaluation la plus complète des phénotypes métaboliques.

#### **1.4.1. Métabolomique**

La métabolomique appartient à la grande famille des « -omiques », dont le développement est en pleine expansion les dernières années avec un vif intérêt pour l'étude du métabolisme des cancers. Cette science a deux objectifs : déterminer les différences entre systèmes biologiques et comprendre le contrôle métabolique du système étudié.

Les expériences de métabolomique visent à caractériser et quantifier les métabolites d'un échantillon biologique, généralement par RMN ou par spectrométrie de masse. Selon les méthodes d'extraction, de séparation et de détection, les expériences de métabolomique peuvent se concentrer sur des classes particulières de métabolites ou fournir une analyse complète du plus grand nombre de métabolites possible. Les approches ciblées détectent généralement quelques dizaines à quelques centaines de molécules, tandis que les analyses

non ciblées peuvent en détecter plus de 1000. Détecter les altérations des niveaux de métabolites dans le cancer peut être extrêmement précieux. L'accumulation massive de 2-HG dans les gliomes mutants IDH1 (203) ou une élévation du succinate dans les paragangliomes déficients en SDH (succinate déshydrogénase) (204) ont été initialement découvertes par une approche métabolomique.

#### 1.4.2. Analyse des flux métaboliques

Les études sur le flux métabolique utilisent des traceurs marqués par des isotopes stables comme le  $^{13}\text{C}$ , le  $^{15}\text{N}$  et le  $^2\text{H}$  pour suivre le flux à travers les voies métaboliques. Typiquement, un nutriment d'intérêt est marqué par un de ces isotopes (par exemple, le  $^{13}\text{C}_6$ -glucose) puis fourni aux cellules cancéreuses dans le milieu de culture. Les métabolites extraits de la culture sont analysés pour l'enrichissement isotopique en utilisant la spectrométrie de masse ou la RMN. L'étendue et la distribution de l'étiquetage au sein des métabolites informatifs codent les informations sur les voies actives dans les cellules. L'intégration de données supplémentaires (par exemple, les taux définitifs de consommation de nutriments, de sécrétion de déchets et de production de biomasse) permet de déterminer les flux quantitatifs à travers un réseau métabolique. Par ailleurs, ce traçage fournit des informations sur les altérations métaboliques dans les cellules cancéreuses qui ne peuvent pas être détectées par la seule quantification des métabolites. Par exemple, l'hypoxie et les modifications de la chaîne respiratoire mitochondriale induisent une restructuration du cycle TCA dans lequel de nombreux intermédiaires sont produits dans l'ordre inverse de la forme conventionnelle du cycle. Cette restructuration du cycle TCA ne se manifeste que par des expériences de traçage des isotopes, en particulier des expériences utilisant la  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine comme traceur.

Plusieurs études récentes ont commencé à utiliser des isotopes stables pour étudier le métabolisme des tumeurs intactes. Le traçage isotopique *in vivo* peut détecter les activités métaboliques des tumeurs intactes et caractériser certains des facteurs génétiques qui spécifient le phénotype métabolique. Fan *et al.* (205) ont utilisé du  $^{13}\text{C}_6$ -glucose pour démontrer que les tumeurs pulmonaires non à petites cellules humaines métabolisent le glucose par la glycolyse et le cycle TCA simultanément, les métabolites des deux voies démontrant des niveaux plus élevés de marquage dans les tumeurs par rapport au tissu

pulmonaire adjacent. Cette constatation contraste fortement avec le concept de déviation du métabolisme oxydatif vers la glycolyse des tissus malins, couramment utilisé pour expliquer l'effet Warburg. Il est également démontré que les tumeurs humaines présentent une hétérogénéité substantielle des phénotypes métaboliques, à la fois entre les tumeurs et même dans des régions distinctes de la même tumeur (206). Ceci explique la nécessité de mettre en place plusieurs lignes thérapeutiques.

La métabolomique et l'analyse des flux métaboliques peuvent être intégrées à la génomique fonctionnelle pour identifier et comprendre les vulnérabilités métaboliques des cellules cancéreuses. Cette approche a produit plusieurs bons exemples de criblages qui ont identifié des cibles thérapeutiques potentielles tout en suscitant de nouvelles pistes d'investigation en biologie des cellules cancéreuses (*cf.*1.3.4).

## **2. OBJECTIFS**

Les objectifs de notre travail ont été :

1. d'étudier l'hétérogénéité du profil métabolique des gliomes afin d'établir un lien avec la biologie moléculaire et le pronostic :
  - étude des relations entre le profil métabolique, la génomique et la survie des patients atteints d'oligodendrogliomes ;
  - étude de la relation entre le profil métabolique et l'imagerie fonctionnelle par TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG des gliomes de haut grade ;
  
2. de mettre en place des outils d'analyse des voies métaboliques en utilisant des sondes marquées au  $^{13}\text{C}$  sur des cultures cellulaires et des modèles de xéno greffe dans la perspective d'une application rapide chez l'Homme (gliomes de haut grade) :
  - mise au point sur des solutions de métabolites purs ;
  - étude de faisabilité sur des cultures cellulaires ;
  - étude de faisabilité sur des xéno greffes.

### **3. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### 3.1. Analyse RMN HRMAS

#### 3.1.1. Équipements

Toutes les expériences ont été réalisées sur un spectromètre RMN Bruker Avance III 500 MHz installé aux hôpitaux universitaires de Strasbourg ([www.mnms-platform.com](http://www.mnms-platform.com)) depuis 2008. Le spectromètre est équipé d'une sonde HRMAS triple résonance ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ).

L'utilisation de l'angle magique ( $\Theta=54,7^\circ$ ) permet d'éliminer des interactions présentes dans des semi-solides (distribution de susceptibilités magnétiques, interactions dipolaires, anisotropie de déplacement chimique). Toutes ces interactions contiennent un facteur  $(3 \cos^2 \Theta - 1)$  et seront par conséquent éliminées par une rotation à l'angle magique suffisamment rapide. Le résultat final sera un spectre dont la résolution est proche d'un échantillon liquide (Figure 24).

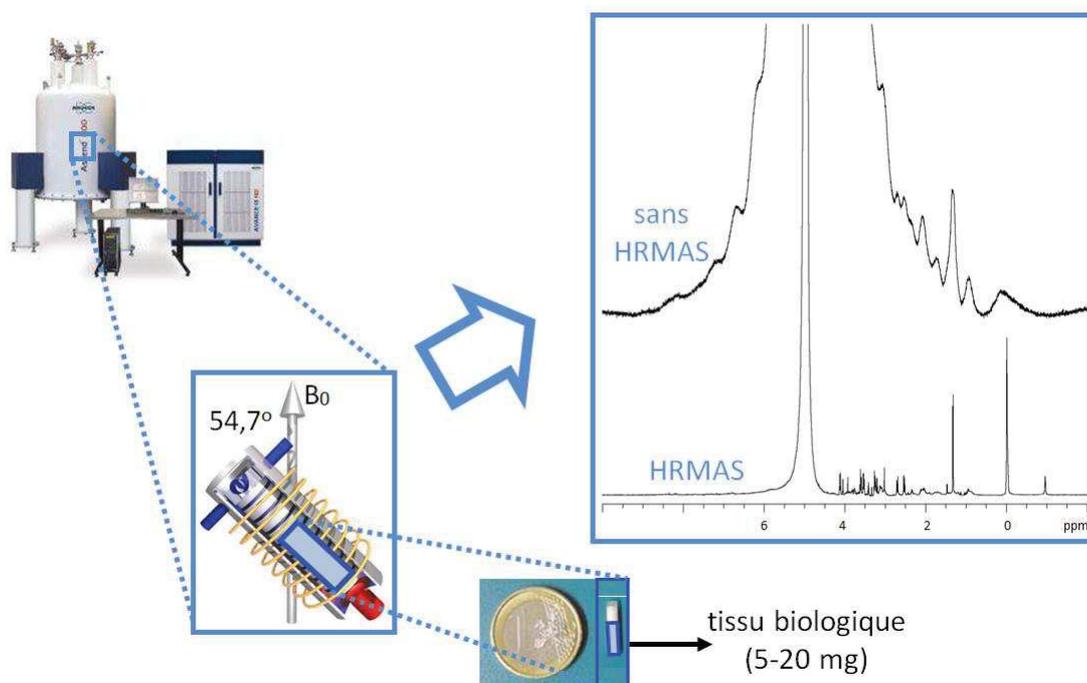


Figure 24 : Avantage d'une rotation à l'angle magique en RMN HRMAS.

Cette sonde a également un canal deutérium ( $^2\text{H}$ ) utilisé comme signal de verrouillage « *lock* » nécessaire à la stabilisation du champ magnétique principal  $B_0$  au cours du temps. Le « *lock* » maintient l'intensité du champ magnétique pendant les expériences, ce qui permet d'éviter un élargissement des signaux dû à de légères fluctuations de  $B_0$ . Il est aussi nécessaire de régler ce qu'on appelle le « *shim* » en RMN. Les bobines de shims sont placées autour de la sonde et leur réglage permet de compenser les inhomogénéités du champ

magnétique  $B_0$ . La température de l'échantillon a été réglée à 277 K pour toutes les acquisitions (Figure 25).

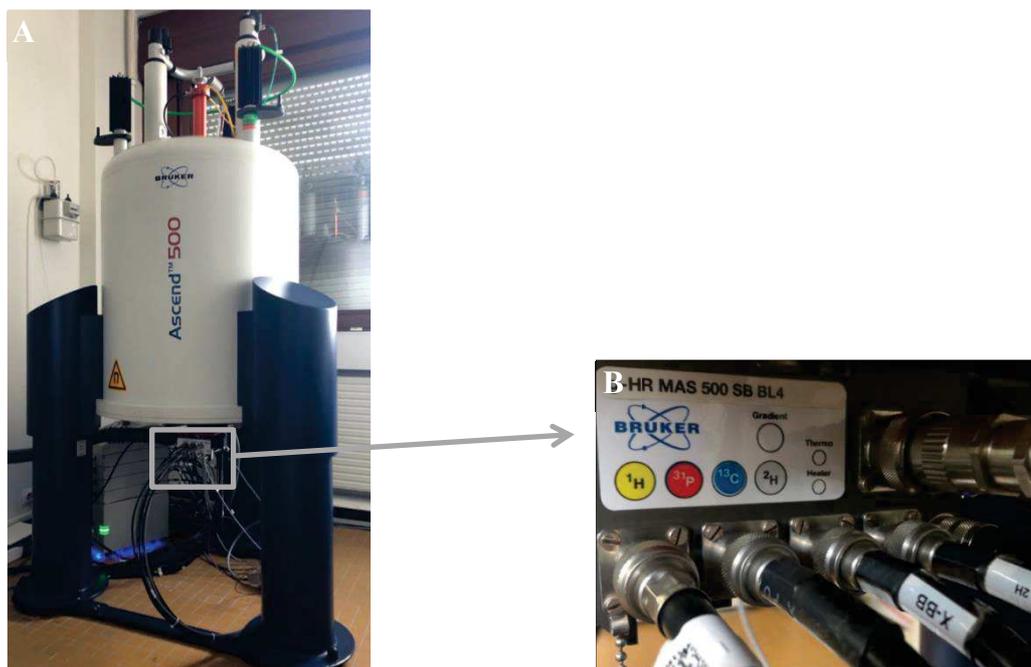


Figure 25 : Spectromètre Bruker 500 MHz, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg A) et connectique de la sonde RMN HRMAS triple résonance : canal  $^1\text{H}$ , canal  $^{13}\text{C}$ , canal  $^{31}\text{P}$  et canal  $^2\text{H}$  pour le « lock ». On trouve également la connectique pour les différents réglages : angle magique, antennes RF, chauffage et gradient B).

### 3.1.2. Séquences utilisées

Au cours de ce travail, différentes séquences ont été utilisées pour l'étude des solutions pures, des cultures cellulaires et des biopsies. Les spectres obtenus ont permis d'identifier les différents métabolites contenus dans l'échantillon analysé et d'évaluer leur abondance relative grâce à l'étape de quantification.

Au préalable, une étape de présaturation du signal de l'eau est nécessaire pour les différentes acquisitions. Pour éliminer le signal de l'eau, la méthode la plus simple consiste à irradier l'échantillon à très faible puissance à la fréquence de l'eau juste avant la séquence d'impulsion (champ d'irradiation de 50 Hz typiquement). Dans ce cas, les populations *up* et *down* des spins de l'eau sont égalisées et le signal correspondant est proche de zéro.

Les séquences utilisées sont des séquences CPMG (« classique ») ou découplée du  $^{13}\text{C}$ ), la séquence POCE, la séquence ZGPR, des séquences HSQC (1D, 2D et HR (« Haute Résolution »)), la séquence 2D HMBC et la 2D J-RES.

On distingue deux types de séquences : 1D et 2D.

### 3.1.2.1. Séquences 1D

Les séquences RMN 1D sont le plus fréquemment utilisées pour l'analyse quantitative. Les spectres alors obtenus permettent de déterminer l'abondance relative des différents métabolites décelés dans l'échantillon analysé.

#### Séquence CPMG

La séquence d'impulsion classique 1D la plus communément utilisée est la *séquence CPMG* (Carr-Purcell-Meiboom-Gill). C'est une séquence de type « écho de spins » (Figure 26) qui permet d'atténuer les signaux larges émanant de composés de poids moléculaires élevé comme les lipides afin de mettre en évidence les métabolites présents dans l'échantillon. Elle permet de visualiser les noyaux d'hydrogène de tous les métabolites présents en concentration suffisante (qu'ils soient portés par des  $^{12}\text{C}$  ou des  $^{13}\text{C}$ ).

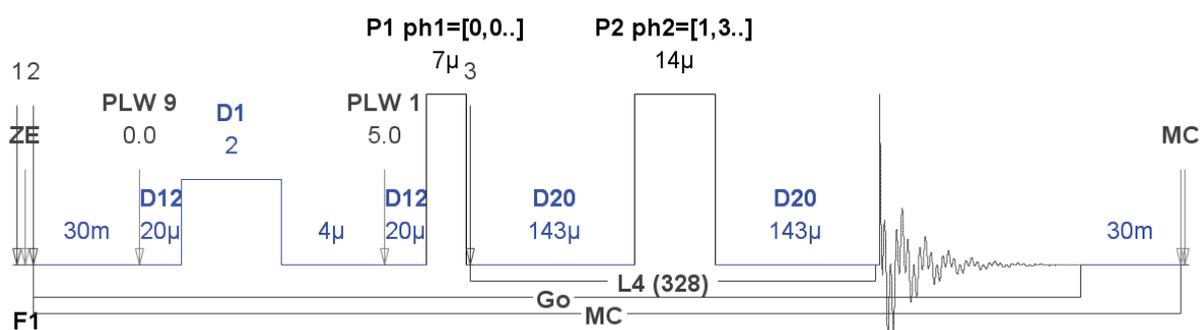


Figure 26 : Protocole d'acquisition d'une séquence CPMG pour les solutions de métabolites purs.

Pour chaque expérience CPMG, différents paramètres ont été utilisés et adaptés selon qu'il s'agissait de l'analyse des solutions pures, des cultures cellulaires ou des biopsies (Tableau 2). Par exemple, pour les solutions de métabolites purs : la fenêtre d'observation était de 14,0019 ppm ; le nombre de points ou échantillonnage était de 32768 ; le délai de relaxation était de 15 s ; le temps d'acquisition de 2,3396 s. 128 FID (*Free Induction Decay*) correspondant à un temps d'acquisition de 38 min 26 s pour chaque spectre de solution de métabolites purs sont acquises. Le délai entre les impulsions de  $180^\circ$  du module CPMG était fixé à 143 µs. Le nombre d'impulsions à  $180^\circ$  était de 328. Ces paramètres correspondent à un temps de CPMG de 93,8 ms (= 142 µs · 2 · 328).

	CPMG-15s-purs	CPMG-cellules	CPMG découplée 13C-cellules	CPMG-POCE-40	CPMG-POCE-42	CPMG-biopsies
Temps de relaxation (D1; sec)	15	2	2	5	5	2
Champ RF présaturation (Hz)	50	50	50	57	57	50
Durée d'acquisition (AQ; sec)	2,3396351	2,3396351	0,5849088	0,357	0,357	2,3396
Échantillonnage	32768	32768	8192	5000	5000	32768
Largeur de spectre (SW; ppm)	14,0019	14,0019	14,0019	14,0019	14,0019	14,0019
Nombre de scans fictifs (DS)	4	4	2	8	8	4
Nombre de scans (NS)	128	1024	1024	512	512	128
Durée d'expérience (EXPT)	38min26sec	1h16min38sec	46min29sec	46min47sec	46min47sec	9min50sec
Nombre de boucles (L4)	328	328	328	0	0	328
Temps d'interpulse ( $\mu$ s)	143	143	143	143	143	143

Tableau 2 : Paramètres d'acquisition de la séquence CPMG pour les différentes expériences réalisées.

### *Interprétation d'une séquence CPMG 1D :*

Sur un spectre CPMG, chaque pic correspond à un groupe de protons ( $^1\text{H}$ ) équivalents, caractéristique d'un site chimique. Pour interpréter un spectre, il faut prendre en compte le déplacement chimique, la multiplicité du pic (singulet, doublet, triplet, etc) et l'intégrale du pic pour la quantification.

Le **déplacement chimique** décrit la dépendance des niveaux d'énergie magnétique du noyau par rapport à l'environnement électronique de la molécule. Il varie en fonction de l'environnement chimique. Il permet de déterminer la position relative des fréquences de résonance et est exprimé en ppm (parties par millions). Il est noté  $\delta$  :  $\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}}$ .

L'exemple du lactate est présenté Figure 27. Le groupement  $\text{CH}_3$  du lactate est dit « blindé » (l'électronégativité des atomes voisins du proton est faible). Son déplacement chimique ( $\delta\text{H} = 1,33$  ppm) est inférieur à celui du  $\text{CH}$  ( $\delta\text{H} = 4,12$  ppm) qui est proche de  $\text{COOH}$ .

La **multiplicité du pic (couplages scalaires)** est le second critère d'interprétation d'un spectre. Ce critère permet de déterminer s'il y a un couplage entre les protons. Le couplage scalaire  $nJ_{ij}$  traduit l'interaction entre 2 noyaux  $i$  et  $j$  par le biais des électrons des  $n$  liaisons. (cf. cours de RMN, ENS de Lyon, disponible en ligne). La multiplicité des signaux dépend du nombre de voisins impliqués dans le couplage. Le doublet du lactate à 1,33 ppm signifie que  $\text{CH}_3$  a comme proche voisin un  $^1\text{H}$ . Le quadruplet à 4,12 ppm signifie que  $\text{CH}$  a comme proche voisin 3  $^1\text{H}$ .

L'**intégrale du pic** (ou aire sous la courbe) est proportionnelle à la concentration de la molécule ainsi qu'au nombre de protons responsables du signal. Sa mesure permet la quantification.

Ainsi, dans une molécule, le spectre  $^1\text{H}$  permet de retrouver le nombre de  $^1\text{H}$  de la molécule qui résonnent par multiplet. Dans ce sens, cette information permet de retrouver la

structure de la molécule. Lorsque l'on étudie un mélange de molécules, l'aire des pics sera aussi proportionnelle à la concentration et au nombre de  $^1\text{H}$ .

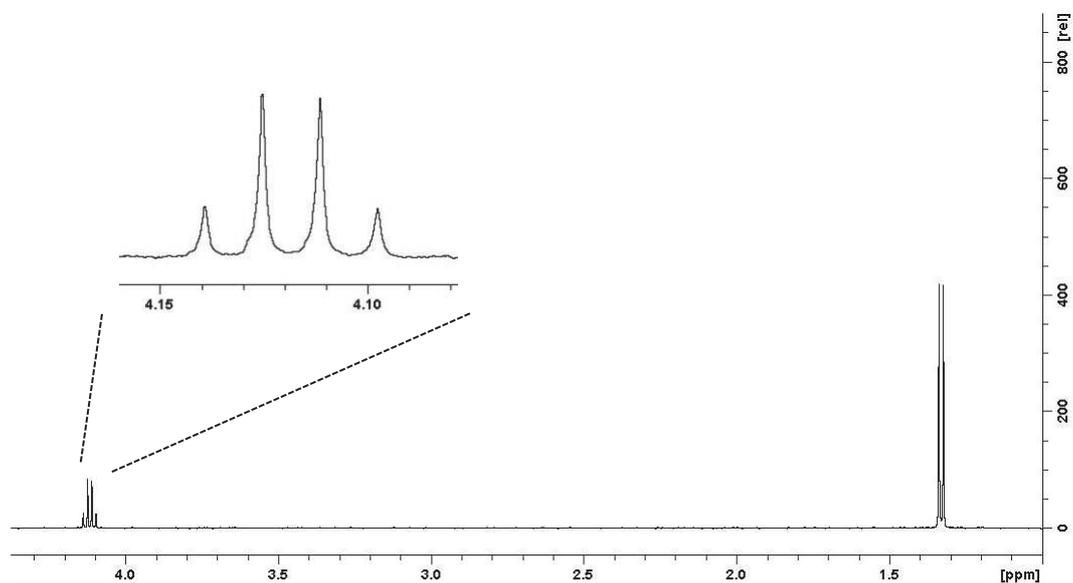


Figure 27 : Séquence CPMG enregistrée sur une solution pure de lactate. Multiplicité du pic du lactate avec un quadruplet à 4,12 ppm.

### Séquence CPMG découplée du $^{13}\text{C}$

La séquence d'impulsion dite « *CPMG découplée du  $^{13}\text{C}$*  » montre les noyaux d'hydrogène des  $^{12}\text{C}$  et des  $^{13}\text{C}$ . Il s'agit d'une CPMG à laquelle on ajoute un champ RF qui irradie à la fréquence de résonance du  $^{13}\text{C}$ , pendant l'acquisition du signal  $^1\text{H}$ , ce qui a pour effet de saturer le signal du  $^{13}\text{C}$  et par conséquent de supprimer le couplage entre le  $^{13}\text{C}$  et le  $^1\text{H}$  (Figure 28).

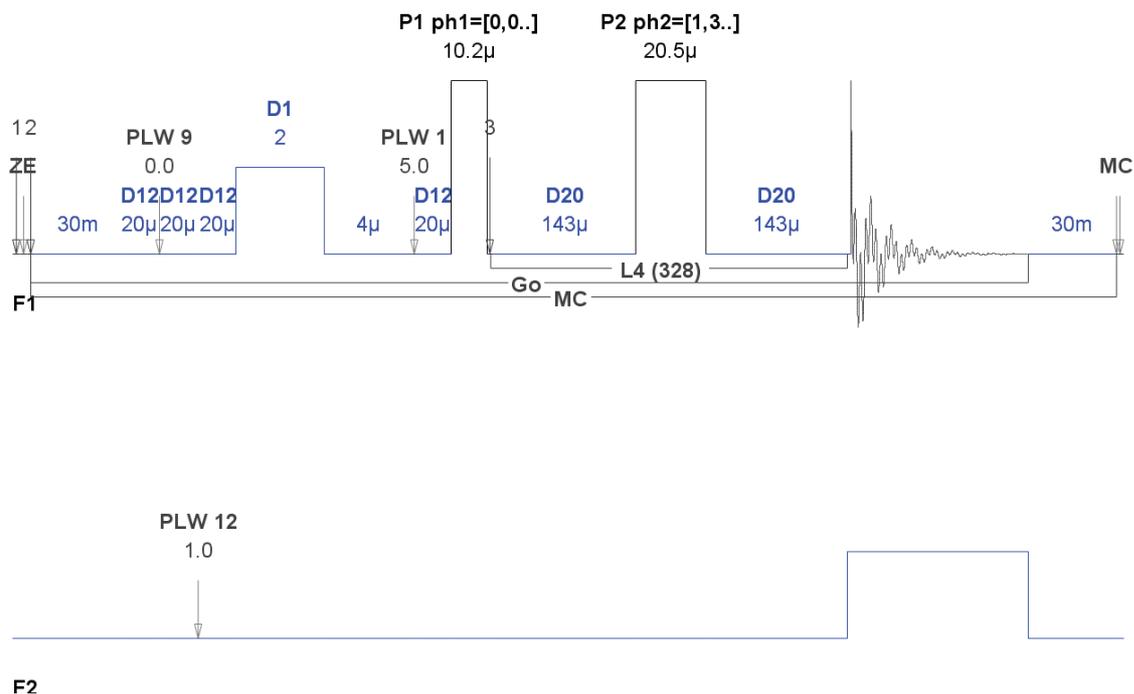


Figure 28 : Séquence d'impulsion CPMG découplée  $^{13}\text{C}$ .

En abondance naturelle, on a 98,9% de  $^{12}\text{C}$  : on observe les signaux des  $^1\text{H}$  liés à des  $^{12}\text{C}$  (spin = 0) et 1,1% de  $^{13}\text{C}$  (spin =  $\frac{1}{2}$ ) : dans ce cas on observe sur une CPMG classique un couplage  $^1\text{J}_{13\text{C}-1\text{H}}$  : on parle de satellites dus au  $^{13}\text{C}$  (Figure 29). La distance entre 2 satellites est égale à la constante de couplage  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ .  $^1\text{J}_{\text{CH}}$  varie entre 125Hz pour les groupements méthyl et au-delà de 200Hz pour les carbones aromatiques  $\text{sp}^2$ . Lors de l'utilisation de la séquence CPMG découplée du  $^{13}\text{C}$ , on observe la disparition de ces satellites. Ainsi, le couplage des analyses CPMG et CPMG découplée permet de déterminer la quantité de  $^{13}\text{C}$  et de  $^{12}\text{C}$  si le recouvrement spectral n'est pas trop important.

Lorsque l'on utilise un marquage au  $^{13}\text{C}$ , on enrichit le milieu en  $^{13}\text{C}$ . Des séquences spécifiques vont permettre de détecter uniquement les métabolites affectés par cet enrichissement. Le temps d'analyse pourra être réduit.

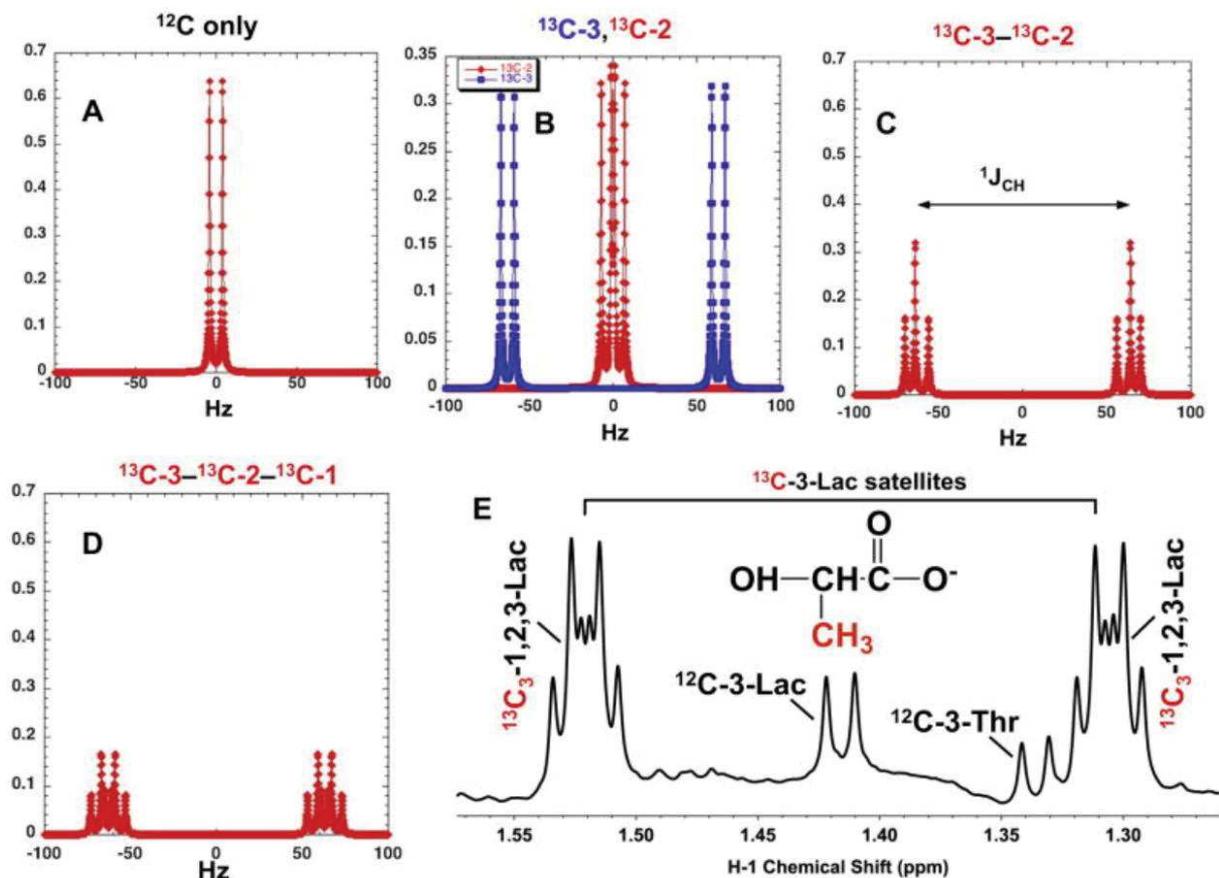


Figure 29 : Les satellites du  $^{13}\text{C}$  en RMN du  $^1\text{H}$  dans la molécule de lactate. Les différents motifs du groupement  $-\text{CH}_3$  à 1,33 ppm sont présentés : absence de marquage au  $^{13}\text{C}$  A) ; C-3 ou C-2 marqué : mise en évidence de 2 doublets satellites équidistants du doublet non marqué B) ; C-3 et C-2 marqués : mise évidence de 2 doublets dédoubleés de part et d'autre du doublet non marqué C) ; si le lactate est marqué uniformément, mise en évidence de 2 doublets de doublet dédoubleés de part et d'autre du doublet non marqué D) ; exemple du glucose uniformément marqué qui se transforme en lactate uniformément marqué *via* la glycolyse E), d'après Fan et Lane (207).

### Séquence POCE

La séquence POCE (Proton-Observed Carbon-Editing) est une séquence CPMG, utilisée et optimisée dans le cadre de ce travail de thèse pour la quantification du rapport  $^{13}\text{C}$  sur ( $^{13}\text{C}+^{12}\text{C}$ ) (Figure 30).

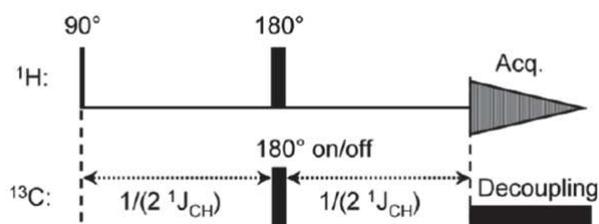


Figure 30 : Séquence d'impulsion POCE.

Nous avons distingué la *POCE 40* et la *POCE 42* : la première permet de visualiser les  $^1\text{H}$  portés par les  $^{12}\text{C}$  et les  $^{13}\text{C}$ , la seconde les  $^1\text{H}$  uniquement portés par les  $^{13}\text{C}$  (Figure 31) (Tableau 3).

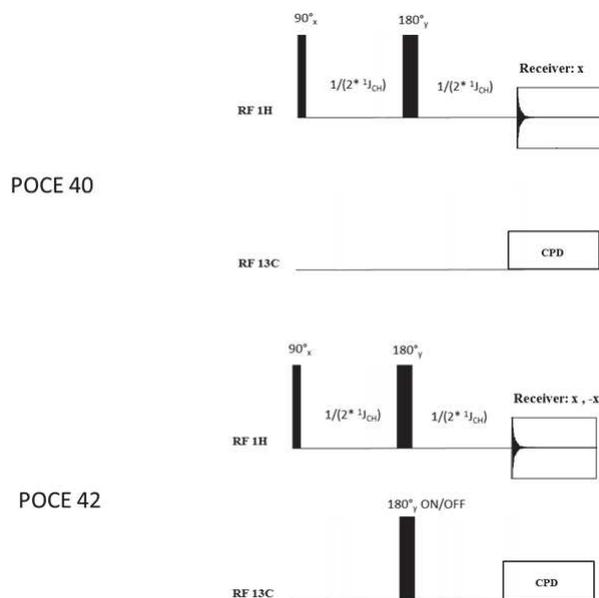


Figure 31 : Séquences d'impulsion POCE 40 et 42.

	CPMG-POCE-40	CPMG-POCE-42
Temps de relaxation (D1; sec)	5	5
Champ RF présaturation (Hz)	57	57
Durée d'acquisition (AQ; sec)	0,357	0,357
Échantillonnage	5000	5000
Largeur de spectre (SW; ppm)	14,0019	14,0019
Nombre de scans fictifs (DS)	8	8
Nombre de scans (NS)	512	512
Durée d'expérience (EXPT)	46min47sec	46min47sec
Nombre de boucles (L4)	0	0
Temps d'interpulse ( $\mu\text{s}$ )	143	143

Tableau 3 : Paramètres d'acquisition des séquences POCE.

Un module CPMG peut également être ajouté à la séquence POCE pour supprimer les signaux des composés larges comme les lipides (Figure 32 et Figure 33).

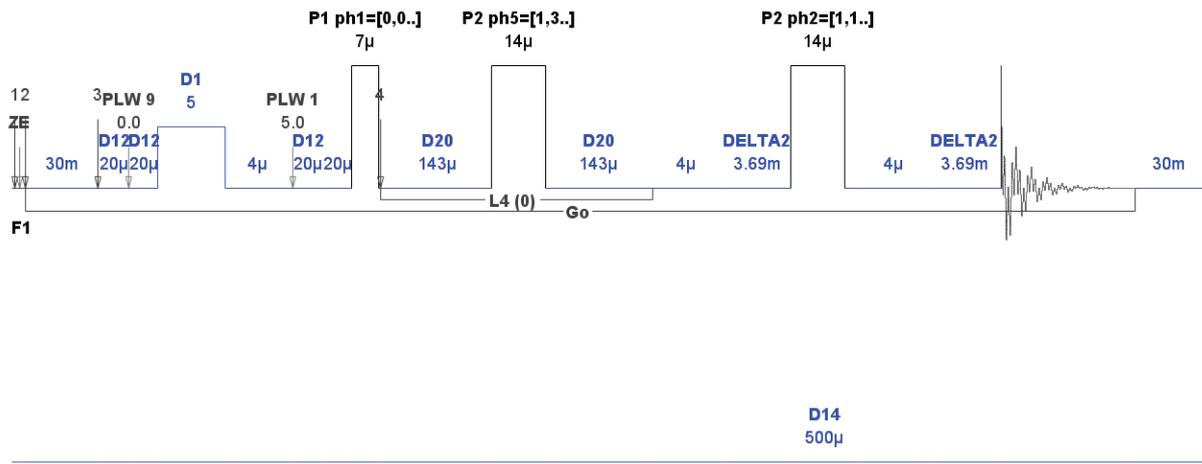


Figure 32 : Protocole d'acquisition d'une séquence POCE 40 pour une solution de métabolites purs.

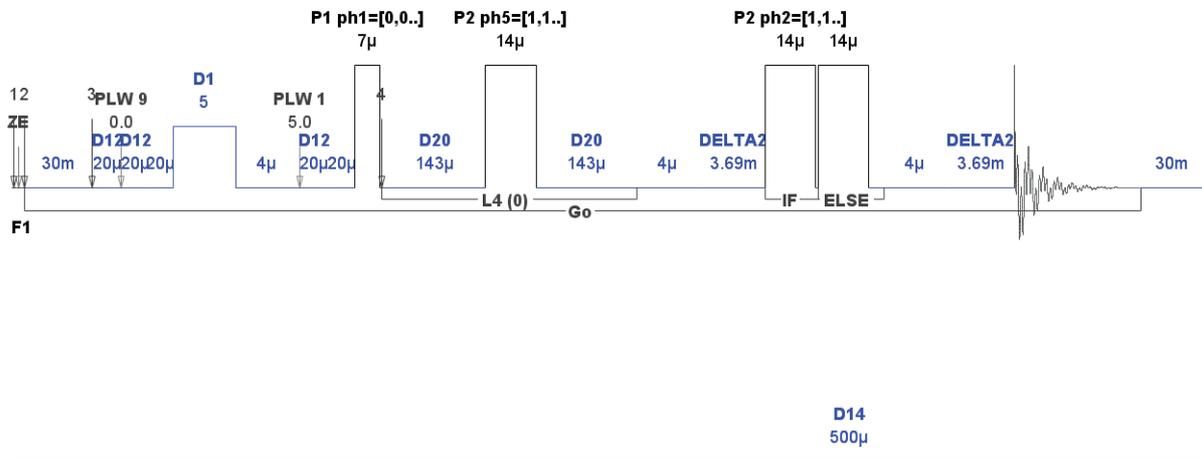


Figure 33 : Protocole d'acquisition d'une séquence POCE 42 pour une solution de métabolites purs.

## Séquence ZGPR

La séquence ZGPR est la plus basique des séquences 1D. Elle a servi de référence pour la quantification des solutions de métabolites purs (Tableau 4) (Figure 34).

	ZGPR-purs
Temps de relaxation (D1; sec)	2
Champ RF présaturation (Hz)	50
Durée d'acquisition (AQ; sec)	2,3396351
Échantillonnage	32768
Largeur de spectre (SW; ppm)	14,0019
Nombre de scans fictifs (DS)	4
Nombre de scans (NS)	128
Durée d'expérience (EXPT)	9 min37sec
Nombre de boucles (L4)	NA
Temps d'interpulse ( $\mu$ s)	NA

Tableau 4 : Paramètres d'acquisition de la séquence ZGPR.

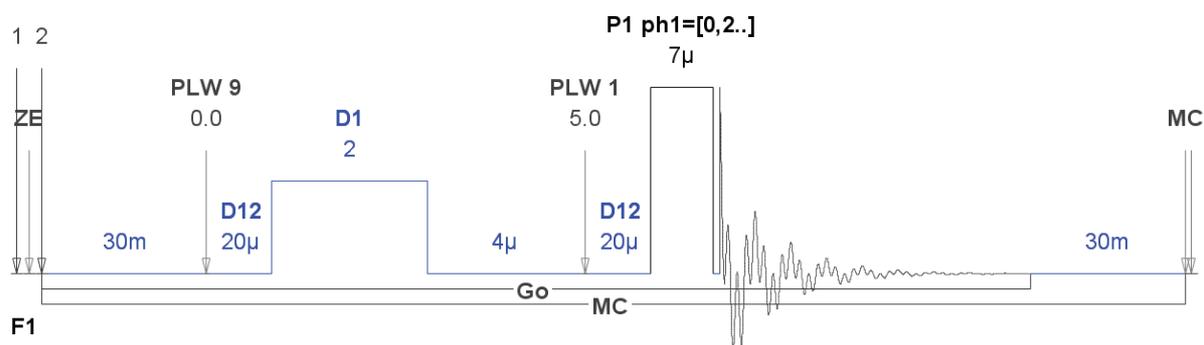


Figure 34 : Protocole d'acquisition de la séquence ZGPR pour une solution de métabolites purs.

## Séquence HSQC-1D

La séquence d'impulsion HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) 1D permet de voir quels  $^1\text{H}$  sont portés par les  $^{13}\text{C}$  (Figure 35). Cette séquence permet d'éliminer complètement le signal des  $^1\text{H}$  liés à des  $^{12}\text{C}$  mais elle ne permet pas la détermination du rapport  $^{13}\text{C}/(^{13}\text{C}+^{12}\text{C})$ .

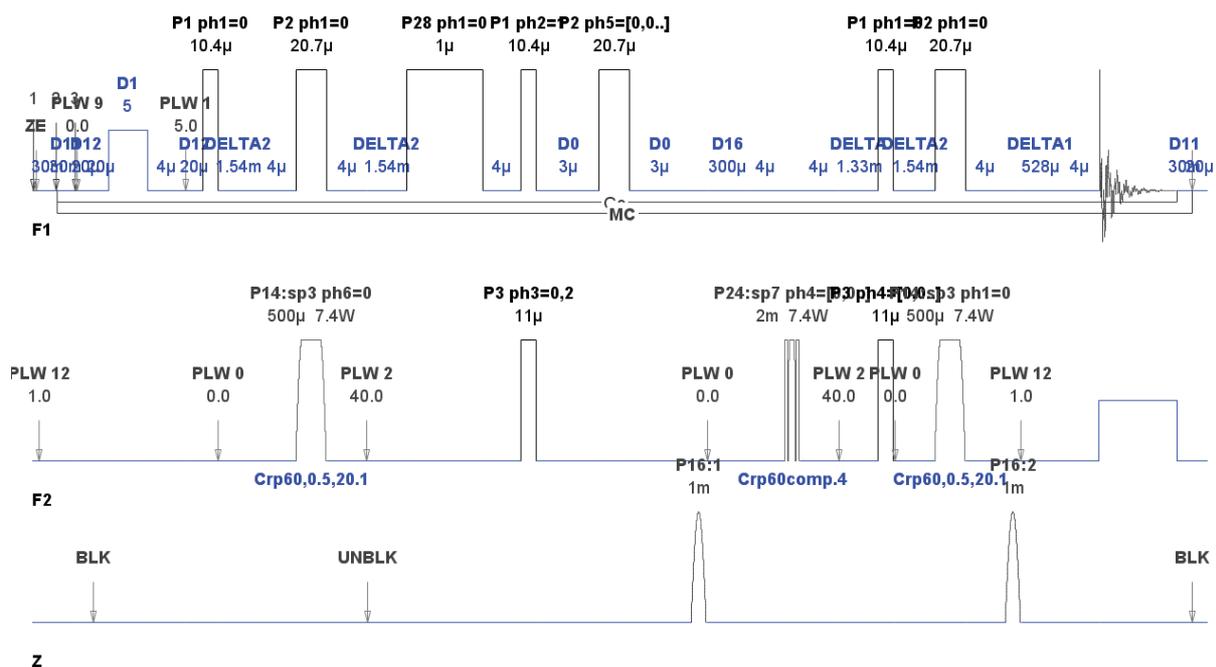


Figure 35 : Séquence d'impulsion HSQC-1D.

### 3.1.2.2. Séquences 2D

Les spectres d'échantillons de sérum ou de biopsies montrent de multiples métabolites. On observe parfois un recouvrement des signaux (aussi appelé « *overlap* »), qui rend l'interprétation délicate. Il est alors intéressant d'utiliser des séquences 2D. Elles permettent une identification plus précise des métabolites en utilisant une 2<sup>ème</sup> dimension représentant le déplacement chimique  $^{13}\text{C}$ .

*Dimensions directe et indirecte :*

F1 : indirecte (verticale) signaux RMN du carbone

F2 : directe (horizontale) signaux RMN du proton

### Séquence HSQC-2D

La séquence HSQC-2D est une expérience 2D hétéronucléaire. Elle corrèle les déplacements chimiques des  $^1\text{H}$  et des  $^{13}\text{C}$  directement liés (couplage  $^1J_{\text{H-}^{13}\text{C}}$ ). Elle fonctionne sur le principe de transfert de polarisation du  $^1\text{H}$  vers le  $^{13}\text{C}$ , puis du  $^{13}\text{C}$  vers le  $^1\text{H}$ , permettant ainsi un gain de sensibilité (Figure 36) (Tableau 5).

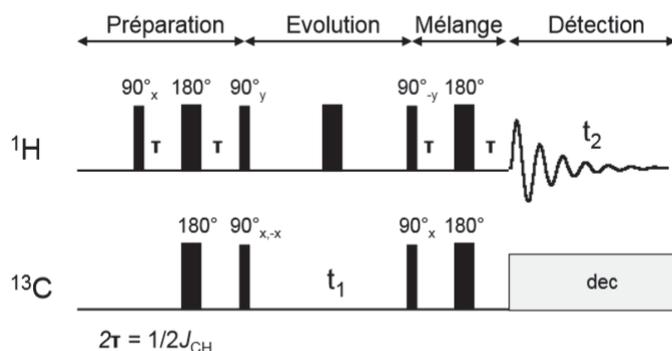


Figure 36 : Séquence HSQC classique. Détection du  $^1\text{H}$  avec découplage  $^{13}\text{C}$  (d'après S. Akoka, Université de Nantes).

Chaque tache représentée sur le spectre HSQC-2D correspond à un groupement CH, CH<sub>2</sub> ou CH<sub>3</sub>. La position de la raie dans la dimension 1 (F1, en ordonnée) sera donc déterminée par le déplacement chimique du carbone considéré. La position de la raie dans la dimension 2 (F2, en abscisse) sera donc déterminée par le déplacement chimique du ou des protons directement liés à ce carbone.

	HSQC 1D-cellules	HSQC-2D-cellules	HSQC-2D-HR-cellules	HSQC 2D-biopsies
Temps de relaxation (D1; sec)	2	2	2	1,5
Champ RF présaturation (Hz)	50	50	50	50
Durée d'acquisition (AQ; sec)	0,5849088	F2: 0,5849088; F1: 0,0061440	F2: 0,2924544; F1: 0,0491520	F2: 0,146; F1: 0,0061
Échantillonnage	8192	F2: 8192; F1: 256	F2: 4096; F1: 2048	F2: 2048; F1: 256
Largeur de spectre (SW; ppm)	14,0019	F2: 14,0019; F1: 165,65	F2: 14,0019; F1: 165,65	F2: 14,0019; F1: 165,65
Nombre de scans fictifs (DS)	64	64	64	2
Nombre de scans (NS)	128	24	16	136
Durée d'expérience (EXPT)	8min25sec	4h32min25sec	21h32min28sec	16h23min17sec
Nombre de boucles (L4)	NA	NA	NA	NA
Temps d'interpulse (μs)	NA	NA	NA	NA

Tableau 5 : Paramètres d'acquisition de la séquence HSQC pour les différentes expériences réalisées.

#### *Interprétation d'une séquence HSQC-2D :*

Déplacements chimiques du lactate :

Groupement CH<sub>3</sub> :  $\delta\text{H}=1,33$  ppm ;  $\delta\text{C}=22,65$  ppm

Groupement CH :  $\delta\text{H}=4,12$  ppm ;  $\delta\text{C}=71$  ppm

Deux pics de corrélation correspondant à ces deux groupements apparaissent dans le spectre HSQC-2D (Figure 37 et Figure 38).

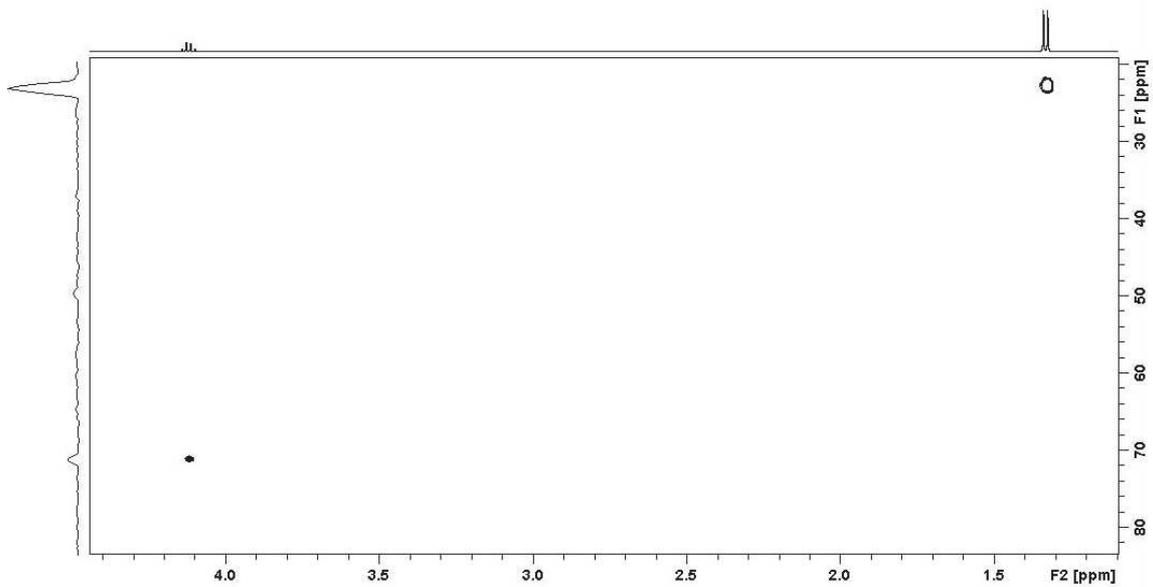


Figure 37 : Séquence HSQC-2D enregistrée sur une solution pure de lactate.

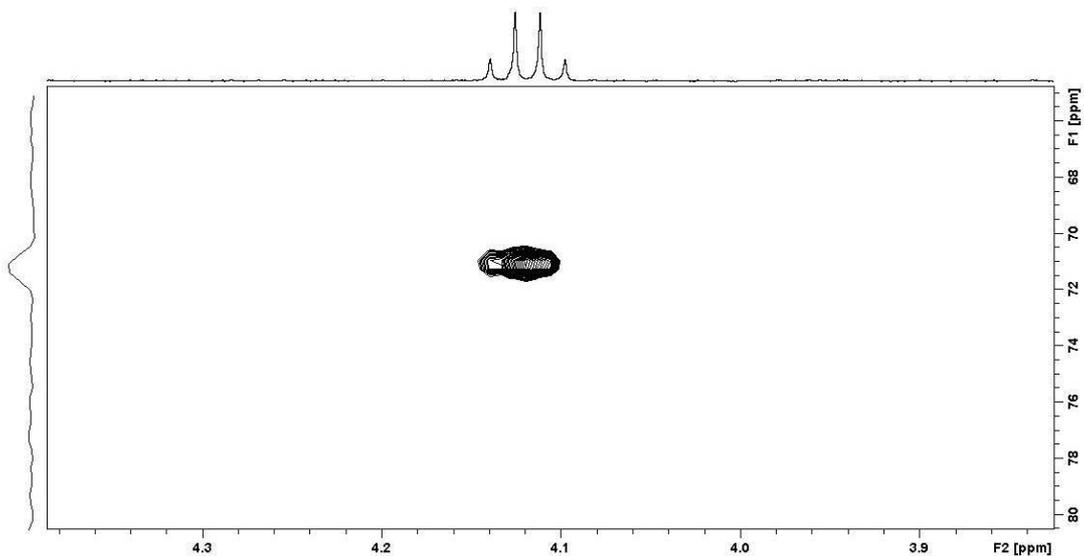


Figure 38 : Séquence HSQC-2D enregistrée sur une solution pure de lactate (zoom).

*Exemple d'interprétation d'une séquence HSQC-2D :*

La Figure 39 montre l'intérêt de réaliser une séquence 2D pour une identification optimale. Il s'agit du spectre HSQC-2D du  $^{13}\text{C}_6$ -glucose. À 3,77 ppm (F2), on observe un recouvrement de différents métabolites avec un pic élargi. La dimension F1 (carbone) permet de les différencier.

Déplacements chimiques des différents échantillons :

GSH : 3,78 ppm (F2) / 46 ppm (F1) *(en vert)*

Alanine : 3,77 ppm (F2) / 53,1 ppm (F1) *(en violet)*

Glutamate : 3,77 ppm (F2) / 57,3 ppm (F1) *(en orange)*

La double information permet une identification certaine.

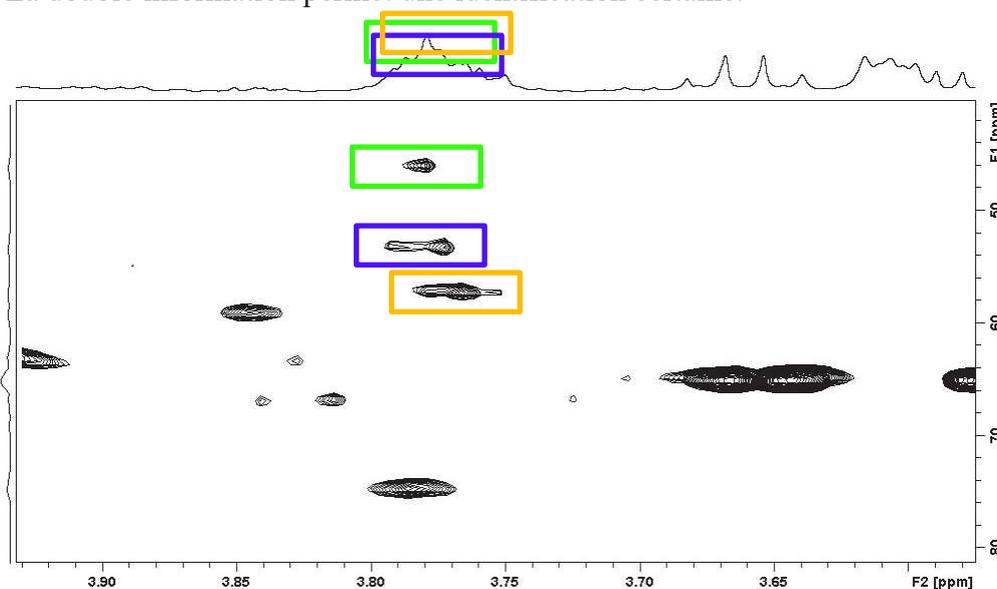


Figure 39 : Séquence HSQC-2D,  $^{13}\text{C}_6$ -glucose. Glutathion (en vert) / Alanine (en violet) / Glutamate (en orange).

### Séquence HSQC-HR

La séquence HSQC-HR utilise une très haute résolution dans la dimension indirecte  $^{13}\text{C}$  et permet l'identification des liaisons directes  $^1\text{J}_{\text{H-}^{13}\text{C}}$  et des couplages  $^1\text{J}_{^{13}\text{C-}^{13}\text{C}}$  (constante de couplage  $< 50$  Hz). Elle permet notamment la détection des carbones quaternaires *via* la multiplicité observée sur les pics de corrélation des carbones protonés adjacents (constante de couplage  $> 50$  Hz).

#### *Interprétation d'une séquence HSQC-HR :*

Pour le lactate, les déplacements chimiques du groupement CH sont :  $\delta\text{H} = 4,12$  ppm et  $\delta\text{C} = 71$  ppm. Cette séquence permet, *via* la multiplicité observée sur le pic de corrélation du groupement CH, l'identification du couplage  $^1\text{J}^{13}\text{CH}_3\text{-}^{13}\text{CH}$  (constante de couplage  $< 50\text{Hz}$ , en jaune) et l'identification du couplage  $^1\text{J}^{13}\text{COH-}^{13}\text{CH}$  (constante de couplage  $> 50$  Hz en vert). La structure caractéristique du doublet de doublets observé en F1 prouve que les deux carbones de part et d'autre du groupement CH sont des  $^{13}\text{C}$ . Le doublet de doublets apparaît comme un triplet sur la Figure 40 en raison de la résolution de la séquence.

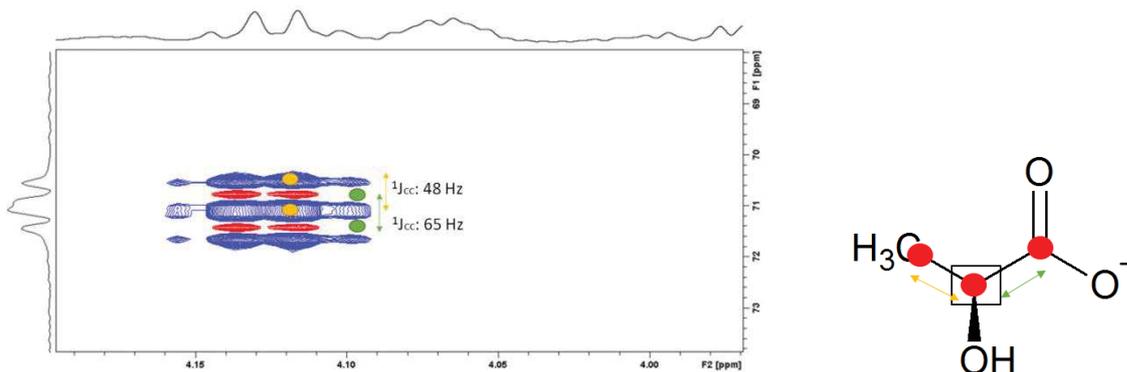


Figure 40 : Séquence HSQC-HR du lactate et marquage du lactate (le cercle rouge plein correspondant au  $^{13}\text{C}$  marqué).

### J-RES

La J-RES (2D J-RESolved correlation experiment) est une expérience 2D homonucléaire  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Tableau 6). Elle permet d'obtenir les avantages d'un spectre proton découplé proton dans la dimension 2 (F2) (on visualise le déplacement chimique du proton) et ceux d'un spectre couplé avec identification du nombre de protons portés par chaque carbone. Elle permet de comparer le pourcentage de molécules marquées au  $^{13}\text{C}$  *versus* non marquées en l'absence de couplage fort.

	JRES-purs+cellules
Temps de relaxation (D1; sec)	2
Champ RF présaturation (Hz)	50
Durée d'acquisition (AQ; sec)	F2: 2,339635; F1 :0,16000
Échantillonnage	F2: 32768; F1: 64
Largeur de spectre (SW; ppm)	F2: 14,0019; F1 : 0,3999
Nombre de scans fictifs (DS)	4
Nombre de scans (NS)	32
Durée d'expérience (EXPT)	2h35min28sec
Nombre de boucles (L4)	NA
Temps d'interpulse ( $\mu\text{s}$ )	NA

Tableau 6 : Paramètres d'acquisition de la séquence J-RES.

### Séquence HMBC

La séquence HMBC est utilisée pour l'étude des couplages longue distance  $^2\text{J}_{\text{IH-13C}}$  et  $^3\text{J}_{\text{IH-13C}}$  (carbonyle marqué non visible en HSQC-HR par exemple) (Tableau 7) (Figure 41). Les couplages directs peuvent parfois être observés sur cette séquence.

	HMBC cellules
Temps de relaxation (D1; sec)	1
Champ RF présaturation (Hz)	46
Durée d'acquisition (AQ; sec)	F2: 1,1698176; F1: 0,0370083
Échantillonnage	F2: 16384; F1: 2048
Largeur de spectre (SW; ppm)	F2: 14,0019; F1: 220
Nombre de scans fictifs (DS)	16
Nombre de scans (NS)	16
Durée d'expérience (EXPT)	20h50min29sec
Nombre de boucles (L4)	NA
Temps d'interpulse ( $\mu$ s)	NA

Tableau 7 : Paramètres d'acquisition HMBC.

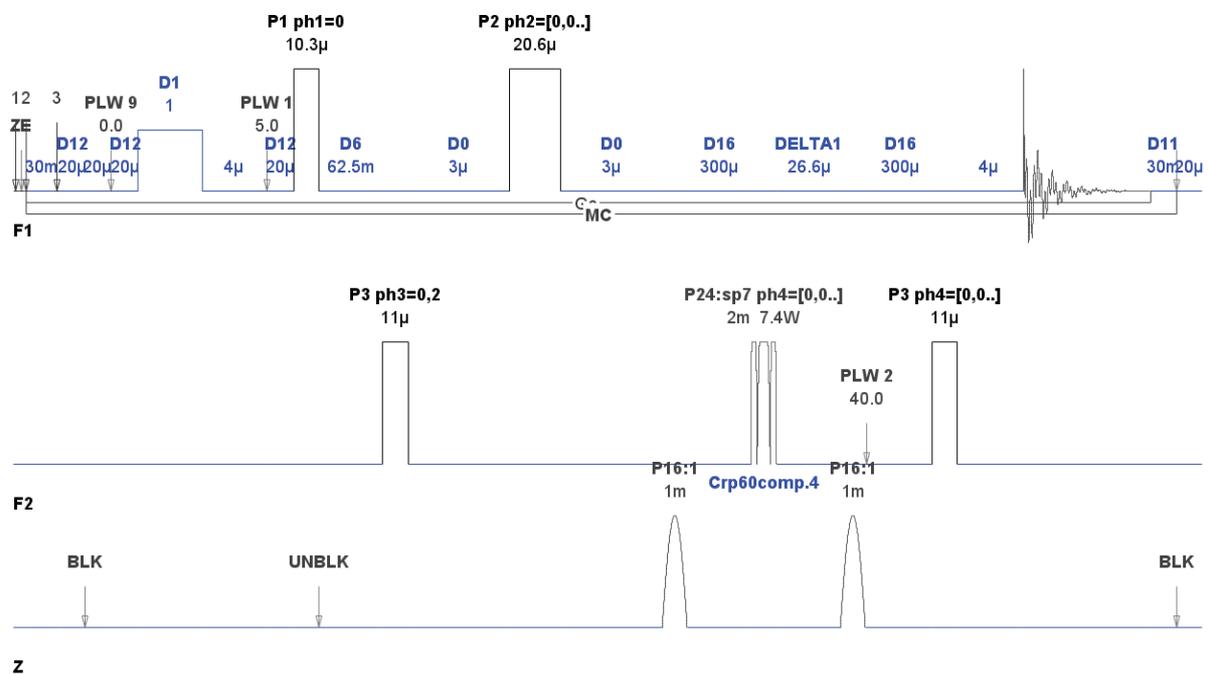


Figure 41 : Protocole d'acquisition de la séquence HMBC.

*Interprétation d'une séquence HMBC : (Figure 42)*

Pour le lactate, le déplacement chimique du groupement  $\text{CH}_3$  est :  $\delta\text{H}=1,33$  ppm. Le carbonyle a un déplacement chimique  $\delta\text{COO}^- = 185$  ppm.

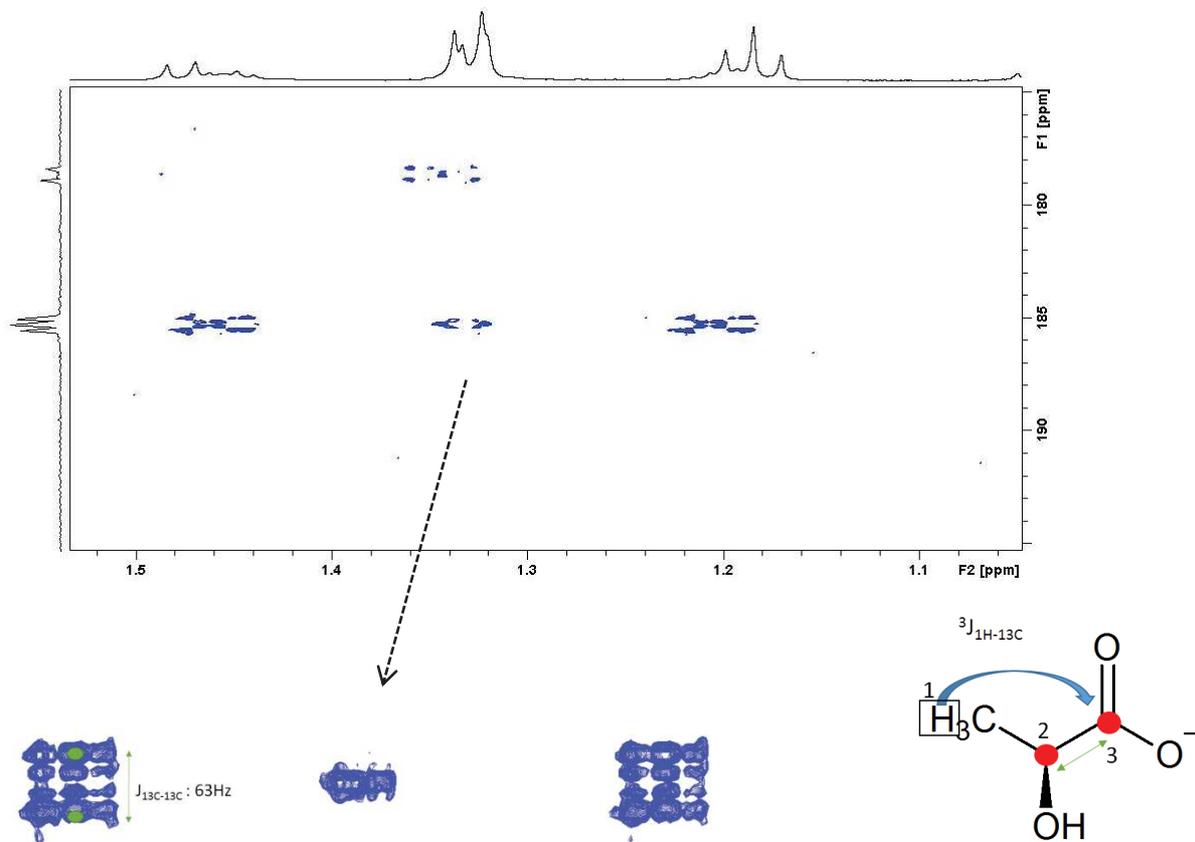


Figure 42 : Séquence HMBC du lactate et marquage du lactate (le cercle rouge plein correspondant au  $^{13}\text{C}$  marqué). À 1,33 ppm on observe le  $^1\text{H}$  du groupement  $\text{CH}_3$ . Le déplacement chimique en F1 est de 185 ppm correspondant donc au groupement carbone du carbonyle (3) qui est marqué et qui couple avec le  $^1\text{H}$  du  $\text{CH}_3$  (flèche bleue). En F1, la constante de couplage  $J_{^{13}\text{C}-^{13}\text{C}}$  est égale à 63 Hz : il s'agit donc d'un couplage entre le carbone du carbonyle et son carbone voisin (2) qui est alors marqué (on observe un doublet déformé, en lien avec des distortions).

En résumé, concernant la **métabolomique**, qui, rappelons-le, vise à identifier et quantifier les métabolites d'un échantillon biologique, la séquence CPMG a été utilisée. En cas de recouvrement, l'identification a été complétée par la séquence HSQC-2D qui permet d'observer l'abondance naturelle du  $^{13}\text{C}$  (1% de  $^{13}\text{C}$  dans l'organisme).

Concernant l'**analyse des flux métaboliques**, un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  a été effectué *via* l'utilisation de sondes moléculaires marquées. Des séquences spécifiques pour l'observation des  $^{13}\text{C}$  et/ou des  $^1\text{H}$  directement attachés aux  $^{13}\text{C}$  ont permis l'identification et la quantification (HSQC-1D, HSQC-2D, HSQC-HR et HMBC-HR) Les séquences POCE et J-RES ont estimé, pour chaque groupement de différents métabolites, le pourcentage de molécules marquées au  $^{13}\text{C}$  *versus* non marquées ( $^{13}\text{C}/(^{12}\text{C} + ^{13}\text{C})$ ).

### 3.1.3. Pré et post traitement spectral

#### 3.1.3.1. *Prétraitement spectral*

Le pré traitement commence par la correction de phase et est suivie par une correction de la ligne de base. Celle-ci est cruciale, car elle va influencer sur la mesure de l'intégrale des pics. La normalisation des spectres se fait par rapport à la masse de l'échantillon. Les spectres sont ensuite recalés par rapport à une référence, en général le lactate (pic à 1,33 ppm).

La segmentation fait aussi partie du pré traitement. Elle sera expliquée dans le chapitre relatif à la quantification (*cf.* 3.1.5.).

#### 3.1.3.2. *Traitement du signal*

Le traitement des données permet d'améliorer la qualité des spectres sans ajouter de nouvelles données. L'apodisation, par exemple (utilisée pour la quantification des séquences POCE), consiste à multiplier le FID par une fonction (exponentielle ou gaussienne) avant la transformée de Fourier, ce qui modifie l'enveloppe du FID. On améliore le rapport signal/bruit, la largeur spectrale mais on perd en résolution. Avec une fonction gaussienne, on améliore la résolution (mais on détériore le rapport en signal/bruit).

### 3.1.4. Identification

L'identification des métabolites se fait à partir des valeurs de déplacements chimiques de la littérature (208) (209) et par le biais d'une base de données locale (210). Cette base de données est disponible dans la revue *Magnetic Resonance in Medicine*.

Pour réaliser cette base de données, 76 métabolites, que l'on trouve classiquement dans les biopsies humaines, ont été préparés en solution aqueuse à une concentration connue et analysés par RMN HRMAS. Les spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'analyse des échantillons de biopsie couramment effectués dans notre hôpital. Un ensemble complet de spectres RMN (1D  $^1\text{H}$ , 1D  $^1\text{H}$ -CPMG, 2D J-Resolved, 2D TOCSY et 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC) a été enregistré à 500 MHz et 277 K pour chaque métabolite. Des expériences pour mesurer le  $T_1$  et le  $T_2$  des différents protons présents dans les 76 métabolites ont également été effectuées. L'identification des métabolites dans les échantillons de biopsie est rendue plus rapide et plus fiable grâce à cette base de données.

Les déplacements chimiques sont donnés pour le proton et pour le carbone. En effet, dans les tissus biologiques sans marquage spécifique, le pourcentage de  $^{13}\text{C}$  est de 1%. La gamme des déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  est beaucoup plus étendue que celle du  $^1\text{H}$  : 250 ppm pour le  $^{13}\text{C}$  contre 12 ppm pour le  $^1\text{H}$  (Figure 43). Cette dernière caractéristique limite les recouvrements entre les plages correspondant à des groupements différents et facilite l'interprétation.

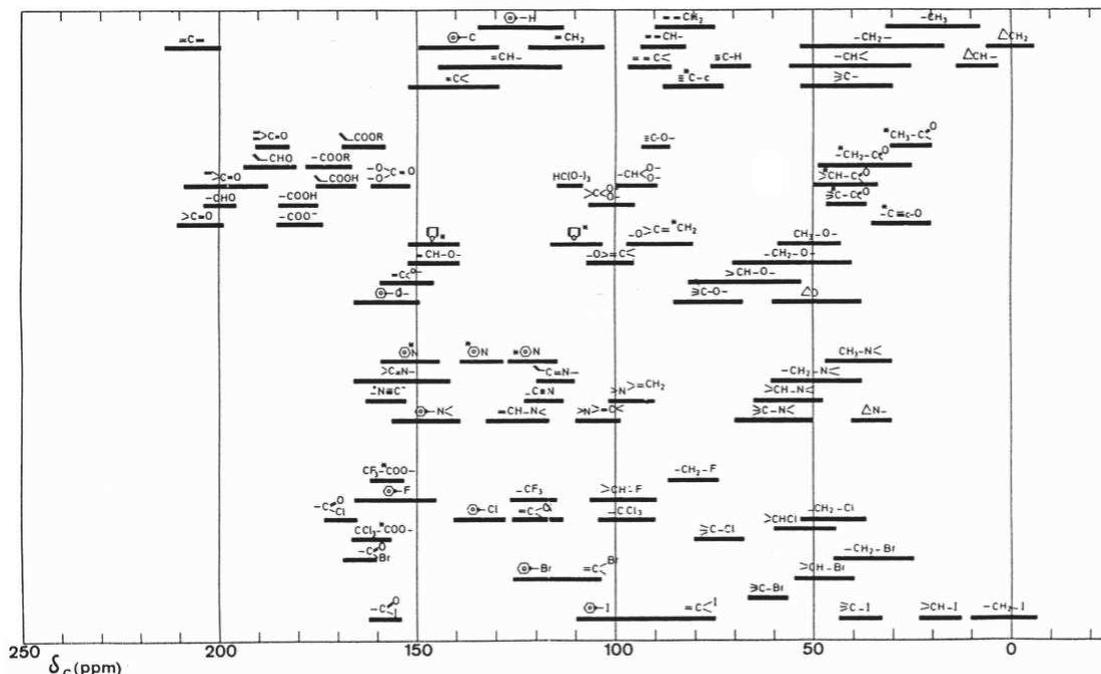


Figure 43 : Table des déplacements chimiques du carbone 13 (d'après S.Akoka).

Les séquences RMN 2D permettent ainsi d'attribuer avec précision les signaux des métabolites difficiles à identifier sur les séquences RMN 1D. C'est la séquence HSQC-2D explicitée précédemment qui est la plus utilisée pour l'identification.

### 3.1.5. Quantification

Deux méthodes ont été utilisées pour quantifier *via* la séquence CPMG.

La méthode de quantification la plus classique est le calcul de l'aire sous la courbe avec comparaison à une référence externe (en général un échantillon de lactate pur correspondant à un nombre de nmoles connu et ajusté au nombre de protons). L'identification est alors semi-automatique *via* Matlab®. Pour les analyses effectuées sur les biopsies (*cf.* 4.1. et 4.2.), les pics obtenus sont automatiquement définis en utilisant un programme « maison »

développé sous Matlab 7.0 (MathWorks, Natick, MA, USA). Au préalable, les spectres sont normalisés par rapport à la masse de l'échantillon. Les résultats de la quantification sont alors donnés en nmol/mg de tissu.

L'autre méthode utilise le logiciel Chenomx (Edmonton, Alberta, Canada). Elle permet une identification et une quantification semi-automatique. Les 76 métabolites purs de la base de données locale, mentionnée précédemment, ont été intégrés dans Chenomx et servent de référence à la quantification (210).

Par ailleurs, dans le cadre de ce travail, nous avons développé une méthode de quantification relative à partir de la séquence POCE qui nous permet d'estimer le pourcentage de molécules marquées au  $^{13}\text{C}$  par rapport à la quantité totale de la molécule :  $^{13}\text{C}/(^{13}\text{C}+^{12}\text{C})$ .

### 3.1.6. Analyses statistiques

#### 3.1.6.1. Analyse multivariée

Elle permet l'étude des relations qui peuvent exister entre plusieurs variables. L'étape préalable à cette analyse est la réalisation d'un échantillonnage aussi appelée «*bucketing*» ou «*binning*». Celui-ci se fait par l'intermédiaire du logiciel AMIX 3.9.14 (Bruker, GmbH, Allemagne). Les spectres sont ainsi découpés en petites régions : «*les buckets*». Les «*buckets*» sont de 0,01 ppm. Pour un spectre entier on a 421 buckets ou variables. Une molécule correspond à 8-12 variables. La valeur de l'intégration de chaque variable est normalisée en divisant par l'intensité totale de l'intégralité du spectre.

Nous avons utilisé 2 types d'analyses multivariées :

- Analyse en composantes principales (ACP), analyse non supervisée sans *a priori* : description des caractères intrinsèques des profils métaboliques définissant un jeu de données sans connaissance a priori des groupes d'appartenance des échantillons (211).
- Analyse des moindres carrés partiels – analyse discriminante (« Partial Least Square – Discriminant Analysis », PLS –DA), analyse supervisée avec *a priori* : elle exploite des informations complémentaires sur la nature des échantillons.

### 3.1.6.2. *Analyse univariée*

Plusieurs analyses univariées peuvent également être réalisées à partir de la quantification : analyse de variance (ANOVA), t-test, tests non paramétriques comme le Test U de Mann Whitney utilisé dans l'étude des oligodendrogliomes *via* le logiciel R (212).

### 3.1.6.3. *Analyse de réseaux*

L'analyse de réseaux s'est faite *via* l'algorithme ADEMA, qui utilise l'information mutuelle. Ce réseau a été construit en utilisant le « *Kyoto Encyclopedia of genes and genomes* » (213) et le travail de Salway (214). C'est une technique multivariée qui permet d'identifier des changements de niveau de métabolites attendus (215). Il n'est plus question de différencier 2 populations à partir des niveaux de métabolites mais de mettre en évidence le(s) réseau(x) le(s) plus emprunté(s).

*Étapes simplifiées de fonctionnement d'ADEMA* (Figure 44) :

- Transformer des valeurs réelles en valeurs discrètes (a)
- Identifier les niveaux spécifiques des métabolites (b)
- Calculer les probabilités et combiner les résultats informatifs (c) et (d)
- Comparer les niveaux de métabolites attendus entre eux (d)
- Créer un réseau de connexions des métabolites (e)

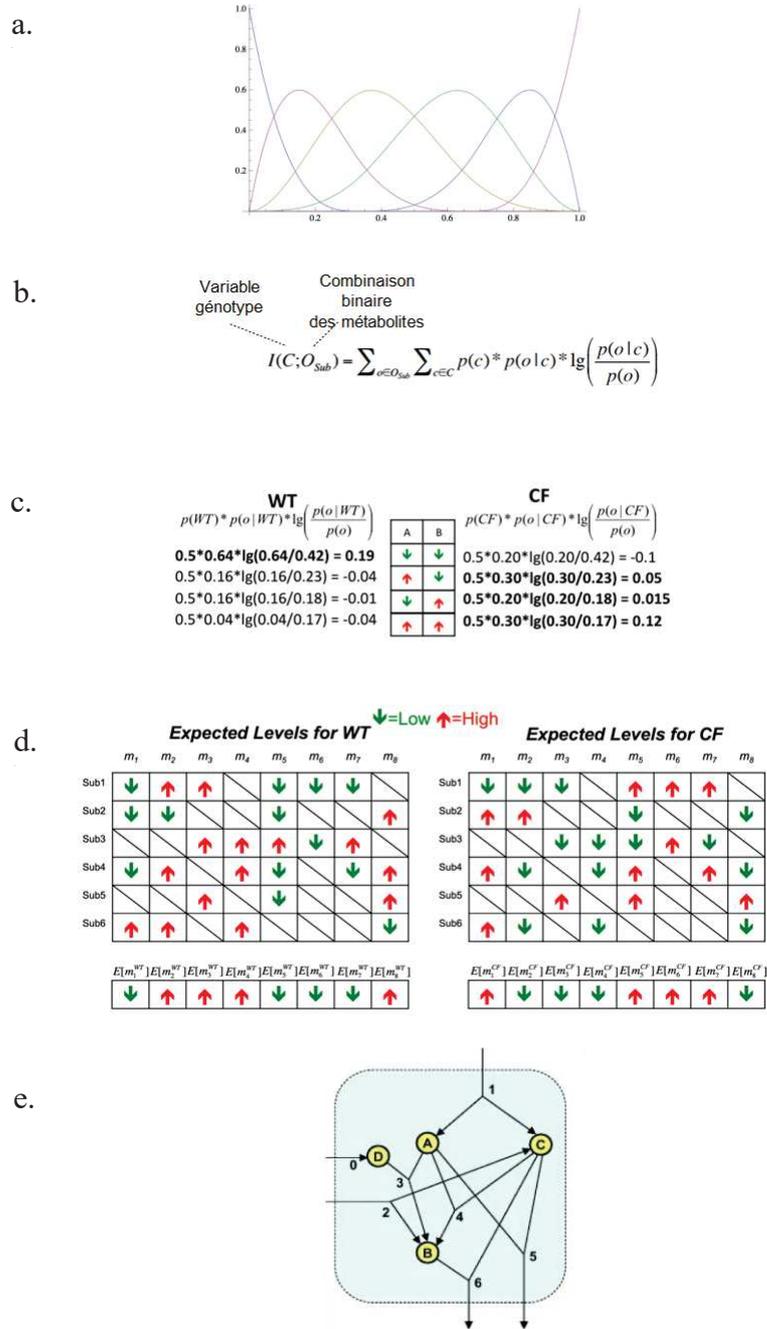


Figure 44 : Principe d'ADEMA, d'après Cicek *et al.* (215).

### 3.1.6.4. Analyse de survie

Des courbes de Kaplan-Maier ont été utilisées pour les analyses de survie dans l'étude des corrélations entre génomique, métabolomique et survie des patients suivis pour un oligodendrogliome.

### **3.2. Prélèvement et conservation des échantillons**

Une partie de ce travail a concerné l'étude d'échantillons de prélèvements tissulaires cérébraux réalisés au bloc opératoire de neurochirurgie. L'acheminement et la conservation des échantillons suivent un protocole bien codifié.

Les échantillons ont été soit congelés dans de l'azote liquide dans un Dewar approprié dans la salle d'opération, soit transférés du bloc au spectromètre par un système pneumatique. La durée d'ischémie froide a été inférieure à 2 minutes pour tous les échantillons. Ils ont ensuite été préparés à une température de  $-20^{\circ}\text{C}$ . La quantité de tissu utilisée était en général de 15 mg à 20 mg. Chaque échantillon de tissu a été placé dans un insert jetable de 25  $\mu\text{L}$ . Un volume de 10  $\mu\text{L}$  d'oxyde de deutérium a ensuite été ajouté à chaque insert de biopsie. Après une étape de centrifugation, de l'oxyde de deutérium a été ajouté à nouveau pour remplir l'insert.

Les échantillons qui n'étaient pas analysés immédiatement ont été stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant la période précédant l'analyse HRMAS ultérieure.

Lors de l'analyse, l'insert est placé dans un rotor en  $\text{ZrO}_2$  de 4 mm et inséré dans le spectromètre RMN, après fermeture de l'insert par un bouchon à ailettes faisant office de turbine. Toutes les acquisitions ont été réalisées à  $4^{\circ}\text{C}$ . Après l'acquisition, les inserts ont été conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour la réalisation d'autres analyses éventuelles et de contrôles.

### **3.3. Contrôle histologique des échantillons**

Une fois les analyses RMN HRMAS achevées, une analyse histologique supplémentaire est effectuée pour chaque insert.

Les inserts sont coupés pour récupérer le tissu tumoral à analyser. Une coloration à l'Hématoxyline-Eosine (HE) est utilisée pour identifier les cellules tumorales, le pourcentage d'infiltration tumorale et le pourcentage de nécrose.

### **3.4. Biologie moléculaire**

L'étude de l'hétérogénéité des oligodendrogliomes a conduit à l'analyse de 6 mutations : IDH1, TP53, codéletion 1p19q, méthylation du promoteur MGMT, PTEN et EGFR.

L'analyse génétique du statut mutationnel d'IDH1 a été déterminée à partir de l'ADN génomique extrait du tissu tumoral fixé à la paraffine et au formaldéhyde de la moitié du contenu des inserts (l'autre moitié ayant été utilisée pour l'analyse histologique). Pour les autres analyses génétiques, on a utilisé l'échantillon « miroir » de l'insert.

La méthylation du promoteur MGMT a été étudiée avec une PCR fluorescente semi-quantitative spécifique à la méthylation (FSQ-MS-PCR) développée en interne (216). Les altérations génomiques des autres gènes (IDH1, 1p19q, TP53, EGFR et PTEN) ont été évaluées par PCR au moyen d'un allélotypage de microsatellites situés dans chacun des différents gènes ou régions chromosomiques étudiés ou à proximité (*cf.* ci-dessous).

L'ADN génomique a été isolé selon les techniques habituelles avec le kit de purification d'ADN QIAamp® (Qiagen, Courtaboeuf, France). Un spectrophotomètre Nanodrop® (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA) a été utilisé pour évaluer la qualité et la quantification de l'ADN. Les concentrations d'ADN génomique des échantillons de tumeurs ou de sang appariés variaient de 50 à 400 ng/μL et de 50 à 150 ng/μL, respectivement.

#### *Détails de l'analyse biomoléculaire :*

##### *Mutation IDH 1*

En ce qui concerne l'analyse génétique de l'état mutationnel de l'IDH1, un fragment de 129 pb de longueur couvrant le domaine catalytique de l'IDH1, dont le codon 132, a été amplifié par PCR. Les produits PCR ont été purifiés à l'aide du kit de purification PCR (Qiagen) et l'amplicon a été séquencé dans les directions avant (5'-ACCAAATGGCACCATACGA-3') et arrière (5'-GCAAAAATCACATTATCATGCCAAC-3') pour IDH1. Les conditions cycliques étaient les suivantes : 95 °C pendant 5 minutes ; 30 cycles de 95 °C pendant 30 secondes, 56 °C pendant 40 secondes et 72 °C pendant 50 secondes ; enfin, 72 °C pendant 5 minutes.

##### *1p/19q codéletion, TP3, EGFR et statut génomique du PTEN*

Les microsatellites ciblant les différents loci étudiés ont été analysés sur de l'ADN sain et tumoral appariés. Les différentes amorces nommées D1S201, D1S250 et D1S468 (couvrant 1p13.2 à 1p36.3 loci) ont été utilisées pour analyser le chromosome 1p et les amorces nommées D19S180, D19S217 et D19S397 (couvrant 19q13.2 à 19q13.42 loci) ont été utilisées pour le chromosome 19q. Le gène p53 (situé à 17p13 locus) a été ciblé avec des microsatellites TP53 dédiés et des amorces EGFR avec D7S2475, D7S2542, D7S2550,

D7S659 et D7S801 à 7p12 locus. Le gène PTEN a été ciblé avec les amorces D10S541 et D10S215 au locus 10q23. La description de l'amorce de séquence peut être obtenue sur <http://www.gdb.org> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99>. L'ADN des deux échantillons appariés (10 ng) a été amplifié par PCR dans un volume total de 25 µL en utilisant 0,125 µL de Taq polymérase et 4 pmol d'amorces inversées marquées Cy5. La PCR a été réalisée dans un thermocycleur Omnigen Hybaid (Hybaid Ltd, Ashford, Royaume-Uni) selon le protocole suivant : 5 minutes à 95°C, 30 cycles de 1 minute chacun à 95°C, 1 minute à 55°C et une minute à 72°C, suivis de 5 minutes à 72°C. Les différents produits PCR ont ensuite été analysés par électrophorèse capillaire sur ABI PRISM® Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Genemapper (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) qui détecte les déséquilibres alléliques correspondant à une modification du rapport des allèles dans l'ADN tumoral par rapport à l'ADN du sang apparié. Ces déséquilibres alléliques sont la conséquence soit de délétions, soit d'amplifications des loci étudiés.

### 3.5. Solutions de métabolites purs

Des solutions de métabolites purs marqués au  $^{13}\text{C}$  à différentes concentrations (Tableau 8), ainsi que des mélanges de ces métabolites, ont été constituées afin de choisir les séquences les plus adaptées et de valider la méthodologie.

Métabolites	% $^{13}\text{C}$	% $^{12}\text{C}$	Concentrations (mM)
Alanine	40	60	3,1/4,65
Glycine	50	50	3,1/3,1
Acétate	60	40	4,65/3,1
Glucose	80	20	12,4/3,1
Glutamine	30	70	3,1/7,23
Glutamate	20	80	3,1/2,4
Aspartate	40	60	3,1/4,65
Lactate	60	40	4,65/3,1

Tableau 8 : Pourcentage de carbone marqué et non marqué au  $^{13}\text{C}$  avec les concentrations respectives.

Ces solutions ont été préparées 3 fois (3 inserts) afin de vérifier la reproductibilité.

Nous avons réalisé ces analyses pour les huit métabolites individuellement et ensuite pour des mélanges de deux métabolites ayant des déplacements chimiques proches (glutamine/glycine et glutamine/glutamate).

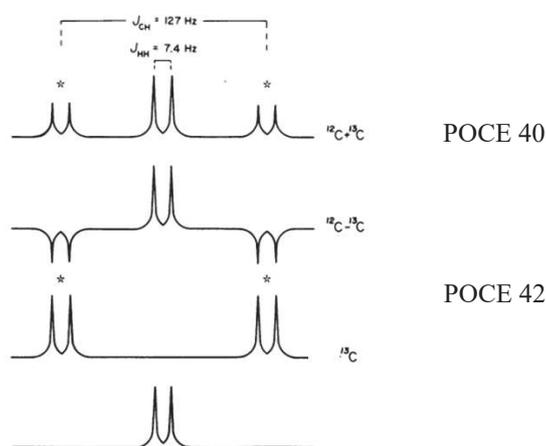
On a utilisé 4 séquences différentes pour choisir la méthode la plus fiable avec des temps de relaxation différents pour certaines : la séquence ZGPR (avec des temps de relaxation à 2s et 15s), la séquence CPMG (avec des temps de relaxation à 2s et 15s), les séquences POCE (temps de relaxation 5s) et la J-RES. Différents temps de relaxation ont été testés afin de s'assurer que tous les groupements des métabolites aient eu le temps de relaxer complètement.

*Quantification relative :*

Séquences ZGPR : on calcule l'aire sous la courbe du pic central ( $^{12}\text{C}$ ), du pic droit et du pic gauche. Ces 2 derniers correspondent aux satellites ( $^{13}\text{C}$ ).

Séquences CPMG : on calcule l'aire sous la courbe du pic central ( $^{12}\text{C}$ ), du pic droit et du pic gauche. Ces 2 derniers correspondent aux satellites ( $^{13}\text{C}$ ).

Séquences POCE : quantification de l'aire sous la courbe selon la méthode ci-dessous. On calcule l'aire sous la courbe de la séquence POCE 40 et de la POCE 42. On obtient les pourcentages de  $^{13}\text{C}$  et de  $^{12}\text{C}$  par soustraction (Figure 42).



**Figure 45 : Du haut vers le bas : séquence POCE 40 qui montre les  $^{12}\text{C}$  et les  $^{13}\text{C}$ , séquence POCE 42 qui montre les  $^{13}\text{C}$ , soustraction des 2 précédentes puis découplage permettant de visualiser les  $^{12}\text{C}$ .**

J-RES : quantification des différentes taches obtenues avec calcul de l'aire sous la courbe des satellites ( $^{13}\text{C}$ ) et du pic central ( $^{12}\text{C}$ ). Les couplages forts empêchent cependant la quantification précise de certains groupements de métabolites.

Le pic choisi ensuite pour la quantification des cellules était celui qui présentait la quantification la plus fiable et qui nous permettait d'éviter les zones de recouvrement.

## 3.6. Cultures cellulaires

### 3.6.1. Protocole de passage des cultures cellulaires et mise en insert

Avant de commencer le passage, il faut vérifier au microscope la confluence des cellules. On a alors 2 situations possibles :

- Cellules confluentes (80%, environ  $10 \cdot 10^6$  cellules), il est nécessaire alors soit de repiquer les cellules, soit de les prélever pour analyse (passage) ;
- Cellules non confluentes : il faut poursuivre l'entretien des cellules (changement de milieu).

Lorsque 80% de confluence est atteint dans les boîtes de culture, les cultures cellulaires sont repiquées selon le protocole suivant :

- *Lavage du tapis cellulaire :*  
Éliminer le milieu en l'aspirant à l'aide d'une pipette en verre.  
Rincer la boîte de culture avec 3 ml de PBS (Tampon Phosphate Salin) afin d'éliminer les protéines qui peuvent inhiber l'action de la trypsine.  
Éliminer le PBS.
- *Trypsination* (afin de rompre les liaisons entre les cellules et le support de culture) :  
Ajouter 3 ml de trypsine.  
Mettre la boîte de culture dans l'incubateur pendant 3-4 min à 37°C pour activer la trypsine.  
Vérifier au microscope que l'ensemble des cellules sont rondes et détachées de la boîte de Pétri.
- *Arrêt de la trypsination :*  
Ajouter 3 ml de DMEM High glucose (milieu) au mélange cellules + trypsine, effectuer des mouvements d'aspiration et d'éjection avec la pipette sur toutes les parties de la boîte de culture pour arrêter l'action de la trypsine.  
Introduire tout le mélange dans un flacon annoté de 15 ml.  
Centrifuger le tube pendant 5 min. Cette centrifugation permet de laver les cellules et de les débarrasser totalement de la trypsine.  
Éliminer le surnageant avec la pipette en verre en évitant d'aspirer le culot cellulaire.  
Remettre le culot en suspension dans 6 ml de milieu.

- *Comptage :*

Déposer dans un tube Eppendorf, 10 µl de bleu Trypan et 10 µl de la suspension cellulaire, homogénéiser. Prélever ensuite 10 µl pour les déposer au niveau de la lame. Procéder aux comptages des cellules grâce au compteur automatique (« TC20™ automated cell counter » de Bio-Rad), qui permet également d'obtenir le pourcentage de viabilité cellulaire.

Le comptage est effectué 2 fois pour le contrôle qualité. En cas de discordance importante, une 3<sup>e</sup> mesure est réalisée. De plus, pour chaque expérience on prépare 2 inserts (réplicat) pour vérifier la reproductibilité des analyses spectrales.

- *Ensemencement :*

Répartir uniformément le volume souhaité dans les différentes boîtes de culture contenant 10 ml de milieu.

Contrôler l'aspect et la présence des cellules au microscope.

Mettre les boîtes de cultures dans l'incubateur à 37°C.

*Composition des milieux de culture :*

*Milieux utilisés pour la première série d'expériences :*

- **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)** avec du SVF

Pour 100mL :

4.5 g/L D-Glucose

1% glutamine (0,3 g/L)

1% NEAA (glycine 0,75 g/L, L-alanine 0,89 g/L, L-asparagine monohydrate 1,5 g/L, acide L-aspartique 1,33 g/L, acide L-glutamique 1,47 g/L, L- proline 1,15 g/l et L-sérine 1,05 g/L).

10% SVF (sérum de veau fœtal)

- **DMEM** supplémenté du B27

Pour 100mL :

1 g/L D-Glucose

1% glutamine (0,3 g/L)

1% NEAA

10% B27

+ 2  $\mu$ L EGF (epithelial growth factor) ( $2 \cdot 10^{-5}$  g/L)

+ 2  $\mu$ L FGF (fibroblast growth factor) ( $2 \cdot 10^{-5}$  g/L)

*Milieux utilisés pour la deuxième série d'expérience :*

- **DMEM High Glucose** avec du SVF

Pour 100 ml :

4,5 g/L D-Glucose

1% pyruvate

1% NEAA

10% SVF

- **DMEM(1x) + Glutamax tm-I** avec du SVF

Pour 100 ml :

1 g/L D-Glucose

L-Alanyl-L-Glutamine (glutamax) (0,54 g/L)

1% pyruvate

1% NEAA

10% SVF

*Protocole de mise en insert : (moins de 15 minutes)*

- Peser la masse de l'insert (tous les inserts n'ont pas le même poids).
- Prélever le volume adéquat de la solution et l'introduire dans un Falcon<sup>®</sup> de 15 ml (si le volume à prélever est inférieur à 1,5 ml, introduire la solution dans un tube Eppendorf).
- Centrifuger à 4°C pendant 5 minutes (300 G).
- Éliminer le milieu.
- Remettre en suspension le culot cellulaire avec 1 ml de PBS froid (conservé à 4°C).
- Transférer la solution dans un tube Eppendorf de 1,5 ml.
- Centrifuger le tube Eppendorf à 4°C pendant 5 minutes (300 G).
- Aspirer le surnageant avec la pipette en verre.

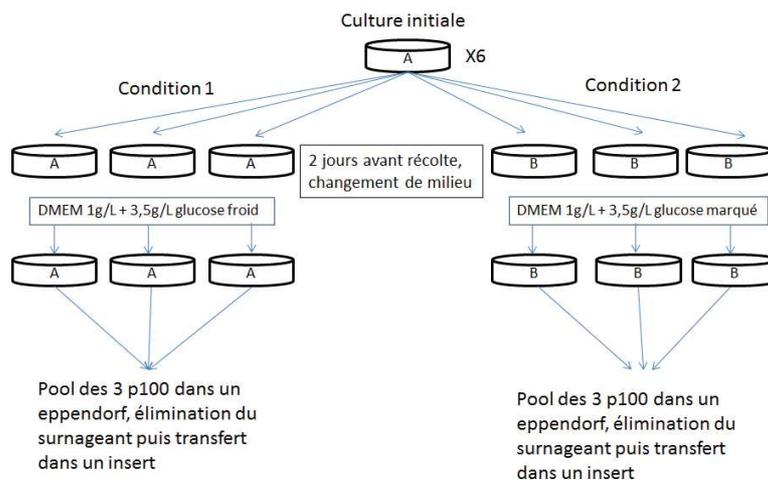
- Remettre en suspension le culot avec le même volume de PBS froid dans chaque tube Eppendorf pour ne pas engendrer de variations supplémentaires.
- Introduire l'ensemble (culot cellulaire + PBS) dans l'insert.
- Mettre le tube Eppendorf contenant l'insert dans le Dewar d'azote liquide.

### 3.6.2. Étude de faisabilité

La mise au point a été réalisée sur les lignées cellulaires HOS et U2OS, lignées commerciales d'ostéosarcome qui ont un temps de doublement court (20 heures) permettant de tester notre technique dans des conditions optimales avec un grand nombre de cellules ( $2 \cdot 10^7$ ) dans un bref délai.

Différents types de sondes moléculaires ont été testées ( $^{13}\text{C}_6$ -glucose ; Glucose froid ;  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine ; Glutamine froide).

*Design expérimental* : (Figure 46)



**Figure 46 : Protocole de réalisation de l'étude de faisabilité.**

Nous avons préparé 6 p100 (boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre) d'une lignée cellulaire. Nous avons changé le milieu DMEM 4,5g/L pour du milieu DMEM 1g/L puis nous avons ajouté 3,5g/L de glucose froid dans 3 boîtes et 3,5g /L de glucose marqué ( $^{13}\text{C}$ ) dans les 3 autres (pour les expériences avec la glutamine : nous avons ajouté 0,3 g/L de glutamine froide ou marqué). Deux jours plus tard après incubation, nous avons récupéré le surnageant d'une part et les cellules par dissociation chimique (trypsine) d'autre part.

Nous avons effectué un pool des 3 boîtes de la même condition, puis après centrifugation, nous avons transféré le culot sec dans un insert (1 insert par condition).

### 3.6.3. Étude de densité

Afin d'évaluer la sensibilité de la technique pour définir le nombre minimal de cellules nécessaires en vue d'un rapport signal à bruit satisfaisant, nous avons procédé à une **étude de densité** sur 2 concentrations :  $1 \cdot 10^6$  cellules et  $5 \cdot 10^6$  cellules (Figure 47).

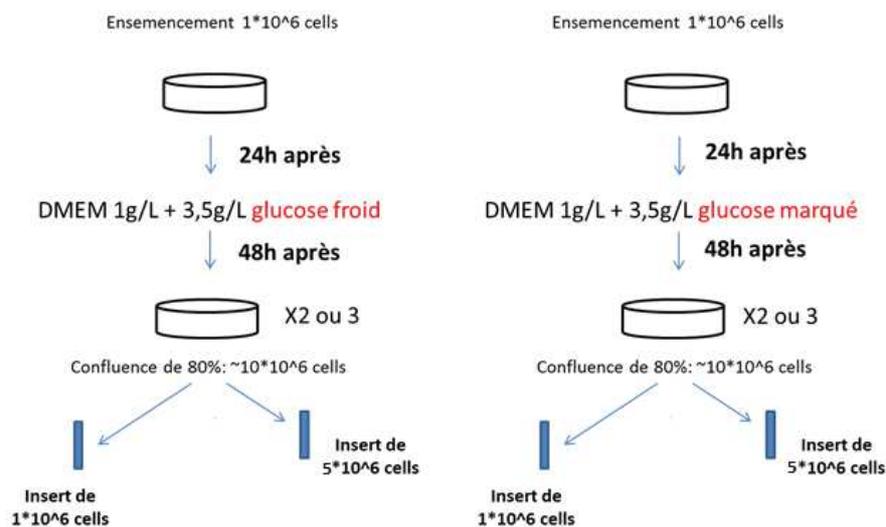


Figure 47 : Protocole de l'étude de densité.

Les acquisitions HSQC-1D ont été utilisées pour déterminer le seuil optimal de cellules à obtenir et à analyser dans l'insert en vue d'un rapport signal à bruit satisfaisant.

### 3.6.4. Étude cinétique

Une **étude de la cinétique** a permis d'étudier l'évolution du marquage afin d'évaluer la vitesse de captation et de transformation du glucose et de la glutamine en conditions de normoxie et d'hypoxie ( $O_2 = 1\%$ ).

Les cellules ont été ensemencées préalablement pour obtenir finalement dans chacune des flasques  $5 \cdot 10^6$  cellules afin d'obtenir un bon rapport signal à bruit.

L'analyse des données a été effectuée à  $t = 2h$ ,  $t = 4h$ ,  $t = 6h$ ,  $t = 24h$  et  $t = 48h$  pour les premières expériences et les secondes à  $t = 2h$ ,  $t = 6h$ ,  $t = 24h$  et  $t = 48h$ .

Les séquences HSQC-1D et les séquences 2D: HSQC-2D, HSQC-HR, HMBC ont été utilisées pour l'identification et la quantification. Les séquences CPMG et POCE ont été utilisées pour la quantification.

#### 3.6.4.1. Étude cinétique 1

Cette première expérience a été réalisée avec marquage par du  $^{13}\text{C}_6$ -glucose, en normoxie uniquement.

À J0, ensemencement de :

5 boîtes pour réaliser l'étude cinétique :

- 1 boîte p100 :  $1 \cdot 10^6$  cellules ; t = 48h
- 1 boîte p100 :  $2 \cdot 10^6$  cellules ; t = 24h
- 3 boîtes p100 :  $5 \cdot 10^6$  cellules ; t = 2h, 4h et 6h

2 boîtes pour conserver la lignée (amplification) :

- 1 boîte p100 :  $1 \cdot 10^5$  cellules
- 1 boîte p100 :  $2 \cdot 10^5$  cellules

Puis nous avons déterminé le volume nécessaire à introduire dans chacune des boîtes afin d'obtenir le nombre de cellules souhaitées, soit  $5 \cdot 10^6$  cellules.

À J1, changement du milieu des 5 boîtes : on remplace le milieu DMEM High Glucose 4,5 g/L par du milieu marqué au  $^{13}\text{C}$ -glucose (DMEM 1g/L+3,5g/L glucose marqué). Puis on ajoute 8 ml de milieu marqué pour les boîtes p100 t = 2h et 4h ; 9ml pour t = 6h et 24h ; 10 ml pour t = 48h. À chaque étape, on stoppe l'expérience et on met en insert.

On repasse et compte les cellules afin de mettre  $5 \cdot 10^6$  cellules dans chaque insert.

#### 3.6.4.2. Étude cinétique 2

Cette deuxième expérience a été réalisée avec marquage par du  $^{13}\text{C}_6$ -glucose et de la glutamine uniformément marquée ( $^{13}\text{C}_5$ -glutamine), en normoxie et en hypoxie.

*En normoxie :*

À J0, ensemencement de :

10 boîtes pour réaliser l'étude cinétique (glucose/glutamine) :

- 2 boîtes p100 :  $3 \cdot 10^4$  cellules /  $3 \cdot 10^4$  cellules ; t = 48h
- 2 boîtes p100 :  $3 \cdot 10^4$  cellules /  $3 \cdot 10^4$  cellules ; t = 24h
- 2 boîtes p100 :  $4 \cdot 10^4$  cellules /  $4 \cdot 10^4$  cellules ; t = 6h
- 2 boîtes p100 :  $4 \cdot 10^4$  cellules /  $4 \cdot 10^4$  cellules ; t = 2h
- 2 boîtes p100 :  $4 \cdot 10^4$  cellules /  $4 \cdot 10^4$  cellules ; contrôle (non marquées au  $^{13}\text{C}$ )

2 boîtes pour conserver la lignée (amplification) :

- 1 boîte p100 :  $2 \cdot 10^5$  cellules /  $2 \cdot 10^5$  cellules
- 1 boîte p100 :  $2 \cdot 10^5$  cellules /  $2 \cdot 10^5$  cellules

Puis nous avons déterminé le volume nécessaire à introduire dans chacune des p100 afin d'obtenir le nombre de cellules souhaitées, soit  $5 \cdot 10^6$  cellules.

À J1, changement du milieu des 4 boîtes : on remplace le milieu DMEM High Glucose 4,5 g/L par du milieu marqué au carbone 13 (DMEM 1g/L + 3,5g/L glucose marqué pour les analyses avec le  $^{13}\text{C}_6$ -glucose et avec DMEM 4,5g/L + 0,3 g/L de glutamine marquée pour les analyses avec la  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine). Puis on ajoute 8 ml de milieu marqué pour les boîtes p100 t = 2h ; 9ml pour t = 6h et 24h ; 10 ml pour t = 48h. À chaque étape, on stoppe l'expérience et on met en insert.

On repasse et compte les cellules afin de mettre  $5 \cdot 10^6$  cellules dans chaque insert.

*En hypoxie :*

À J0, ensemencement de :

10 boîtes pour réaliser l'étude cinétique (glucose/glutamine) :

- 2 boîtes p100 :  $4 \cdot 10^5$  cellules /  $3 \cdot 10^5$  cellules ; t = 48h
- 2 boîtes p100 :  $4 \cdot 10^5$  cellules /  $3 \cdot 10^5$  cellules ; t = 24h
- 2 boîtes p100 :  $5 \cdot 10^5$  cellules /  $4 \cdot 10^5$  cellules ; t = 6h
- 2 boîtes p100 :  $5 \cdot 10^5$  cellules /  $4 \cdot 10^5$  cellules ; t = 2h
- 2 boîtes p100 :  $5 \cdot 10^5$  cellules /  $4 \cdot 10^5$  cellules ; contrôle (non marquées au  $^{13}\text{C}$ )

2 boîtes pour conserver la lignée (amplification) :

- 1 boîte p100 :  $2 \cdot 10^5$  cellules /  $2 \cdot 10^5$  cellules
- 1 boîte p100 :  $2 \cdot 10^5$  cellules /  $2 \cdot 10^5$  cellules

Puis nous avons déterminé le volume nécessaire à introduire dans chacune des p100 afin d'obtenir le nombre de cellules souhaitées soit  $5 \cdot 10^6$  cellules.

À J1, changement du milieu des 4 boîtes: on remplace le milieu DMEM High Glucose 4,5 g/L par du milieu marqué au  $^{13}\text{C}$  (DMEM 1g/L + 3,5g/L glucose marqué pour les analyses avec le  $^{13}\text{C}_6$ -glucose et avec DMEM 4,5g/L + 0,3 g/L de glutamine marquée pour les analyses avec la  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine). Puis on ajoute 8 ml de milieu marqué pour les boîtes p100 t = 2h; 9ml pour t = 6h et 24h ; 10 ml pour t = 48h. À chaque temps t on stoppe l'expérience et on met en insert.

On repasse et compte les cellules afin de mettre  $5 \cdot 10^6$  cellules dans chaque insert.

À compter de l'étape d'introduction du milieu marqué l'incubateur (IncuCyte®, Essen BioScience, Thermo Scientific) est réglé en hypoxie à 5% puis à 1% 24 heures avant l'arrêt de l'expérience (mise en insert).

## **4. RÉSULTATS ET DISCUSSION**

#### **4.1. Étude de l'hétérogénéité métabolique des oligodendrogliomes : corrélation génomique, métabolomique et survie**

Cette étude a été publiée dans la revue *Metabolomics* (Annexe 1).

La population de patients atteints d'oligodendrogliomes que nous avons étudiée présentait une biologie divergente avec des pronostics différents indépendamment de la classification histologique. Nous avons cherché la relation entre le métabolisme tumoral, six aberrations génomiques (IDH1, TP53, codéletion 1p19q, méthylation du promoteur MGMT, PTEN, EGFR) et la survie des patients.

Nous avons appliqué la spectroscopie RMN HRMAS de  $^1\text{H}$  aux 72 oligodendrogliomes réséqués. 29 métabolites ont pu être quantifiés. L'algorithme ADEMA a été utilisé pour établir le lien entre les différentes mutations et les métabolites (Figure 48). L'analyse de survie a été réalisée par des courbes de Kaplan-Meier (Figure 49).

Dans un premier temps, nous avons montré l'impact des six mutations sur le métabolisme tumoral et la survie. La mutation IDH1, la codéletion 1p19q, la méthylation du promoteur MGMT, la mutation de TP53, toutes de bon pronostic, présentaient également des liens significatifs avec des groupes de métabolites avec un métabolisme tumoral spécifique : diminution de l'effet Warburg, du métabolisme sérine-glycine, du métabolisme monocarboné, de la glycolyse et de l'activité du cycle TCA et augmentation de l'activité de la GPC.

Les mutations PTEN et EGFR, de mauvais pronostic, présentaient un métabolisme tumoral totalement opposé : augmentation de l'effet Warburg, du métabolisme sérine-glycine, du métabolisme monocarboné, de la glycolyse, de l'activité du cycle TCA, du stress oxydatif et agmentation de l'activité de la PC.



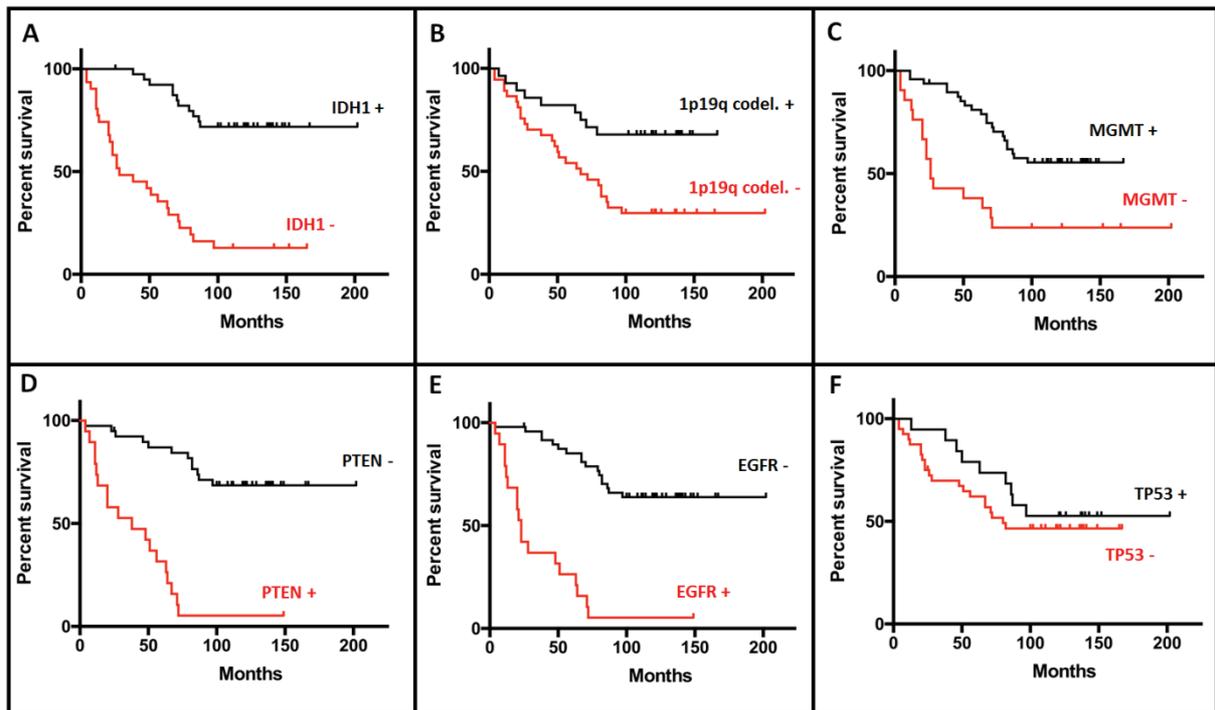


Figure 49 : Comparaison des taux de survie entre des groupes de patients avec différents statuts de marqueurs génomiques (A) IDH1, B) 1p19q, C) MGMT, D) PTEN, E) EGFR, F) TP53) mesurés dans les tissus tumoraux. La survie en présence de la mutation est représentée par des lignes noires pour les aberrations génomiques associées à un bon pronostic et par des lignes rouges pour les aberrations génomiques associées à un mauvais pronostic.

Dans un second temps, nous avons étudié les corrélations du métabolisme tumoral initial avec la survie ont été étudiées. Nous avons retrouvé un lien significatif entre la concentration de 8 métabolites et la survie (Figure 50) : on retrouve le 2-HG, témoin de la mutation IDH1 ; la sérine et la glycine, précurseurs du métabolisme monocarboné ; le rapport GPC/PC, reflet du métabolisme membranaire ; ainsi que le glutamate du cycle TCA ; l'alanine liée à la glycolyse ; le NAA reflet de l'infiltration tumorale et le myo-inositol. Pour chaque métabolite nous avons pu identifier un seuil de concentration discriminant.

La spectroscopie RMN HRMAS a donc permis de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs de survie, pour certains plus étroitement corrélés à la survie que la présence ou l'absence de certaines mutations, fournissant ainsi une information plus précise et rapide pour une utilisation en peropératoire. Le rapport GPC/PC est par exemple plus étroitement lié à la survie que la présence de 1p19q, MGMT ou TP53 avec un risque relatif de décès diminué.

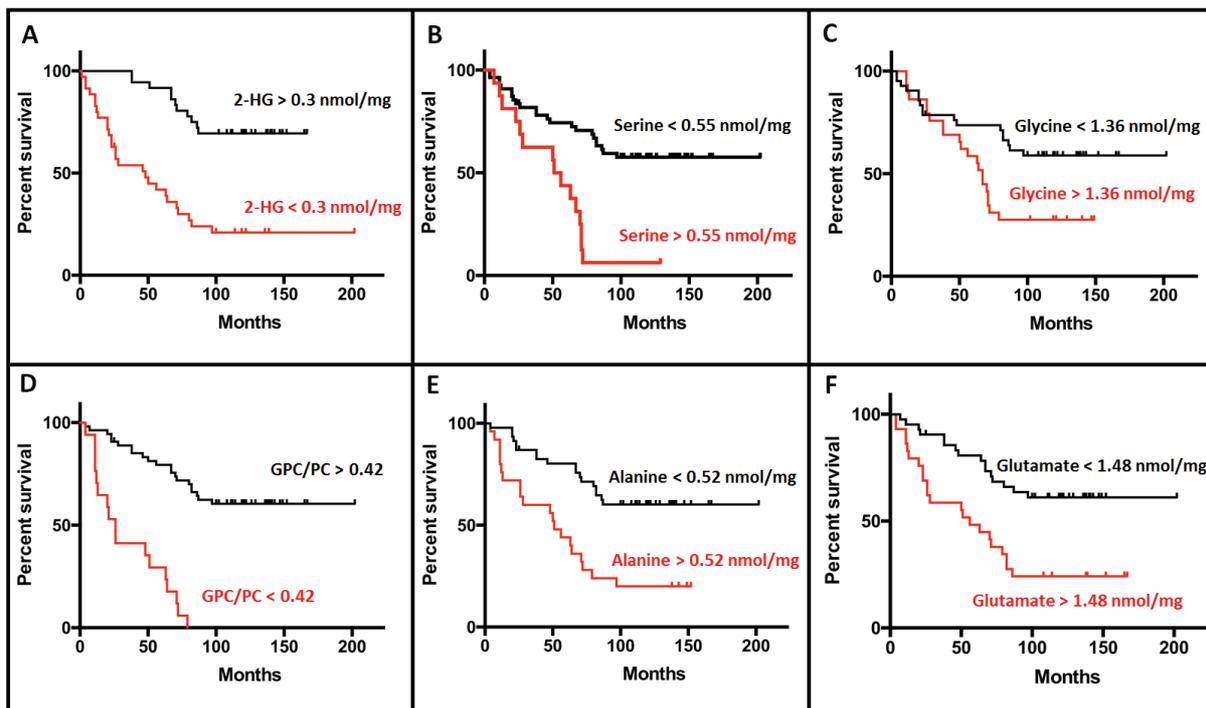


Figure 50 : Comparaison des taux de survie entre des groupes de patients présentant différents niveaux d'accumulation de six métabolites (A) 2HG, B) Sérine, C) Glycine, D) GPC/PC, E) Alanine, F) Glutamate) mesurés dans les tissus tumoraux.

La spectroscopie RMN HRMAS fournit des informations précises sur la métabolomique des oligodendrogliomes et permet de trouver de nouveaux biomarqueurs indiquant la survie. Elle permet une caractérisation rapide des tissus intacts et peut être utilisée en peropératoire.

#### 4.2. Hétérogénéité métabolique des gliomes : relation entre le profil métabolique et l'imagerie fonctionnelle par TEP au $^{18}\text{F}$ -FDG

Cette étude a été publiée dans la revue *Clinical Nuclear Medicine* (Annexe 2).

Comme dans de nombreux autres cancers, une captation élevée du FDG est corrélée au degré de malignité des gliomes. Cependant, dans la pratique clinique, il n'est pas rare d'observer des gliomes de haut grade à faible captation de FDG. Nos observations, ainsi que de rares travaux issus de la littérature, ont révélé deux patterns de captation différents en imagerie du  $^{18}\text{F}$ -FDG en TEP : des gliomes de haut grade présentant une hypercaptation intense comme la plupart des cancers malins, et des gliomes de haut grade présentant une faible captation du glucose.



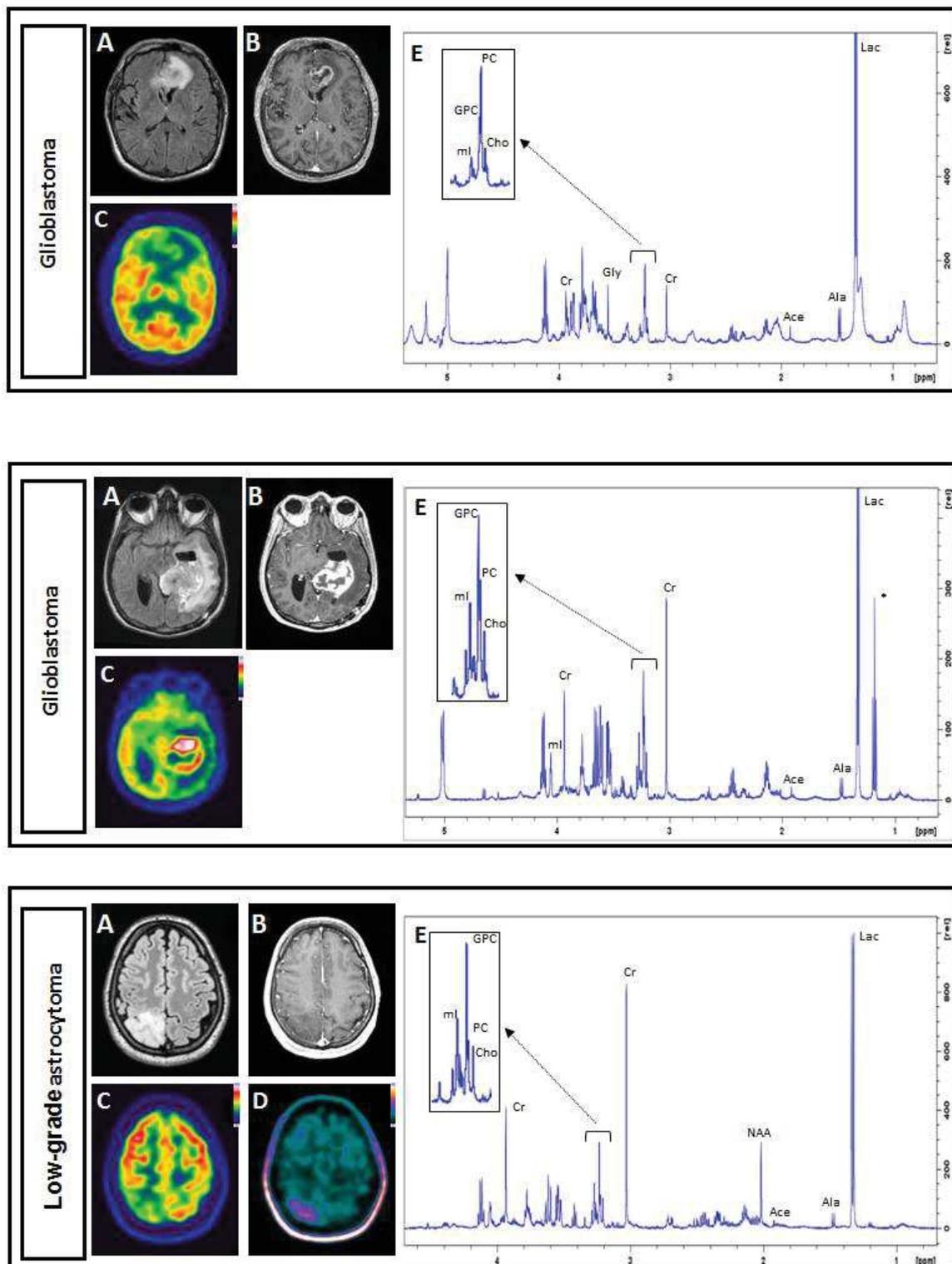


Figure 52 : Trois cas représentatifs d'astrocytomes : deux patterns métaboliques différents de glioblastomes (le premier avec une faible captation de FDG et le second avec une forte captation de FDG) par rapport à un astrocytome de bas grade (3ème cas). Pour chacun d'eux : coupes transversales IRM FLAIR (A) et après injection de gadolinium (B), TEP au FDG (C), TEP à la FDOPA (D) et RMN HRMAS (E). Les spectres RMN HRMAS montrent un rapport GPC/PC clairement inversé, une augmentation de la glycine (Gly), une diminution des taux de créatine (Cr) et de myoinositol (ml) dans le glioblastome avec une faible captation du FDG (premier cas). Les niveaux d'acétate (Ace), d'alanine (Ala), de lactate (Lac) et de choline (Cho) restent similaires. L'astérisque (\*) indique une contamination à l'éthanol.

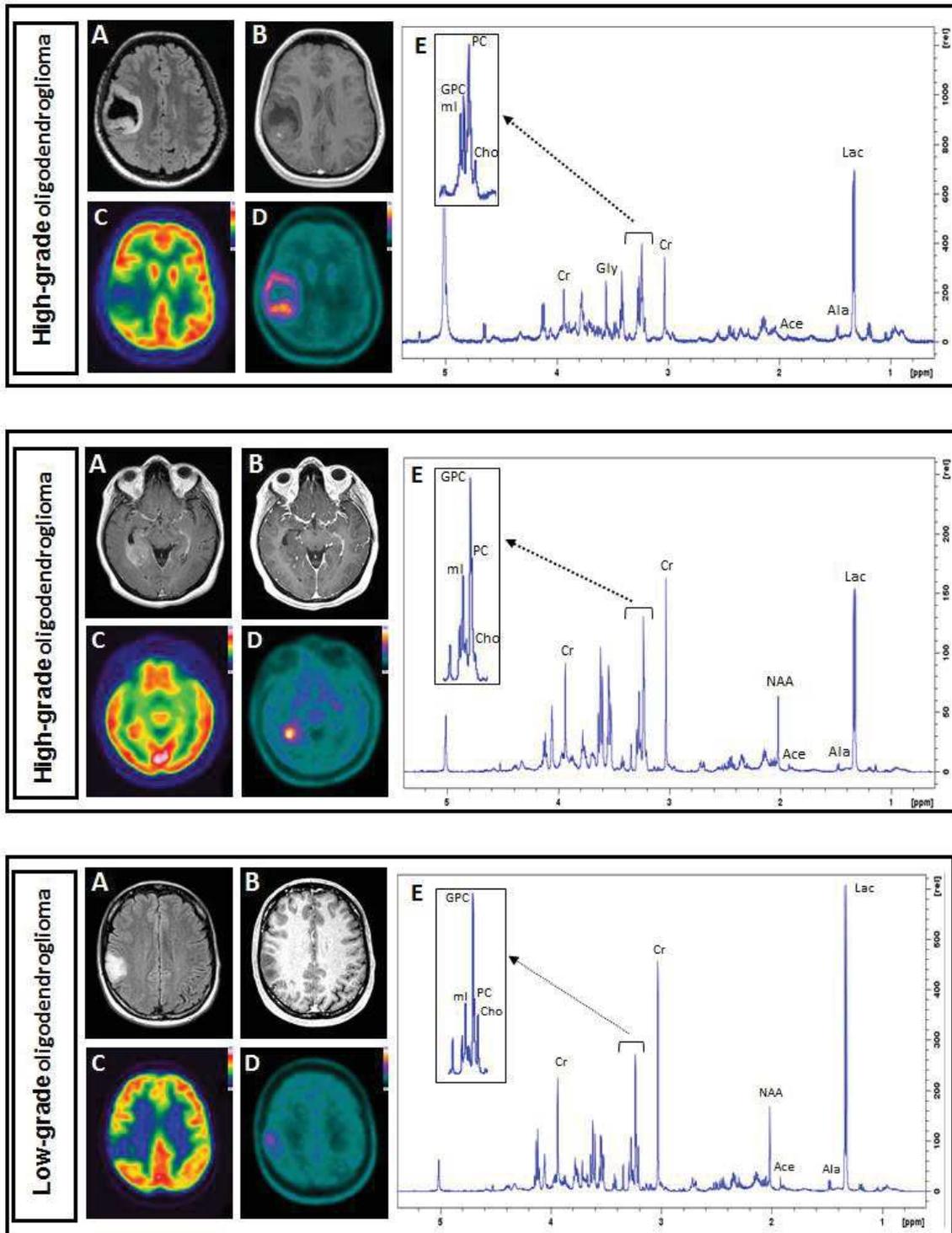


Figure 53 : Trois cas représentatifs d'oligodendrogliomes : deux patterns métaboliques différents d'oligodendrogliomes de haut grade (le premier avec une faible captation de FDG et le second avec une forte captation de FDG) par rapport aux oligodendrogliomes de bas grade (3ème cas). Pour chacun d'eux : coupes transversales IRM FLAIR (A) et après injection de gadolinium (B), TEP au FDG (C), TEP à la FDOPA (D) et les résultats de la RMN HRMAS (E). Les spectres RMN HRMAS montrent, comme dans les cas de glioblastome, un rapport GPC/PC inversé, une augmentation des niveaux de glycine (Gly) et une diminution des niveaux de créatine (Cr) dans les oligodendrogliomes de haut grade à faible captation du FDG (premier cas). Les taux d'acétate (Ace), d'alanine (Ala), de lactate (Lac), de myoinositol (ml) et de choline (Cho) demeurent similaires.

### **4.3. Utilisation de sondes moléculaires pour l'analyse des voies énergétiques (<sup>13</sup>C-glucose, <sup>13</sup>C-glutamine)**

#### **4.3.1. Mise au point sur des solutions de métabolites purs**

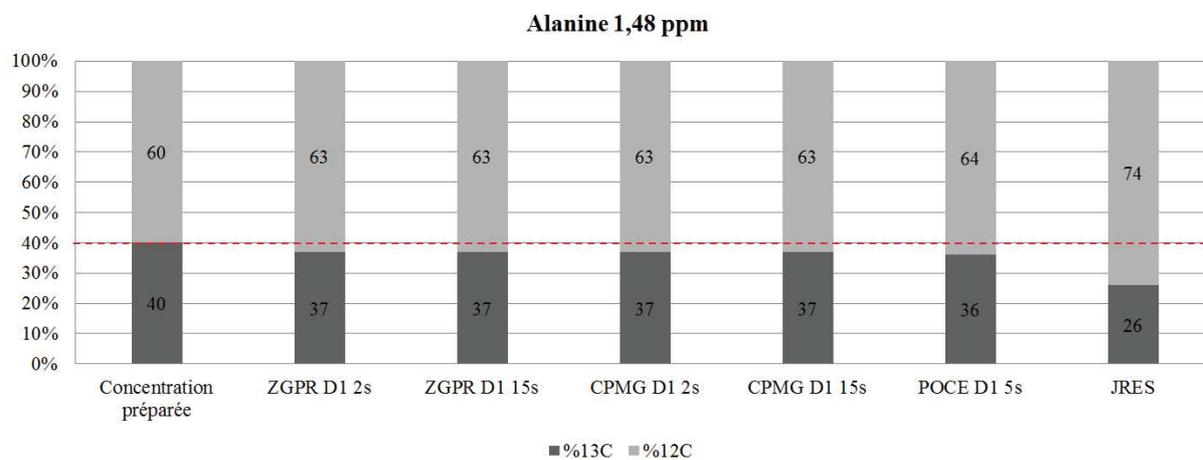
Afin de valider une méthode de quantification des métabolites marqués au <sup>13</sup>C :

1. Nous avons utilisé plusieurs solutions et mélange de solutions de métabolites purs en variant les rapports de concentrations de <sup>13</sup>C / <sup>12</sup>C ;
2. Nous avons réalisé l'acquisition de spectres RMN de ces solutions avec plusieurs séquences (ZGPR, CPMG, POCE et JRES), en testant différents paramètres d'acquisition.
3. Nous avons comparé les résultats de quantifications obtenues à partir de différents groupements de la même molécule.

On présente ici quelques résultats des quantifications relatives obtenus par les différentes séquences effectuées. Ces résultats sont donnés pour les différents métabolites purs étudiés et pour les mélanges de métabolites. On indiquera à chaque fois entre parenthèses la concentration de métabolite préparée.

Alanine (40/60) : l'alanine présente 2 groupements détectés en RMN du  $^1\text{H}$  à 1,48 ppm (- $\text{CH}_3$ ) et à 3,78 ppm (- $\text{CH}$ -) (Figure 54).

A)



B)

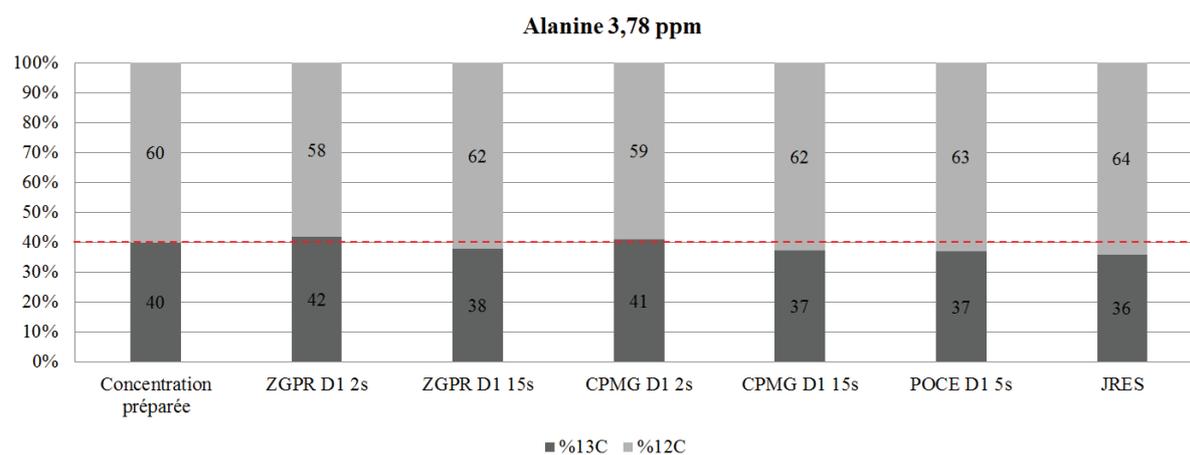


Figure 54 : Pourcentage de  $^{13}\text{C}$  et de  $^{12}\text{C}$  estimé pour les différentes séquences réalisées pour l'alanine A) à 1,48 ppm et B) à 3,78 ppm.

Glycine (50/50) : la glycine présente un groupement détecté en RMN du  $^1\text{H}$  à 3,55 ppm (- $\text{CH}_2$ -) (Figure 55).

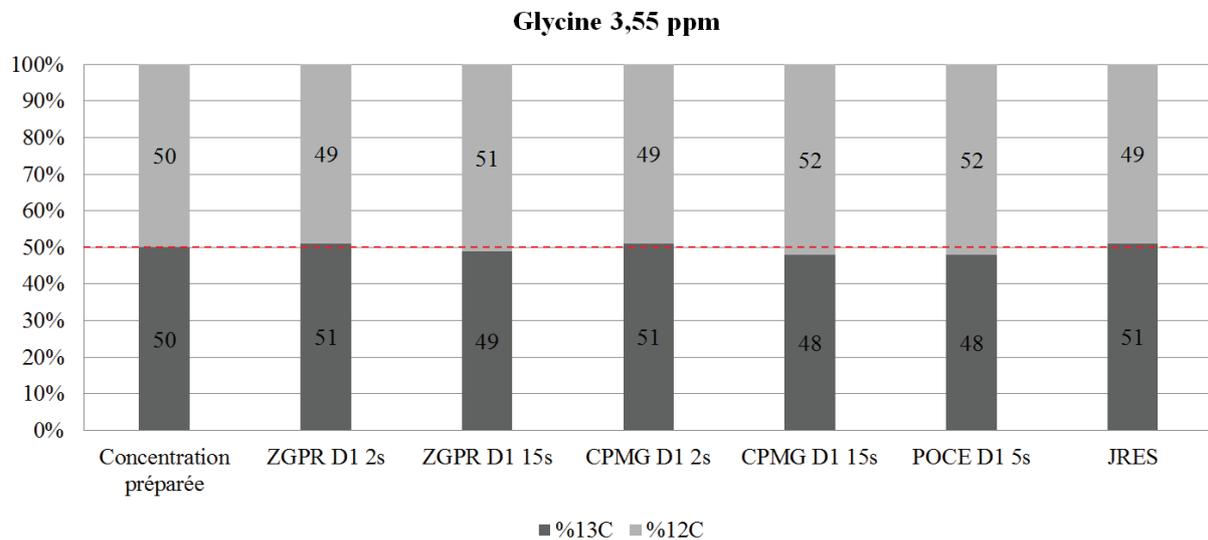


Figure 55 : Pourcentage de  $^{13}\text{C}$  et de  $^{12}\text{C}$  estimé pour les différentes séquences réalisées pour la glycine à 3,55 ppm.

Acétate (60/40) : l'acétate présente un groupement détecté en RMN du  $^1\text{H}$  à 1,92 ppm (- $\text{CH}_3$ ) (Figure 56).

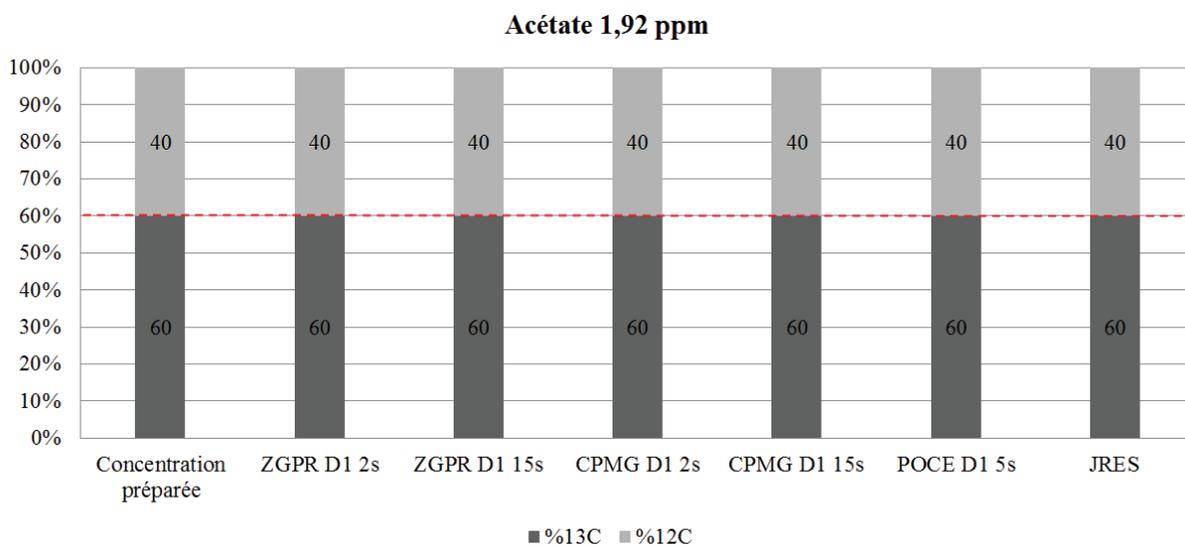
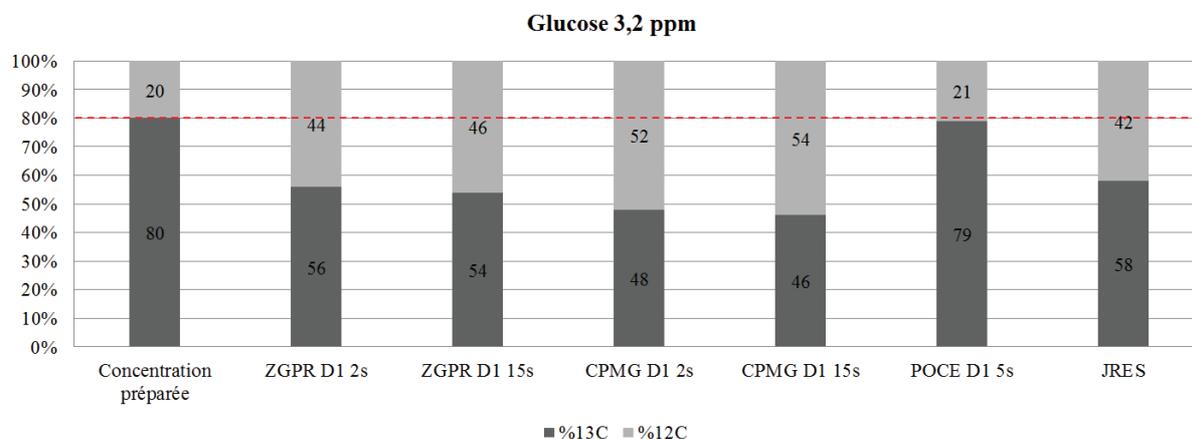


Figure 56 : Pourcentage de  $^{13}\text{C}$  et de  $^{12}\text{C}$  estimé pour les différentes séquences réalisées pour l'acétate à 1,92 ppm.

Glucose (80/20) : le glucose présente plusieurs groupements dont 2 facilement détectés à 3,2 ppm et à 4,6 ppm en raison de l'absence de recouvrement (Figure 57).

A)



B)

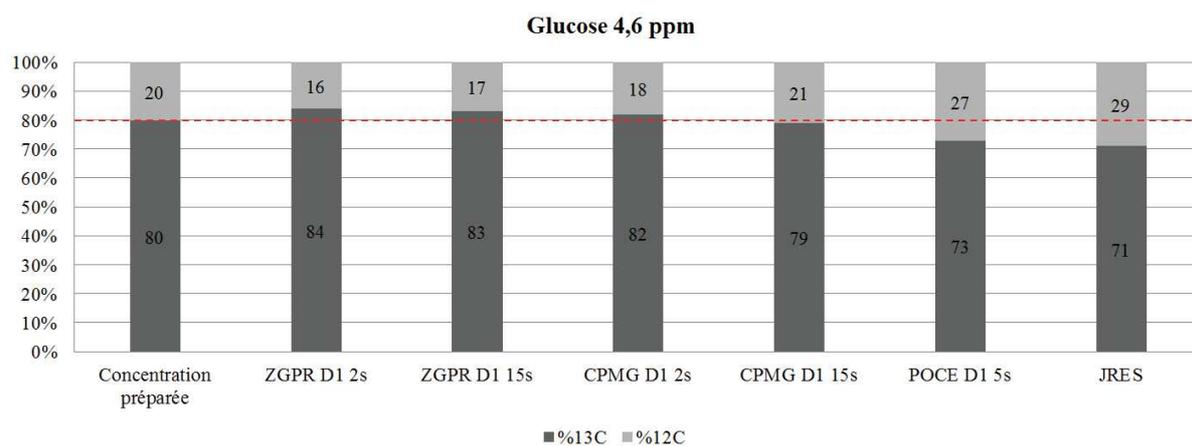
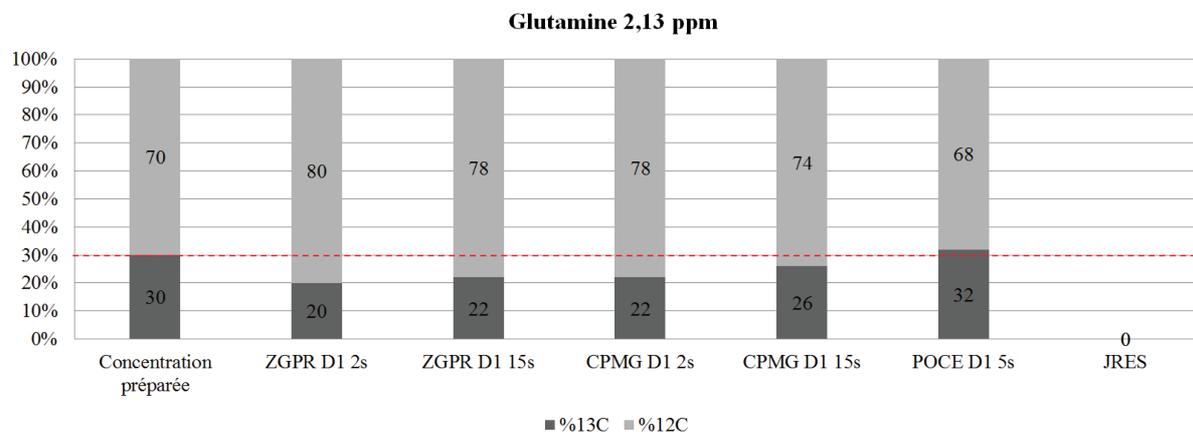


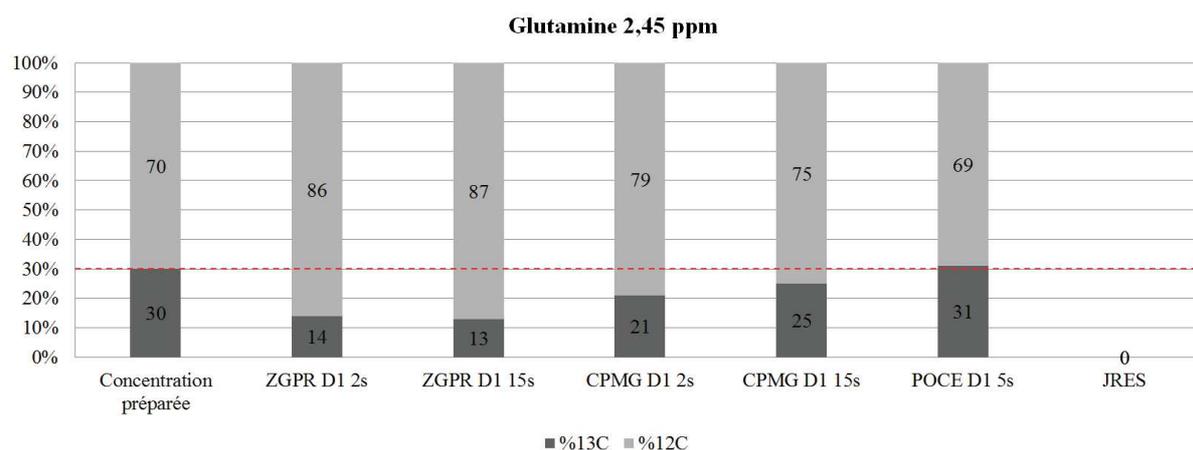
Figure 57 : Pourcentage de <sup>13</sup>C et de <sup>12</sup>C estimé pour les différentes séquences réalisées pour le glucose A) à 3,2 ppm et B) à 4,6 ppm.

Glutamine (30/70) : la glutamine présente 3 groupements à 2,13 ppm ( $-\text{CH}_2-$ ), à 2,45 ppm ( $-\text{CH}_2-$  lié au  $-\text{CO}-$ ) et à 3,78 ppm ( $-\text{CH}-$  lié au  $-\text{NH}_2$ ) (Figure 58).

A)



B)



C)

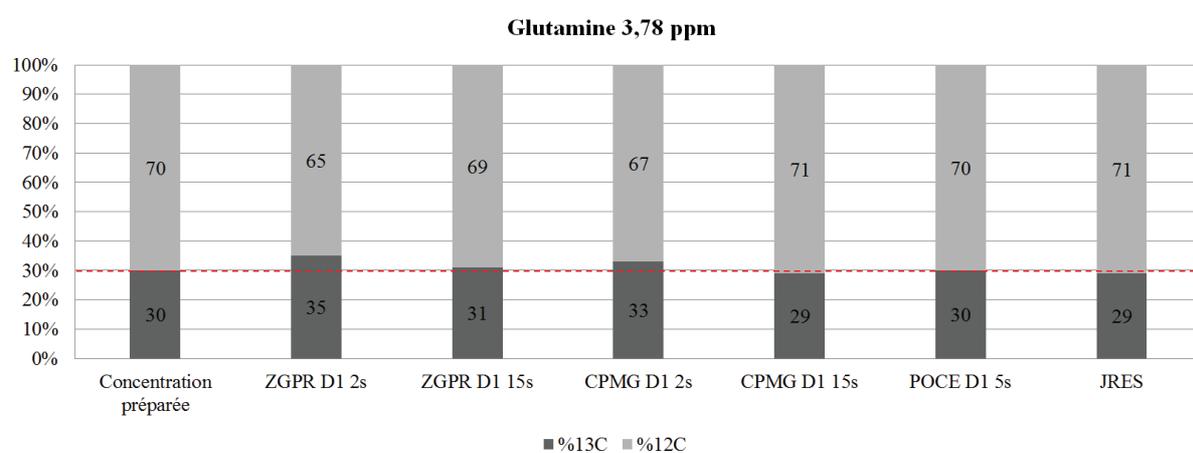
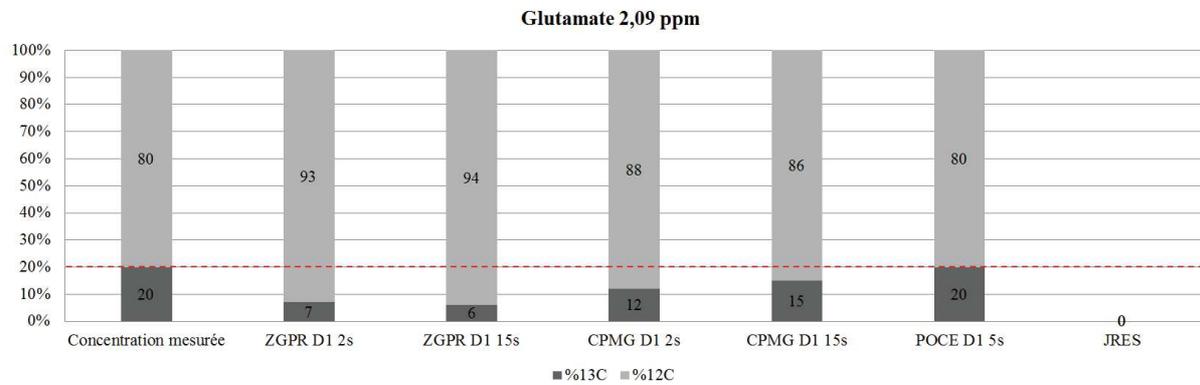


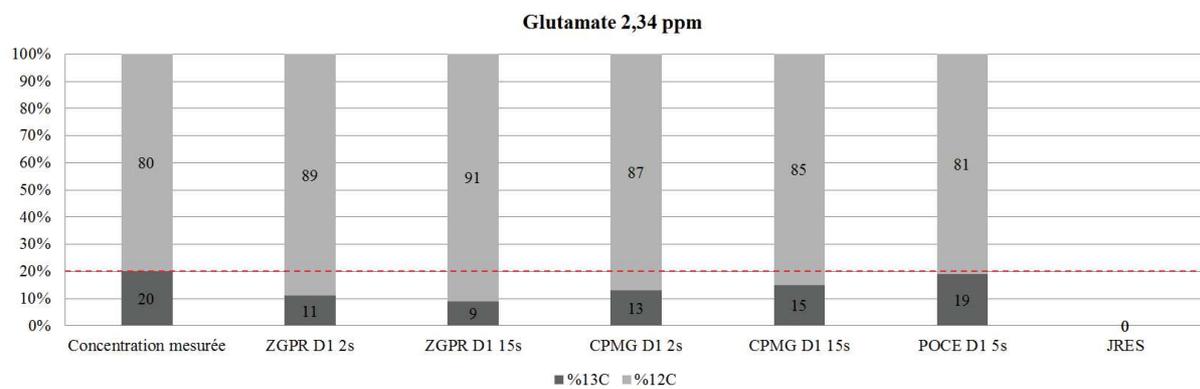
Figure 58 : Pourcentage de <sup>13</sup>C et de <sup>12</sup>C estimé pour les différentes séquences réalisées pour la glutamine A) à 2,13 ppm, B) à 2,45 ppm et C) à 3,78 ppm.

Glutamate (20/80) : le glutamate présente 3 pics en RMN du  $^1\text{H}$  à 2,09 ppm ( $-\text{CH}_2-$ ), à 2,34 ppm ( $-\text{CH}_2-$  lié au CO) et à 3,76 ppm ( $-\text{CH}-$  lié au  $-\text{NH}_2$ ) (Figure 59).

A)



B)



C)

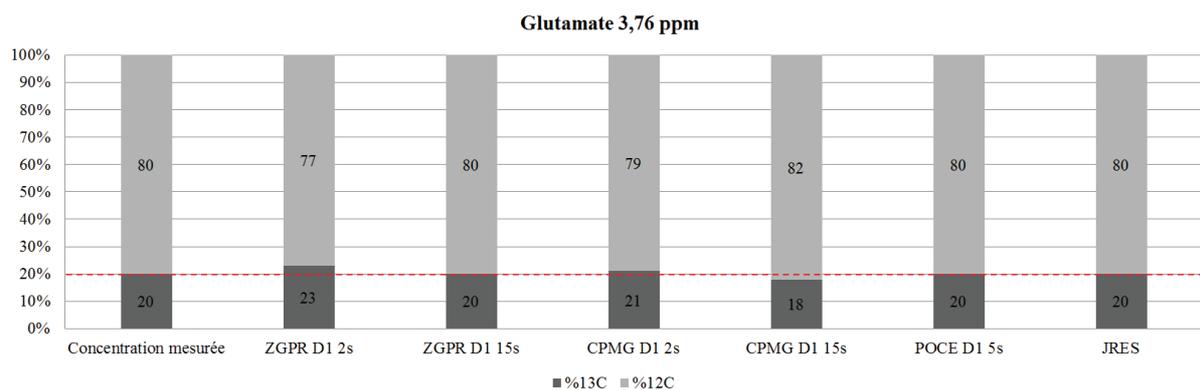


Figure 59 : Pourcentage de  $^{13}\text{C}$  et de  $^{12}\text{C}$  estimé pour les différentes séquences réalisées pour le glutamate A) à 2,09 ppm, B) à 2,34 ppm et C) à 3,76 ppm.

Aspartate (40/60) : l'aspartate présente 3 groupements à 2,68 ppm (-CH<sub>2</sub>-(u)), à 2,81 ppm (-CH<sub>2</sub>-(d)) et à 3,89 ppm (-CH- lié au -NH<sub>2</sub>). C'est le groupement à 3,89 ppm qui a été quantifié (Figure 60).

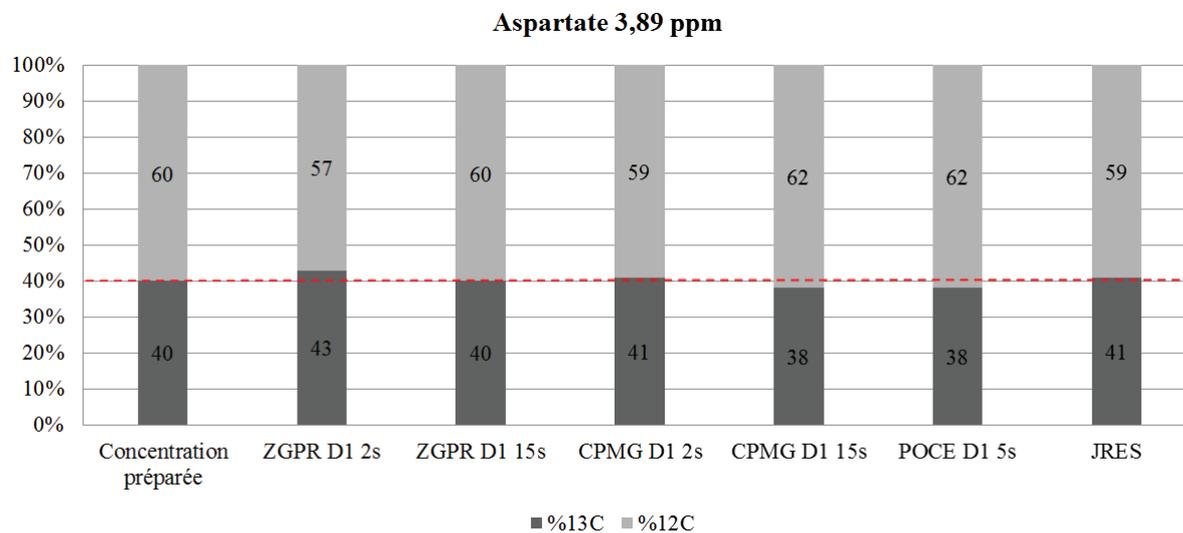
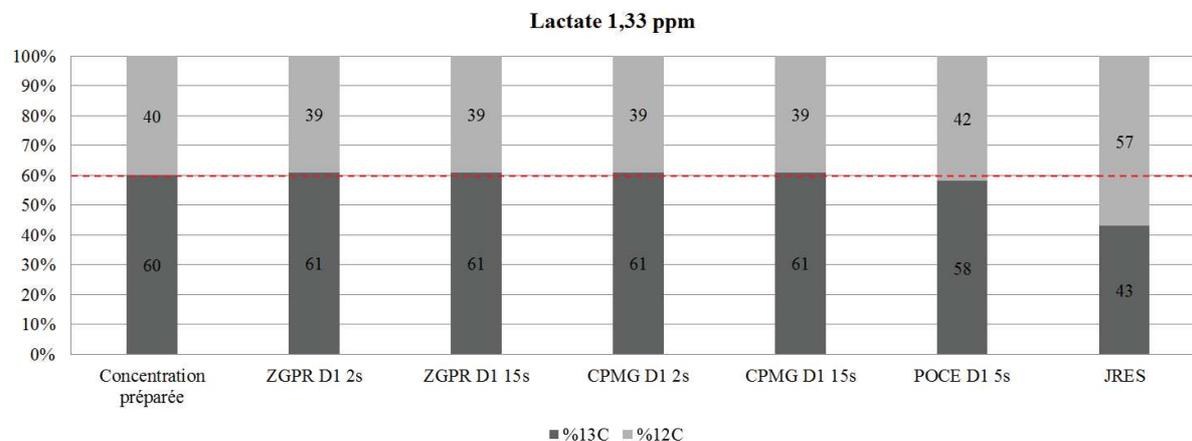


Figure 60 : Pourcentage de <sup>13</sup>C et de <sup>12</sup>C estimé pour les différentes séquences réalisées pour l'aspartate à 3,89 ppm.

Lactate (60/40) : le lactate présente 2 groupements à 1,33 ppm (-CH<sub>3</sub>) et à 4,12 ppm (-CH-) (Figure 61).

A)



B)

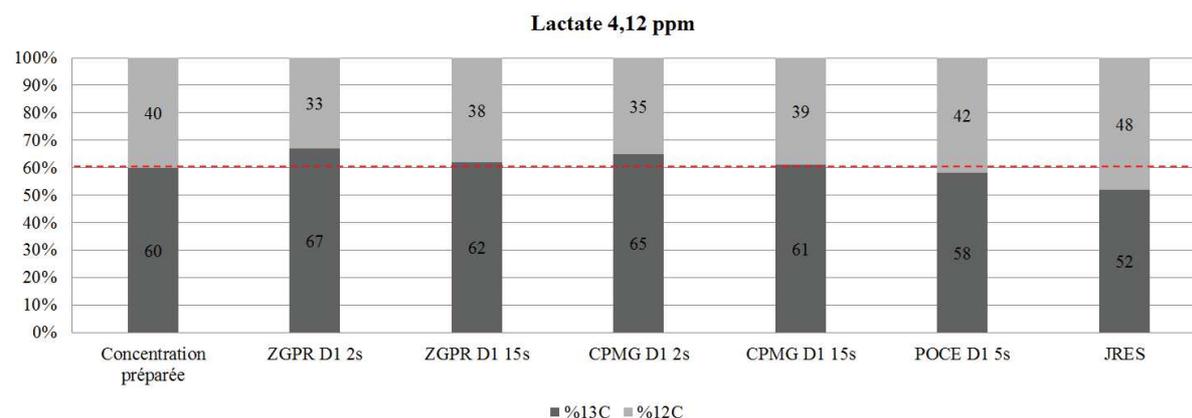


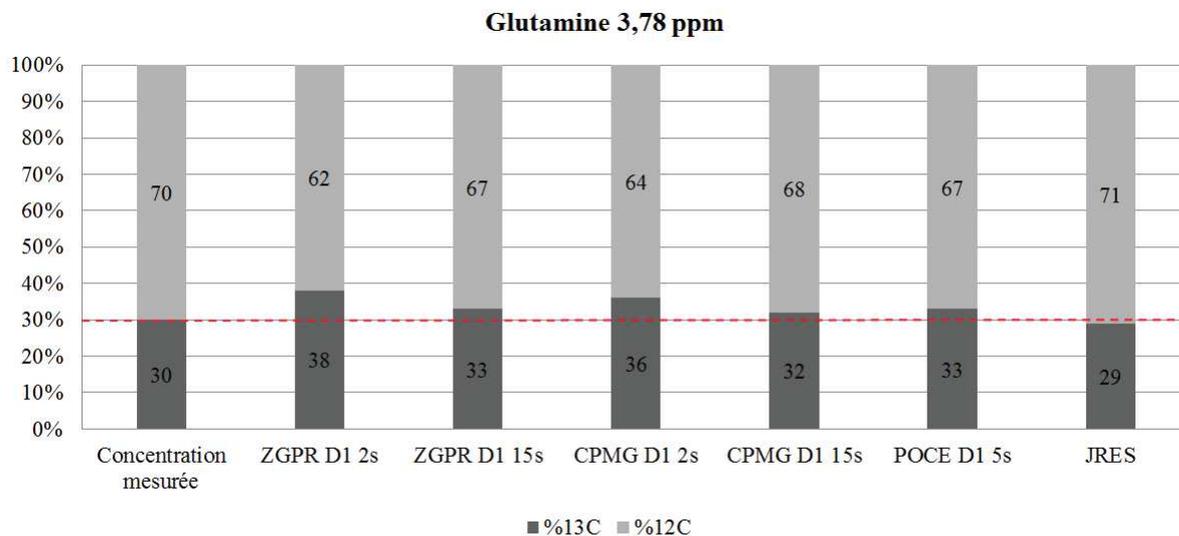
Figure 61 : Pourcentage de <sup>13</sup>C et de <sup>12</sup>C estimé pour les différentes séquences réalisées pour le lactate A) à 1,33 ppm et B) à 4,12 ppm.

Parmi toutes les séquences utilisées, seule la séquence POCE donne un rapport (<sup>13</sup>C/<sup>13</sup>C+<sup>12</sup>C) fiable et reproductible. Elle nous permet de nous affranchir des *overlaps* observés sur les autres séquences. Sur la J-RES, les couplages forts empêchent la quantification de certains groupements de métabolites.

Nous avons choisi des mélanges de métabolites (glutamine/glycine et glutamine/glutamate) présentant des groupements avec des déplacements chimiques proches afin de vérifier la fiabilité des mesures.

Mélange glutamine/glycine : comparaison des groupements à 3,78 ppm (glutamine) et à 3,55 ppm (glycine) (Figure 62).

A)



B)

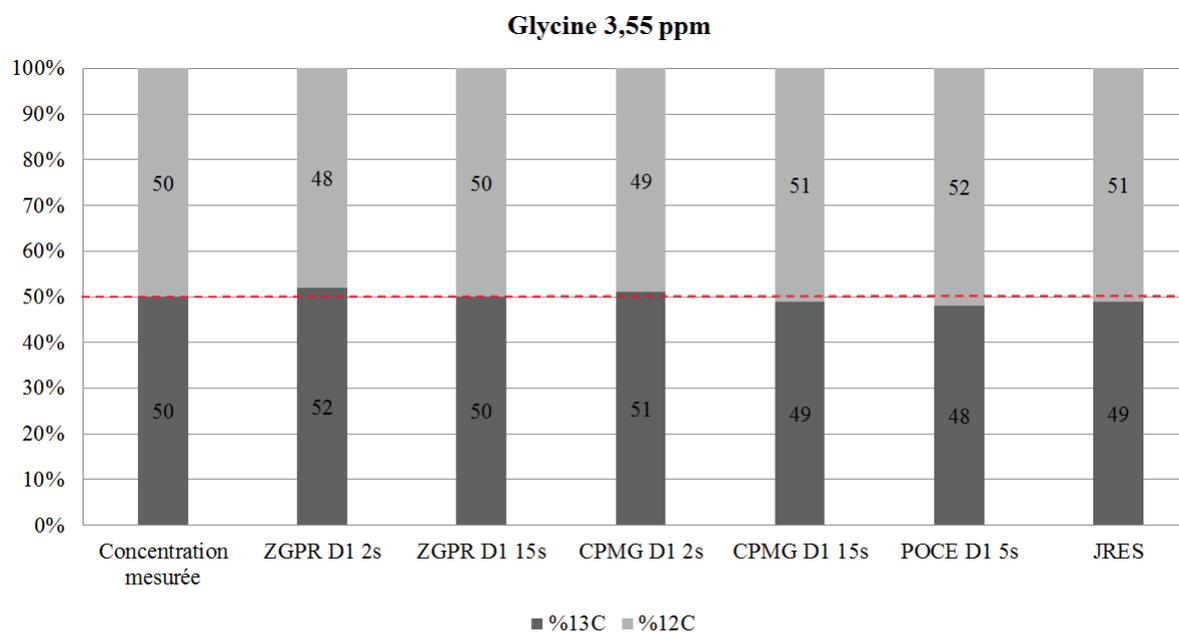
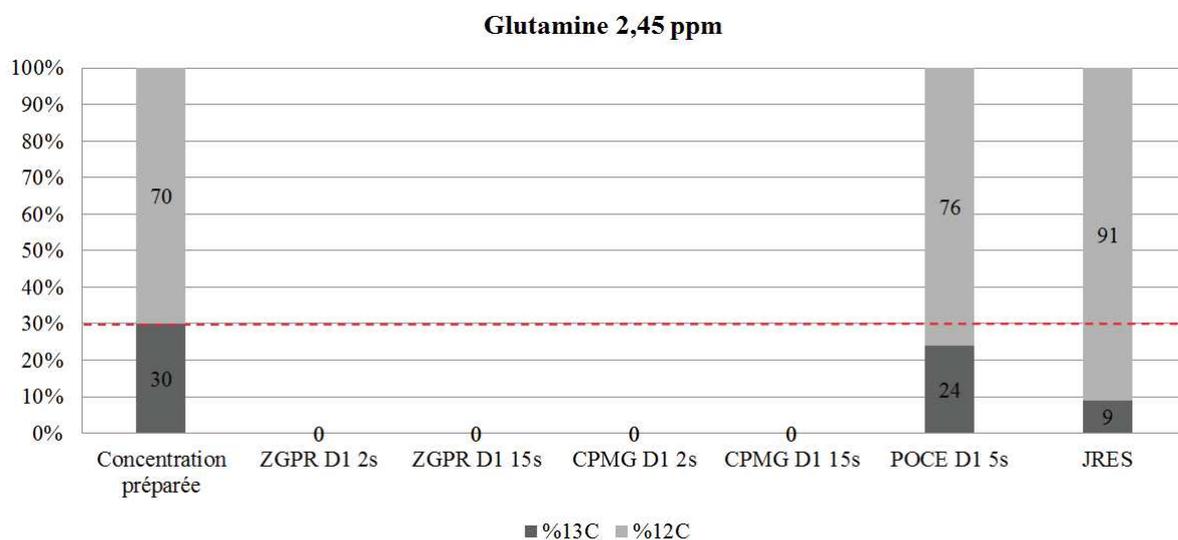


Figure 62 : Pourcentage de <sup>13</sup>C et de <sup>12</sup>C estimé pour les différentes séquences réalisées pour le mélange glutamine/glycine.

Mélange glutamine/glutamate : comparaison des groupements à 2,45 ppm (glutamine) et à 2,34 ppm (glutamate) (Figure 63).

A)



B)

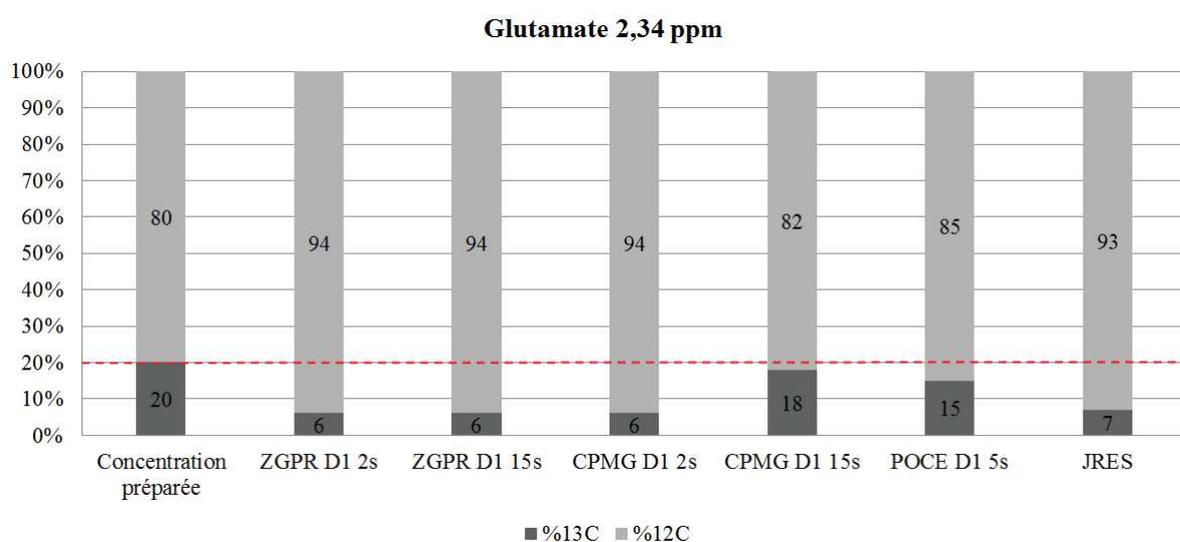


Figure 63 : Pourcentage de <sup>13</sup>C et de <sup>12</sup>C estimé pour les différentes séquences réalisées pour le mélange glutamine/glutamate.

Dans le mélange glutamine/glutamate, les séquences ZGPR et CPMG n'ont pu conduire à des quantifications compte tenu d'un recouvrement entre les satellites de la glutamine et le pic central du glutamate.

Nous constatons que, même pour des métabolites avec des déplacements chimiques proches, la quantification par la séquence POCE est fiable. Nous avons ensuite utilisé cette séquence pour analyser des échantillons de cultures cellulaires et de xéno greffes de souris.

### 4.3.2. Mise au point sur des cultures cellulaires

Nous avons testé les 2 voies énergétiques principales utilisées par les cellules,  $^{13}\text{C}_6$ -glucose et du  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine, dans les conditions de normoxie et d'hypoxie.

#### 4.3.2.1. Étude de faisabilité

L'étude de faisabilité a été réalisée avec  $2 \cdot 10^7$  cellules par insert. Les acquisitions HSQC-1D réalisées pour le  $^{13}\text{C}_6$ -glucose, le glucose froid, la  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine et la glutamine froide montrent la détection des  $^1\text{H}$  liés au  $^{13}\text{C}$  (Figure 64).

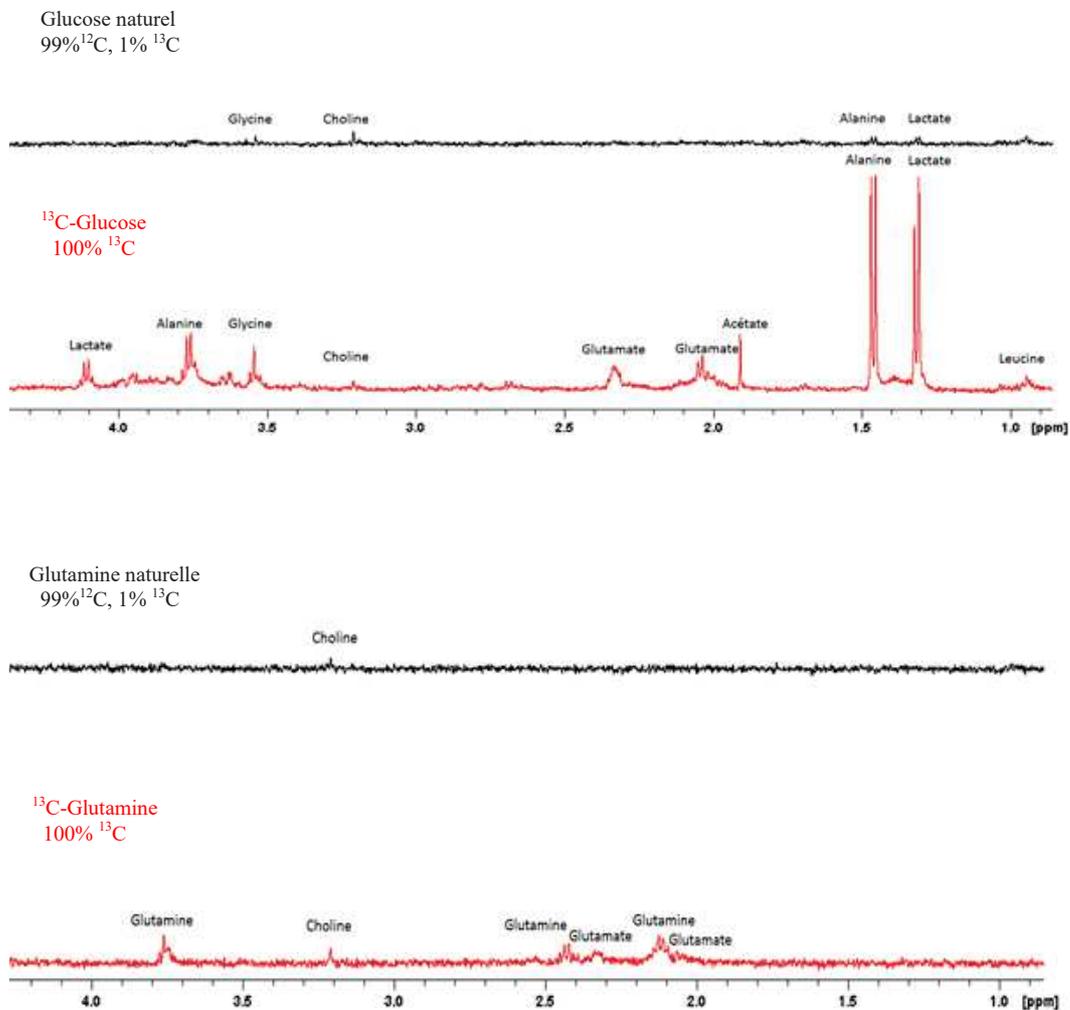


Figure 64 : Séquences HSQC-1D pour le glucose froid *versus* glucose marqué au  $^{13}\text{C}$  et pour la glutamine froide *versus* glutamine marquée au  $^{13}\text{C}$ .

Comparativement à la séquence HSQC-1D, la séquence HSQC-HR permet d'identifier l'exhaustivité des métabolites (Figure 65).

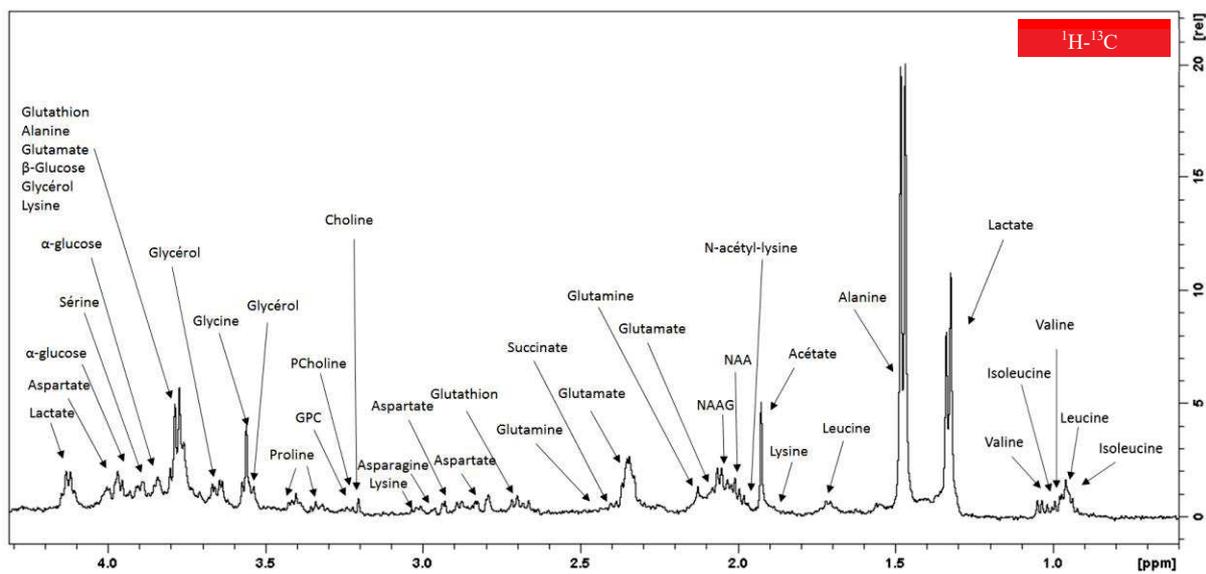


Figure 65 : Identification sur la séquence HSQC-1D avec du  $^{13}\text{C}_6$ -glucose. On visualise les  $^1\text{H}$  portés par les  $^{13}\text{C}$ .

À partir des séquences HSQC-HR, HMBC-HR et la POCE, nous avons pu également identifier les carbones marqués à l'intérieur de la molécule (Tableau 9).

Métabolites	Contrôle	<sup>13</sup> C6
Acétate		
Alanine		
Aspartate	Non visible	
Choline		
Glutamate		
Glutamine		
Glycérol	Non visible	
Glycérophosphocholine		
Phosphocholine		
Glycine		
Isoleucine		
Valine		
Leucine		
Lactate		
NAA	Non visible	
NAAG		
Sérine		
Thrénine		
Uracile	Non visible	
Methionine		
β-Glucose	Non visible	
α-Glucose	Non visible	
Asparagine		
Dopamine		
Proline		
Lysine		
N-acétyl-Lysine		
Succinate	Non visible	
Glutathion		

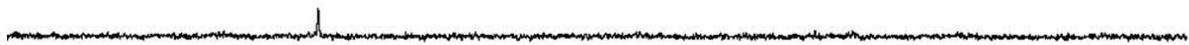
**Tableau 9 : Listing des métabolites incorporant le <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose. Les cercles noirs représentent les <sup>12</sup>C de la molécule, les cercles rouges représentent les <sup>13</sup>C d'abondance naturelle et les cercles rouges remplis représentent les <sup>13</sup>C du <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose.**

#### 4.3.2.2. Étude de densité

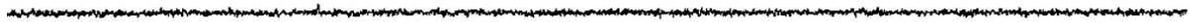
Afin d'optimiser nos expériences futures, nous avons voulu déterminer le seuil minimum de cellules nécessaires pour la détection du signal RMN avec notre système. Après avoir utilisé une densité de  $2 \cdot 10^7$  cellules par insert dans l'étude de faisabilité, nous avons testé deux autres densités :  $5 \cdot 10^6$  et  $1 \cdot 10^6$  cellules par insert (Figure 66).

A)

Densité :  $5 \cdot 10^6$  cellules



Densité :  $1 \cdot 10^6$  cellules



B)

Densité :  $5 \cdot 10^6$  cellules



Densité :  $1 \cdot 10^6$  cellules



Figure 66 : Glucose froid avec  $5 \cdot 10^6$  cellules et  $1 \cdot 10^6$  cellules A) et glucose marqué au  $^{13}\text{C}$  avec  $5 \cdot 10^6$  cellules et  $1 \cdot 10^6$  cellules B).

On constate qu'une densité cellulaire à  $5 \cdot 10^6$  cellules par insert est le seuil minimum pour notre système afin d'obtenir un bon rapport signal/bruit.

#### 4.3.2.3. Études cinétiques

##### Étude cinétique 1 :

Contrôle qualité (comptage et viabilité cellulaire) : (Tableau 10)

Temps de prélèvement	T=2h	T=4h	T=6h	T=24h	T=48h
Comptage cellulaire moyen (Nb de cellules/mL)*10 <sup>6</sup>	2.7	2.0	2.7	2.8	2.0
Viabilité moyenne (%)	98	95	97	95	98
Nombre de cellules finales dans l'insert	5*10 <sup>6</sup>				
Nombre d'échantillons pour chaque condition	1	1	1	1	1

Tableau 10 : Caractéristiques de l'échantillon utilisé pour l'étude cinétique 1.

##### Résultats de l'étude cinétique 1 :

La première étude nous a permis d'observer l'évolution de l'incorporation, à différents temps, des métabolites marqués au <sup>13</sup>C dans les cellules et également de suivre l'évolution de la consommation de nutriments et du largage des métabolites dans le milieu (Figure 67 et Figure 68).

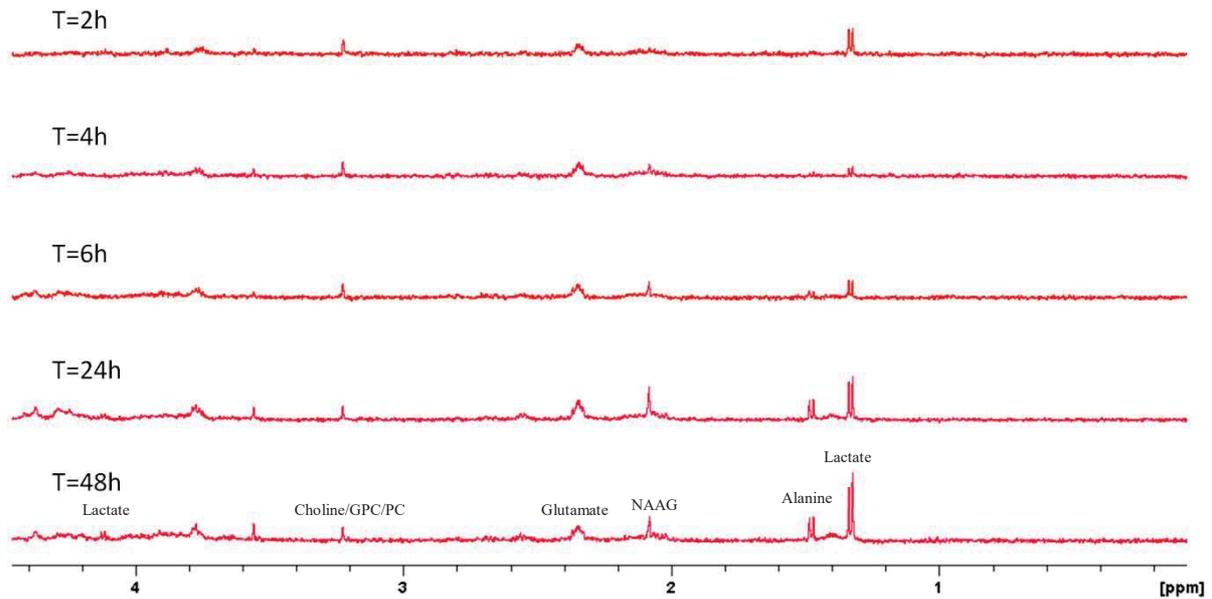
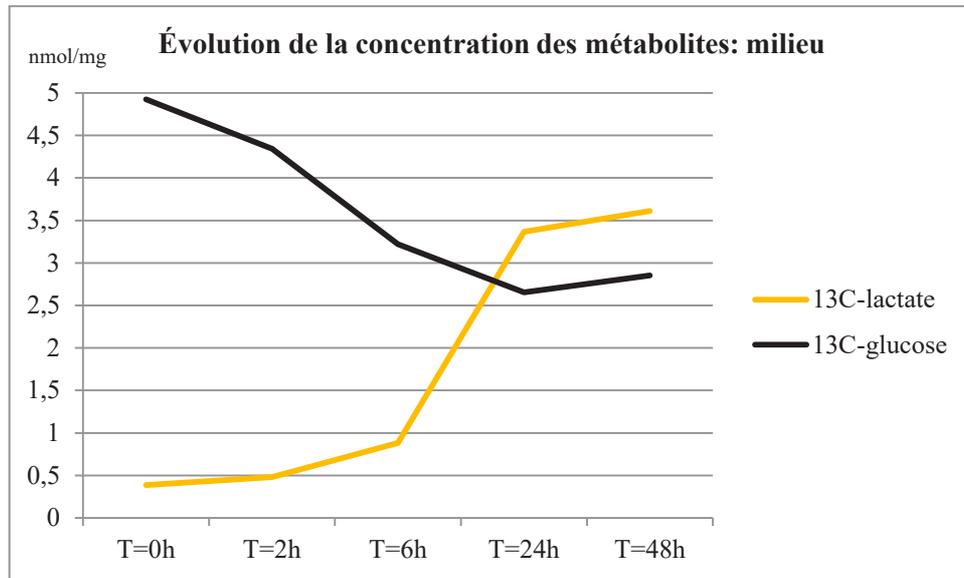


Figure 67 : Étude cinétique 1 avec spectres HSQC-1D obtenus à t= 2h, t=4h, t=6h, t=24h et t=48h.

A)



B)

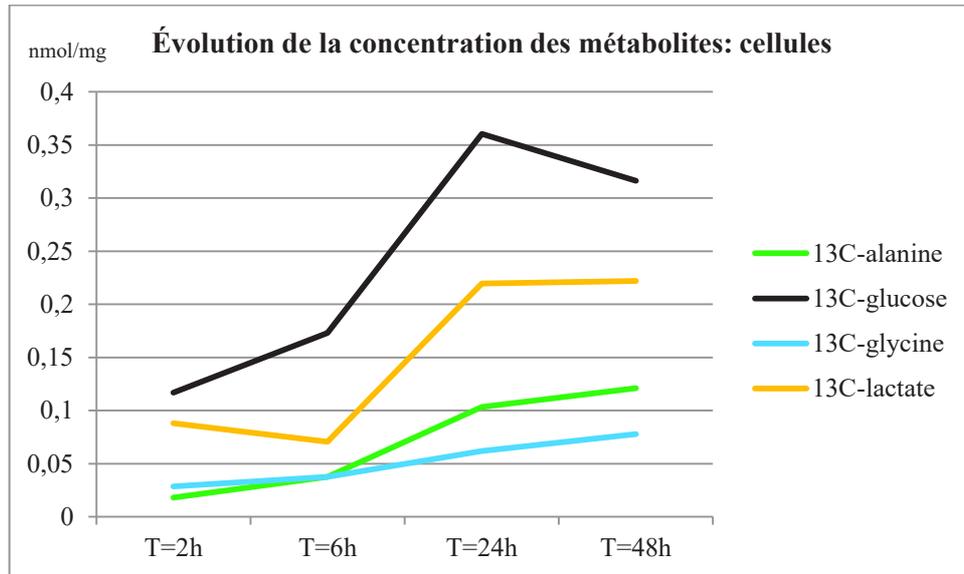


Figure 68 : Évolution de la concentration de métabolites marqués au  $^{13}\text{C}$  dans le milieu A) et les cellules B).

## Étude cinétique 2 :

*Contrôle qualité (comptage et viabilité cellulaire) :* (Tableau 11, Tableau 12,

Tableau 13 et Tableau 14)

Temps de prélèvement	T=2h		T=6h		T=24h		T=48h		Contrôle	
Comptage cellulaire moyen (Nb de cellules/mL)*10 <sup>6</sup>	5,08	5,18	5,66	4,06	6,83	7,19	5,99	7,65	8,04	5,8
Viabilité moyenne (%)	99	99	98	99	100	100	100	100	97	98
Nombre de cellules finales dans l'insert	5*10 <sup>6</sup>									
Nombre d'échantillons pour chaque condition	2		2		2		2		2	

**Tableau 11 :** Caractéristiques de l'échantillon utilisé pour l'étude cinétique 2 en normoxie qui sera marqué au <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose.

Temps de prélèvement	T=2h		T=6h		T=24h		T=48h		Contrôle	
Comptage cellulaire moyen (Nb de cellules/mL)*10 <sup>6</sup>	6,95	5,21	4,93	4,58	6,05	6,96	7,68	6,99	5,16	6,01
Viabilité moyenne (%)	99	99	99	100	100	99	98	97	99	98
Nombre de cellules finales dans l'insert	5*10 <sup>6</sup>									
Nombre d'échantillons pour chaque condition	2		2		2		2		2	

**Tableau 12 :** Caractéristiques de l'échantillon utilisé pour l'étude cinétique 2 en hypoxie qui sera marqué au <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose.

Temps de prélèvement	T=2h		T=6h		T=24h		T=48h		Contrôle	
Comptage cellulaire moyen (Nb de cellules/mL)*10 <sup>6</sup>	5,16	5,92	6,53	6,27	3,68	4,02	5,26	5,23	4,55	4,82
Viabilité moyenne (%)	99	98	99	99	100	100	100	100	100	99
Nombre de cellules finales dans l'insert	5*10 <sup>6</sup>									
Nombre d'échantillons pour chaque condition	2		2		2		2		2	

**Tableau 13 :** Caractéristiques de l'échantillon utilisé pour l'étude cinétique 2 en normoxie qui sera marqué à la <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-glutamine.

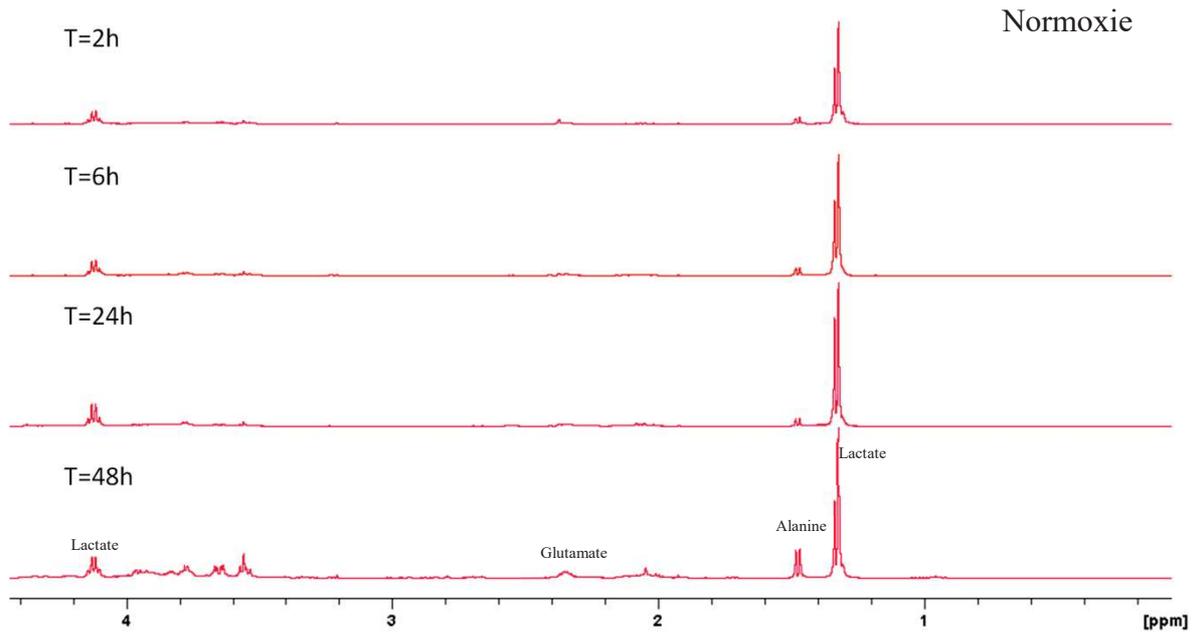
Temps de prélèvement	T=2h		T=6h		T=24h		T=48h		Contrôle	
Comptage cellulaire moyen (Nb de cellules/mL)*10 <sup>6</sup>	4,42	4,79	5,04	4,72	6,39	6,29	3,89	4,01	6,16	6,01
Viabilité moyenne (%)	99	99	98	99	95	99	98	99	97	98
Nombre de cellules finales dans l'insert	5*10 <sup>6</sup>									
Nombre d'échantillons pour chaque condition	2		2		2		2		2	

**Tableau 14 :** Caractéristiques de l'échantillon utilisé pour l'étude cinétique 2 en hypoxie qui sera marqué à la <sup>13</sup>C<sub>5</sub>-glutamine.

Résultats de l'étude cinétique 2 :

Les spectres suivants montrent les résultats de la séquence HSQC-1D pour les 2 nutriments en normoxie et en hypoxie. (Figure 69 et Figure 71).

A)



B)

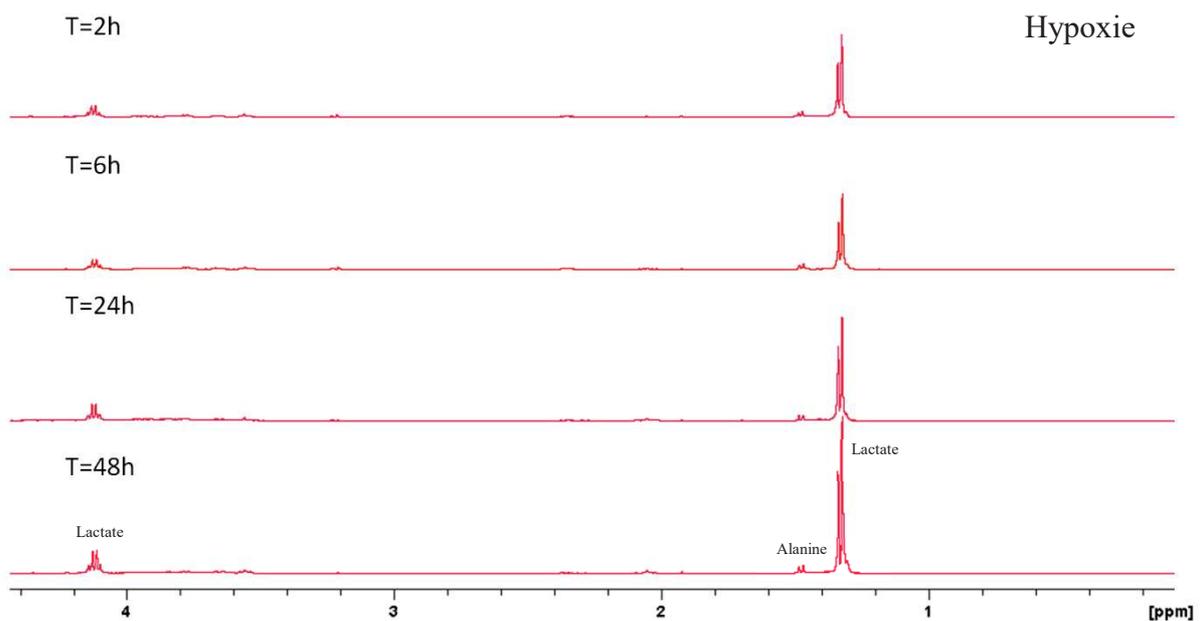
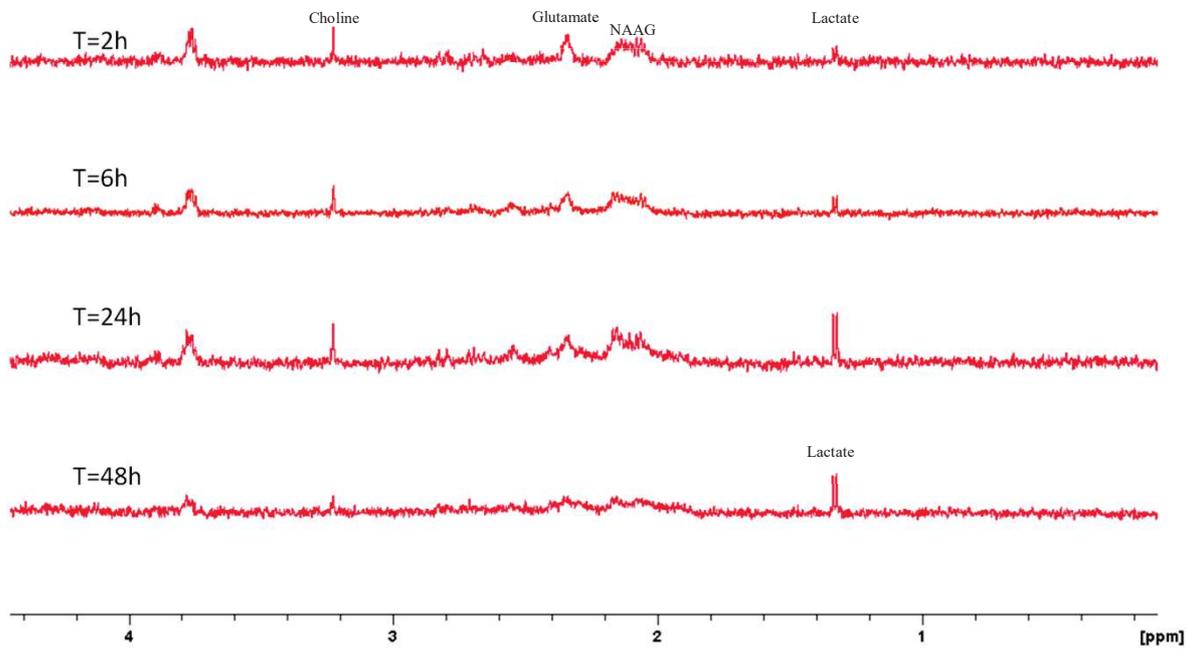


Figure 69 : Étude cinétique 2 avec spectres HSQC-1D obtenus à t= 2h, t=6h, t=24h et t=48h avec le <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucose en normoxie A) et en hypoxie B).

Normoxie

A)



B)

Hypoxie

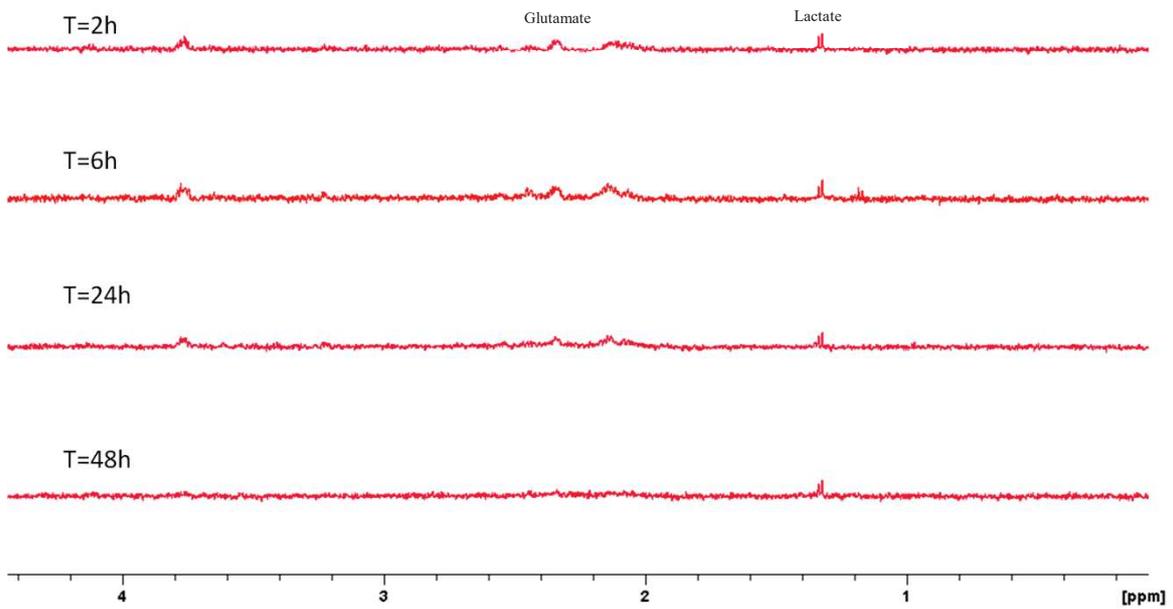


Figure 70 : Étude cinétique 2 avec spectres HSQC-1D obtenus à  $t=2\text{h}$ ,  $t=6\text{h}$ ,  $t=24\text{h}$  et  $t=48\text{h}$  avec la  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en normoxie A) et en hypoxie B).

Les figures suivantes montrent les résultats de la séquence POCE et l'identification complétée par les séquences HSQC-HR et HMBC-HR, pour les 2 nutriments en normoxie et en hypoxie (Figure 71, Figure 72, Figure 73 et Figure 74).

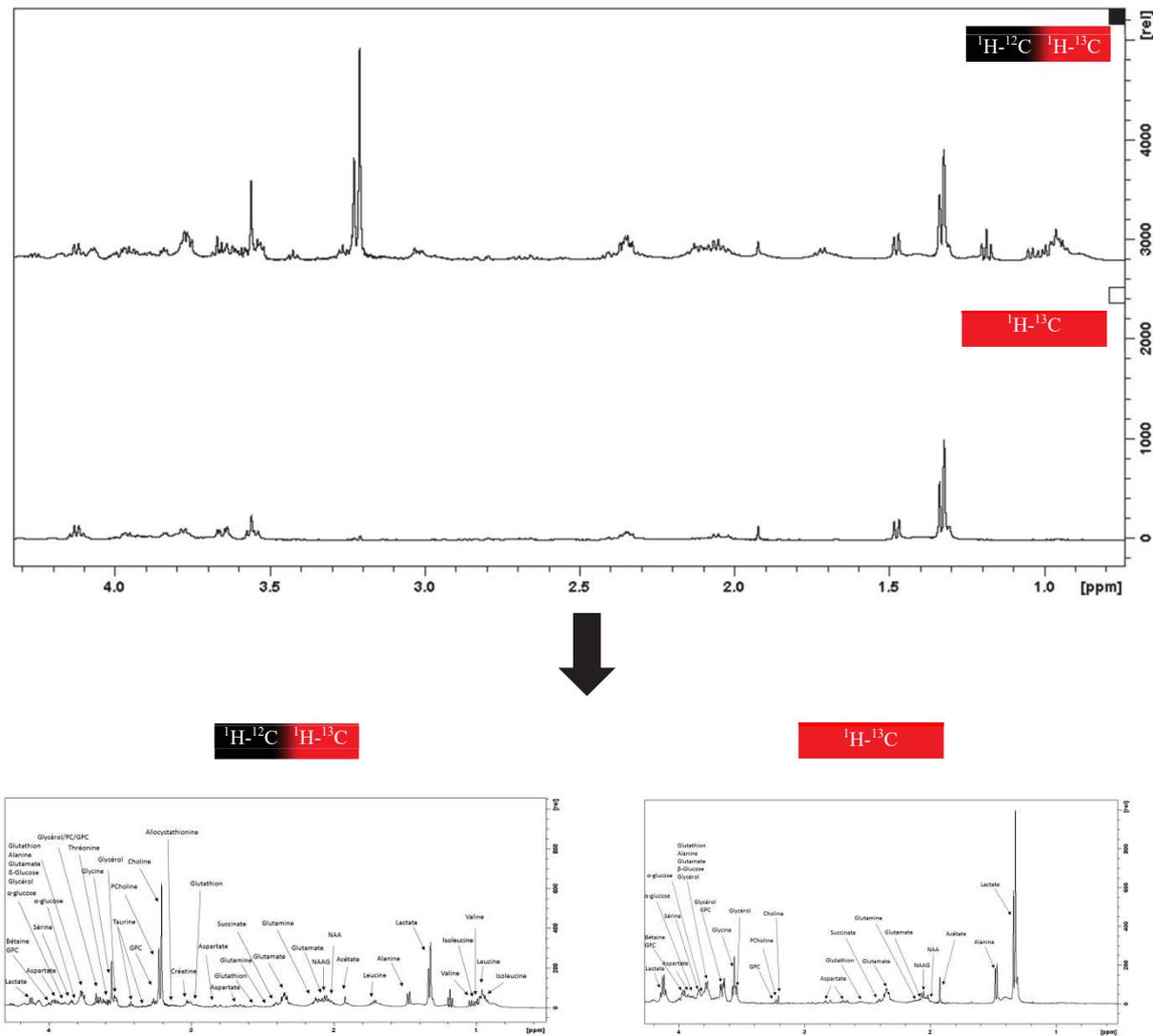
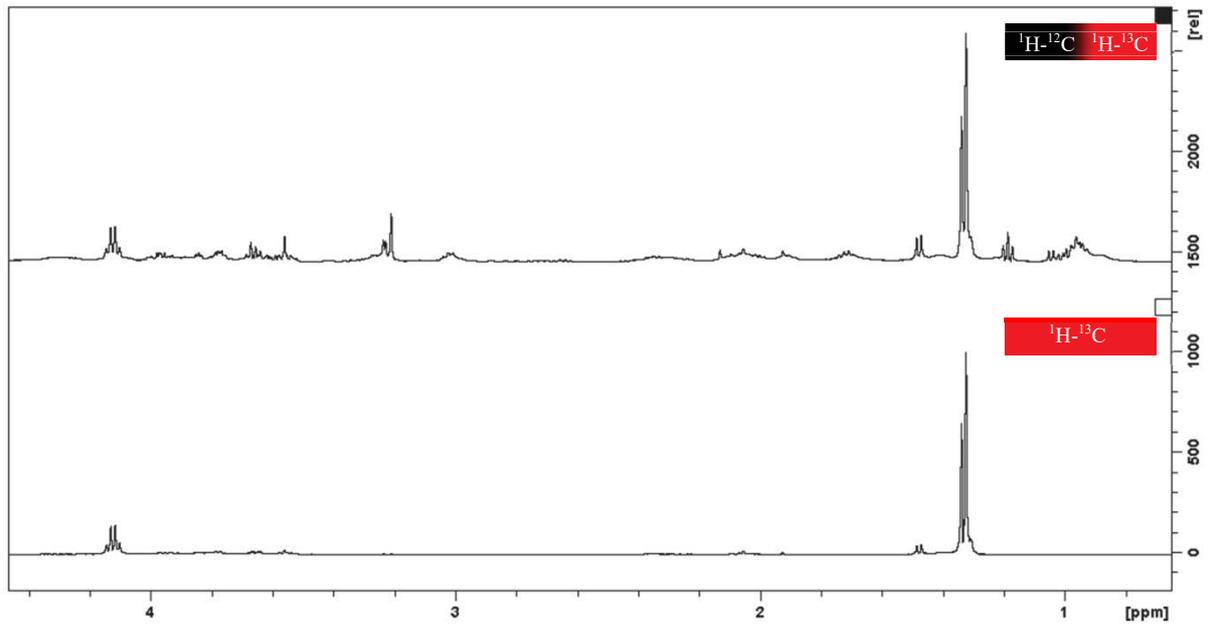


Figure 71 : Séquences POCE 40 et 42 pour le  $^{13}\text{C}_6$ -glucose en normoxie.



$^1\text{H}-^{12}\text{C}$   $^1\text{H}-^{13}\text{C}$

$^1\text{H}-^{13}\text{C}$

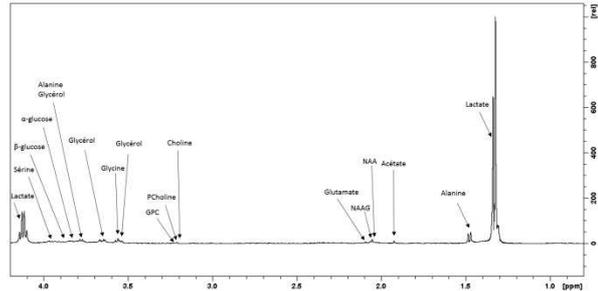
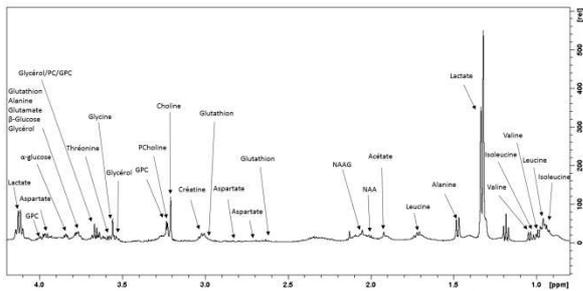


Figure 72 : Séquences POCE 40 et 42 pour le  $^{13}\text{C}_6$ -glucose en hypoxie.

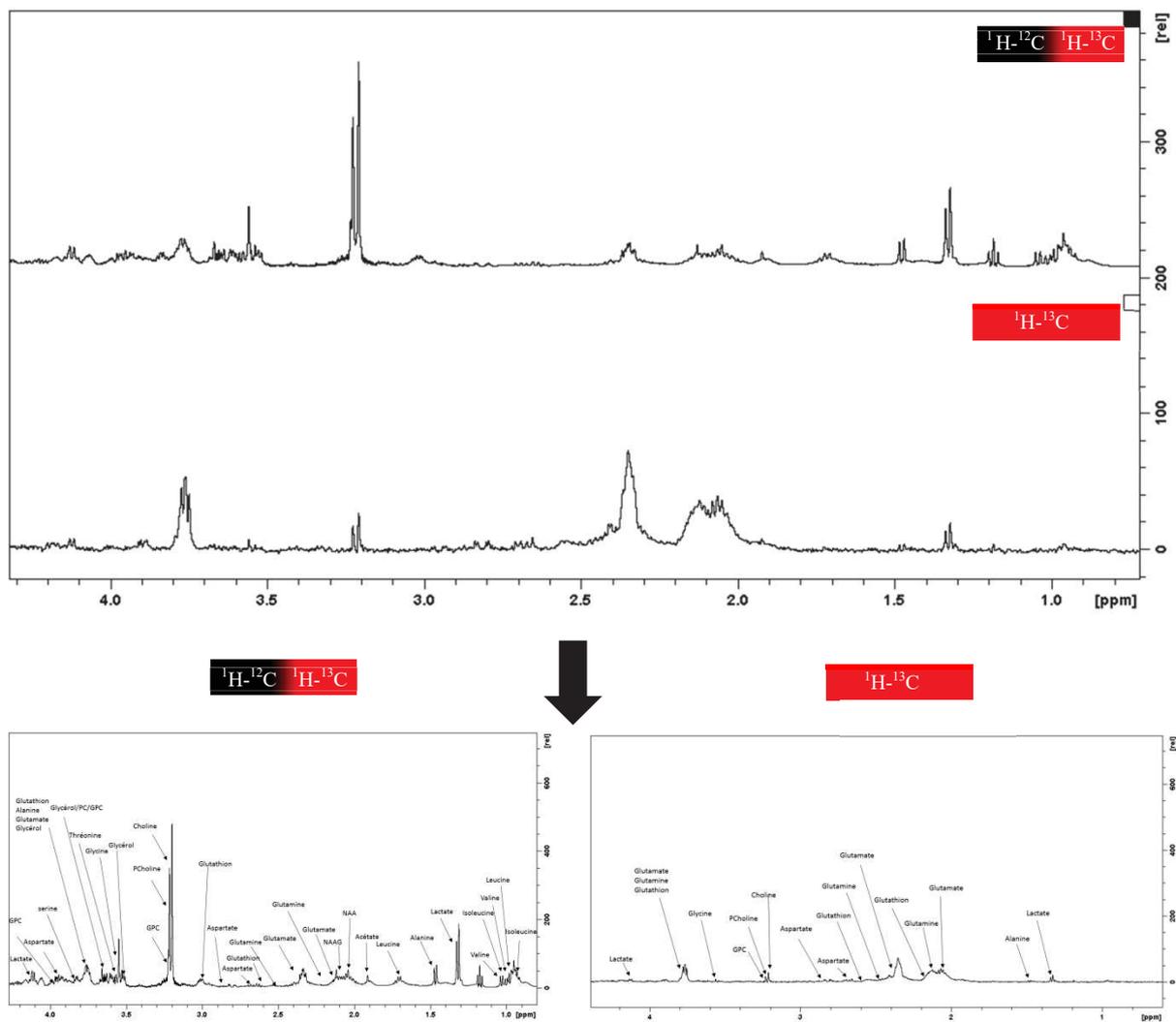


Figure 73 : Séquences POCE 40 et 42 pour la  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en normoxie.

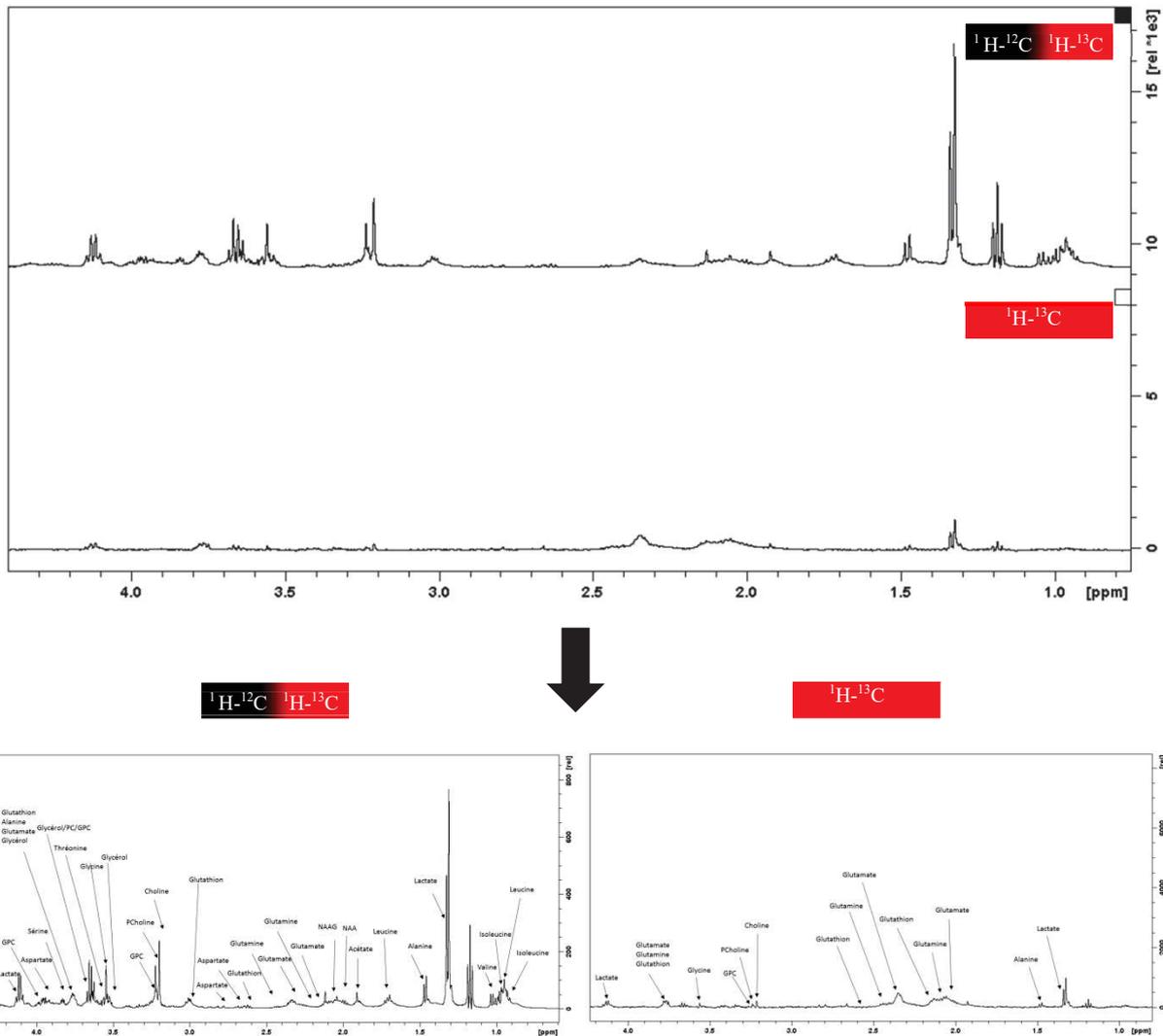


Figure 74 : Séquences POCE 40 et 42 pour la  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en hypoxie.

Enfin, les tableaux suivants (Tableau 15, Tableau 16, Tableau 17 et Tableau 18) résument l'évolution dans le temps de l'incorporation des  $^{13}\text{C}$  dans différentes molécules pour les 2 nutriments en normoxie et en hypoxie. Nous présentons également les résultats du marquage moléculaire sur le schéma métabolique simplifié (Figure 75, Figure 76, Figure 77 et Figure 78).

Métabolites	Contrôle	2h	6h	24h	48h
Allocystathionine	Non visible	/	/		
Acétate	Non visible				
Alanine					
Aspartate	Non visible				
Bétaine	Non visible	/	/	/	
Choline					
Créatine	Non visible	/	/		
Glutamate					
Glutamine					
Glutathion					
Glycérol	Non visible				
Glycérophosphocholine					
Glycine					
Isoleucine					
Valine					
Leucine					
Lactate					
NAA	Non visible				
NAAG	Non visible				
Phosphocholine					
Proline	Non visible	/	/		
Sérine	Non visible				
Taurine					
Thréonine					
Uracile	Non visible	/	/		
Méthionine					
Succinate	Non visible				
$\alpha$ -Glucose	Non visible	/			
$\beta$ -Glucose	Non visible				

**Tableau 15 : Listing des métabolites incorporant le  $^{13}\text{C}_6$ -glucose en normoxie aux différents temps. Les cercles noirs représentent les  $^{12}\text{C}$  de la molécule, les cercles rouges représentent les  $^{13}\text{C}$  d'abondance naturelle et les cercles rouges remplis représentent les  $^{13}\text{C}$  du  $^{13}\text{C}_6$ -glucose.**



Métabolites	Contrôle	2h	6h	24h	48h
Acétate	Non visible				
Alanine					
Choline					
Glutamate					
Glycérol	Non visible				
Glycerophosphocholine					
Glycine					
Isoleucine					
Valine					
Leucine					
Lactate					
NAA	Non visible	/	/		
NAAG	Non visible				
Phosphocholine					
Sérine	Non visible				
Thréonine					
$\alpha$ -Glucose	Non visible				
$\beta$ -Glucose	Non visible				
Pyruvate	Non visible	/			/

**Tableau 16 : Listing des métabolites incorporant le  $^{13}\text{C}_6$ -glucose en hypoxie aux différents temps. Les cercles noirs représentent les  $^{12}\text{C}$  de la molécule, les cercles rouges représentent les  $^{13}\text{C}$  d'abondance naturelle et les cercles rouges remplis représentent les  $^{13}\text{C}$  du  $^{13}\text{C}_6$ -glucose.**

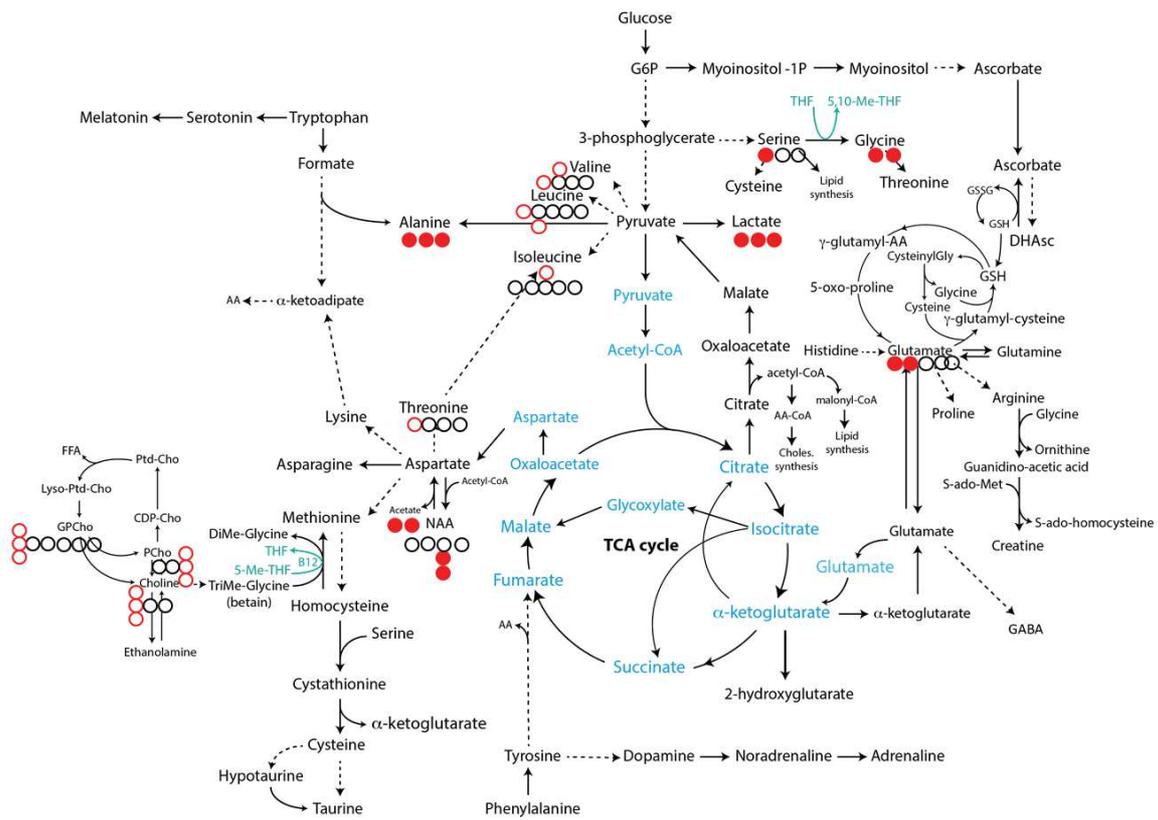


Figure 76 : Représentation du marquage cellulaire, sur le schéma métabolique simplifié, des résultats du marquage au  $^{13}\text{C}_6$ -glucose en hypoxie.

Métabolites	Contrôle	2h	6h	24h	48h
Alanine	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
Aspartate	Non visible	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
Choline	Non visible	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○
Glutamate	○ ○ ○ ○ ○	● ● ● ● ●	● ● ● ● ●	● ● ● ● ●	● ● ● ● ●
Glutamine	Non visible	○ ● ● ● ●	○ ● ● ● ●	● ● ● ● ●	● ● ● ● ●
Glutathion	Non visible	● ● ● ● ● ○ ○ ○ ○	● ● ● ● ● ○ ○ ○ ○	● ● ● ● ● ○ ○ ○ ○	● ● ● ● ● ○ ○ ○ ○
Glycérophosphocholine	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
Glycine	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○	○ ○
Isoleucine	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
Valine	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○
Leucine	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
Lactate	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
Phosphocholine	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○
Thréonine	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○
Uracile	Non visible	/	/	○ ● ○	○ ● ○

**Tableau 17 : Listing des métabolites incorporant la  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en normoxie aux différents temps. Les cercles noirs représentent les  $^{12}\text{C}$  de la molécule, les cercles rouges représentent les  $^{13}\text{C}$  d'abondance naturelle et les cercles rouges remplis représentent les  $^{13}\text{C}$  de la  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine.**

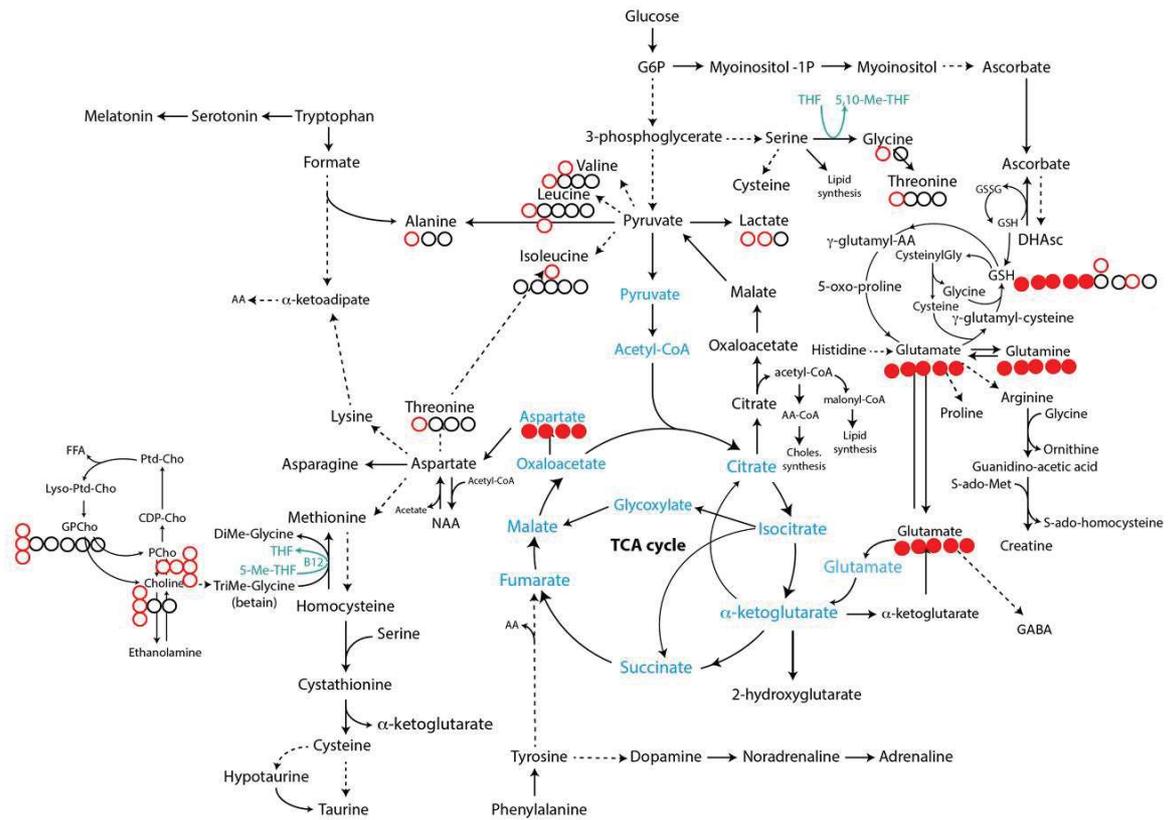


Figure 77 : Représentation du marquage cellulaire, sur le schéma métabolique simplifié, des résultats du marquage à la  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en normoxie.



Afin de suivre dans le temps l'évolution de la quantité de molécules produites à partir des 2 nutriments par rapport à la quantité totale de molécules ( $^{13}\text{C}/(^{12}\text{C}+^{13}\text{C})$ ), nous avons utilisé les séquences POCE (Figure 79, Figure 80, Figure 81 et Figure 82).

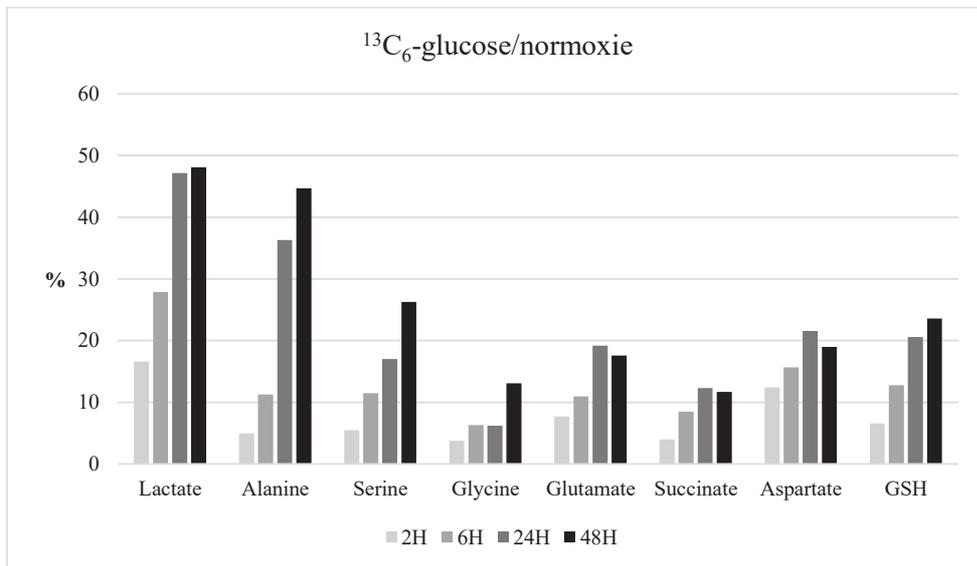


Figure 79 : Évolution du rapport  $^{13}\text{C}/(^{13}\text{C}+^{12}\text{C})$  estimé avec la séquence POCE pour les différents métabolites d'intérêt à t=2h, t=6h, t=24h et t=48h pour le  $^{13}\text{C}_6$ -glucose en normoxie.

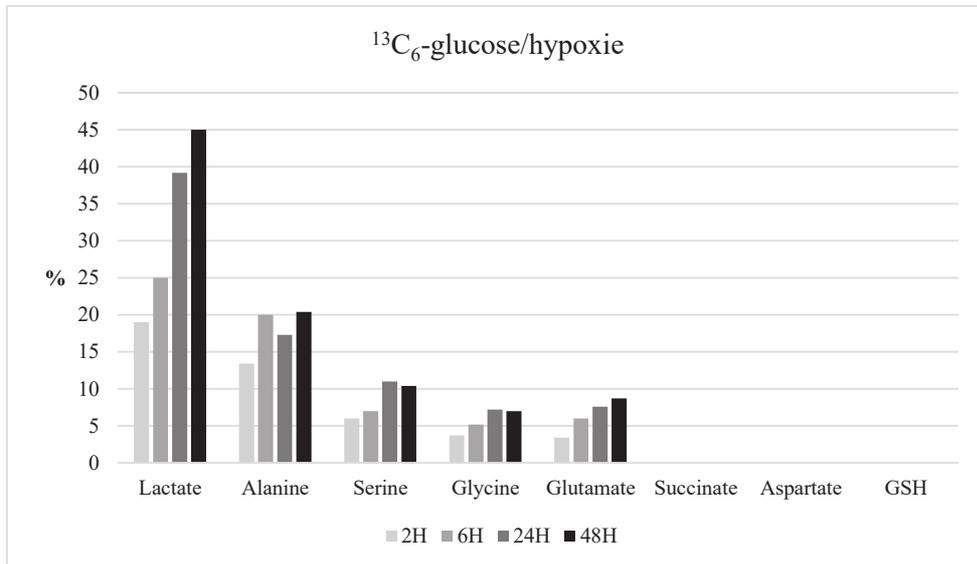


Figure 80 : Évolution du rapport  $^{13}\text{C}/(^{13}\text{C}+^{12}\text{C})$  estimé avec la séquence POCE pour les différents métabolites d'intérêt à t=2h, t=6h, t=24h et t=48h pour le  $^{13}\text{C}_6$ -glucose en hypoxie.

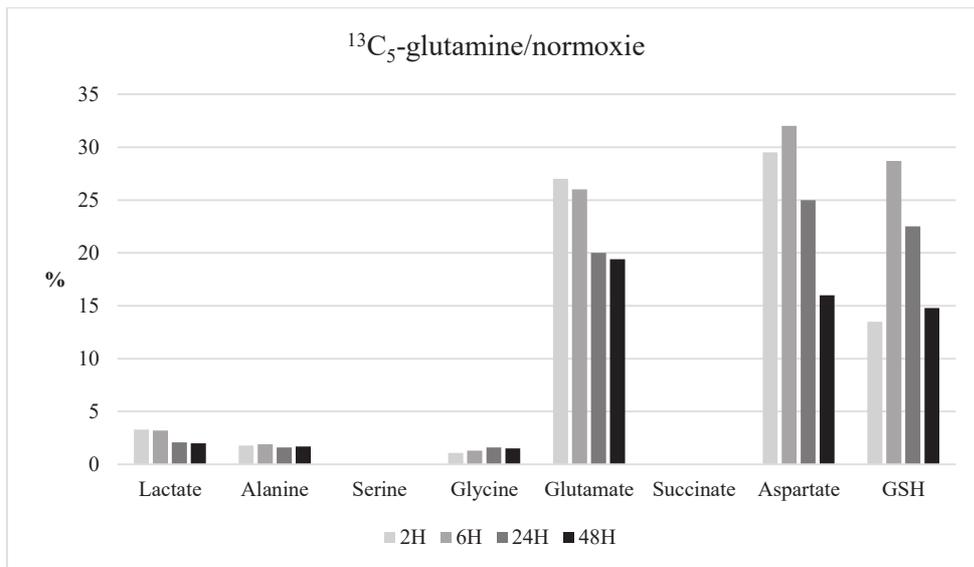


Figure 81 : Évolution du rapport  $^{13}\text{C}/(^{13}\text{C}+^{12}\text{C})$  estimé avec la séquence POCE pour les différents métabolites d'intérêt à t=2h, t=6h, t=24h et t=48h pour la  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en normoxie.

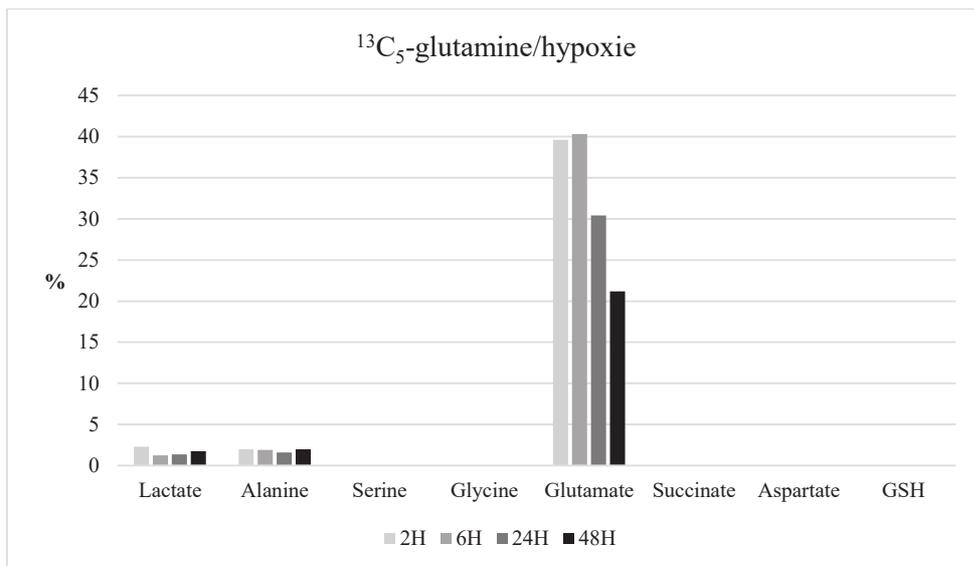


Figure 82 : Évolution du rapport  $^{13}\text{C}/(^{13}\text{C}+^{12}\text{C})$  estimé avec la séquence POCE pour les différents métabolites d'intérêt à t=2h, t=6h, t=24h et t=48h pour la  $^{13}\text{C}_5$ -glutamine en hypoxie.

### 4.3.3. Mise au point sur des xéno greffes

Afin de valider la technique sur des tissus, nous avons testé nos séquences sur des modèles de xéno greffes de tumeurs chez des souris qui ont bénéficié de l'injection *i.p.* (intra-péritonéale) de  $^{13}\text{C}_6$ -glucose.

*Population de souris étudiées :*

Il s'agit du modèle de métastase de tumeurs mammaires PyMT-MMTV (217) (*polyomavirus middle T-antigen - Mouse mammary tumor virus*) qui développent spontanément des adénocarcinomes mammaires. MMTV-LTR (*Mouse mammary tumor virus - terminal repeat*) est utilisé pour stimuler l'antigène T moyen du polyomavirus spécifique de la glande mammaire qui conduit au développement rapide de tumeurs métastatiques (217).

Nous disposons de 4 échantillons de chaque groupe provenant de 4 souris différentes du même génotype (n=4 dans chaque groupe)

Groupes 1 et 2 : PyMT-Tg/MMP11 -/- et son contrôle (PyMT-Tg/MMP11 +/+)

Groupes 3 et 4 : PyMT-Tg/MMP11-Tg et son contrôle (PyMT-Tg/MMP11-WT)

Toutes les souris ont reçu le glucose marqué au  $^{13}\text{C}$ , le but étant de montrer l'impact de la MMP11 sur la progression tumorale dans le modèle de souris de tumeurs mammaires PyMT-MMTV. Même si ce travail ne fait pas l'objet direct de cette thèse il nous a permis de valider notre méthode sur des échantillons tissulaires. Nous présentons ici uniquement un exemple de résultats d'une des souris du groupe MMP11 +/+ (Figure 83). Nous avons constaté une bonne reproductibilité des quantifications et des estimations du rapport ( $^{13}\text{C}/(^{13}\text{C}+^{12}\text{C})$ ).

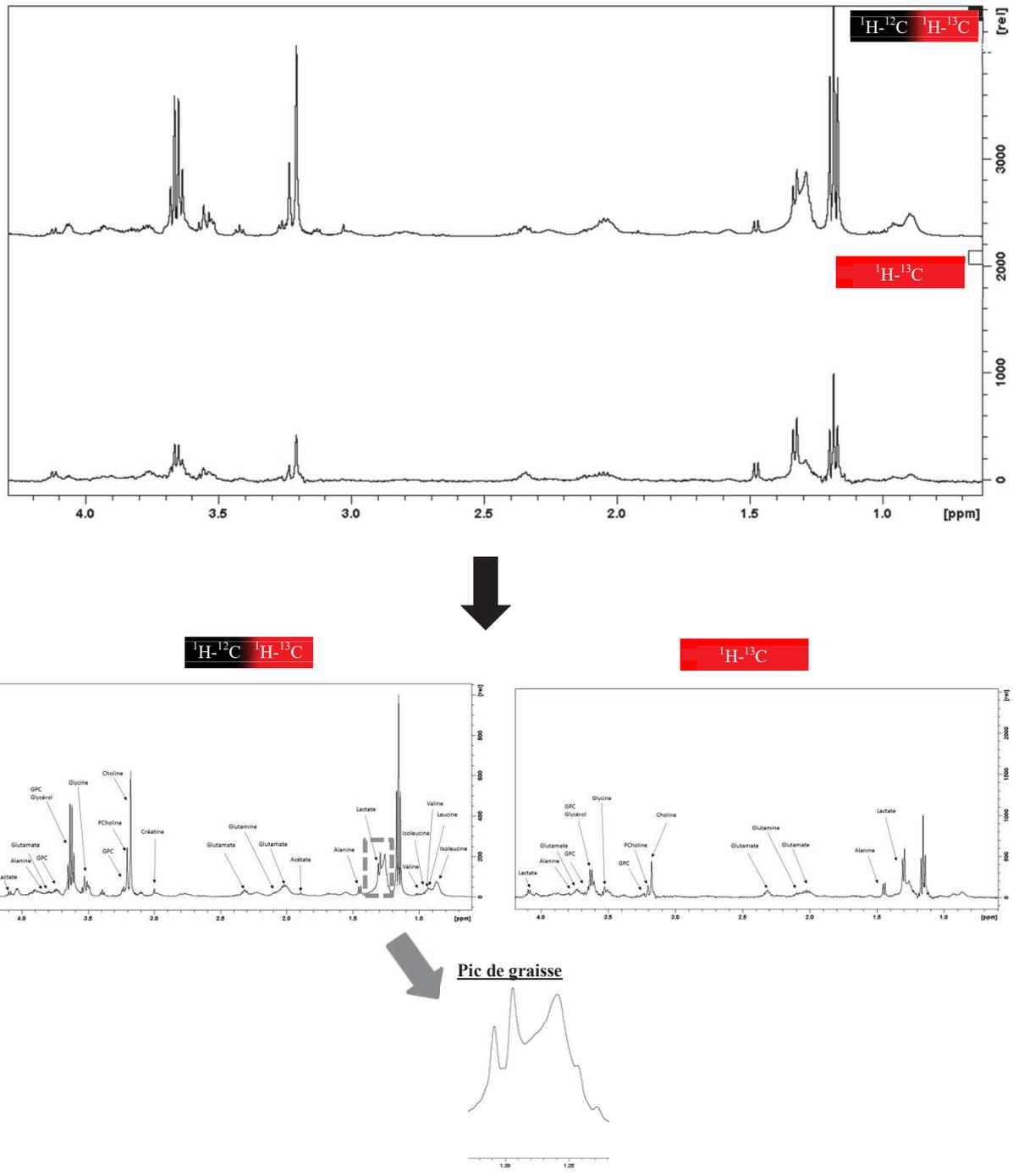


Figure 83 : Exemple de spectre obtenu : POCE 40 et 42 pour la souris MMP11 +/- . POCE 40 : on observe les hydrogènes portés par les  $^{12}\text{C}$  et au  $^{13}\text{C}$ . Le pic visible à 1,3 ppm correspond à la graisse. POCE 42 : on observe les hydrogènes portés par les  $^{13}\text{C}$ .

## **5. DÉFIS ET PERSPECTIVES**

Des progrès substantiels ont été réalisés au cours de la dernière décennie pour comprendre les mécanismes, les conséquences biologiques et les responsabilités associés à la reprogrammation métabolique du cancer. Plusieurs thèmes communs sont ressortis de cette recherche. Premièrement, la reprogrammation métabolique est essentielle pour la biologie des cellules malignes, en particulier leur capacité à survivre et à croître en utilisant des voies métaboliques conventionnelles pour produire de l'énergie, synthétiser des biomasses et maintenir l'équilibre redox. Deuxièmement, la reprogrammation métabolique est le résultat de mutations dans les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs, conduisant à l'activation des voies de signalisation PI3K et mTOR et des réseaux de transcription impliquant HIF, MYC et SREBP-1. Troisièmement, les altérations des niveaux de métabolites peuvent affecter la signalisation cellulaire, l'épigénétique et l'expression des gènes par des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la méthylation et l'oxydation du thiol. Quatrièmement, les études sur les cellules cultivées ont démontré une remarquable diversité de voies anaboliques et cataboliques dans le cancer, avec l'induction de l'autophagie et l'utilisation de lipides et de protéines extracellulaires complétant les voies classiques comme la glycolyse et la glutaminolyse.

Nous sommes sortis de la période où le métabolisme du cancer était réduit au seul effet Warburg. Plusieurs défis façonneront probablement la recherche au cours de la prochaine décennie. Le premier défi est d'introduire le microenvironnement dans nos réflexions. Les études réalisées jusqu'à maintenant se basaient principalement sur des lignées cellulaires cancéreuses. Ces modèles expérimentaux simples ont été très instructifs mais sans microenvironnement, alors qu'il est maintenant possible de modéliser un microenvironnement tumoral précis en culture. L'analyse directe des flux métaboliques dans les tumeurs intactes (animal et Homme) devrait commencer à jouer un rôle plus important dans le domaine de la cancérologie et pourrait se révéler essentielle pour déterminer précisément comment déployer des inhibiteurs métaboliques dans les essais cliniques. Dans ce sens, il est tout à fait possible d'observer des divergences entre les résultats obtenus sur des modèles de cellules en culture et les tumeurs solides intactes.

Un autre défi qui sous tendra ces études sur les tumeurs intactes sera de développer des approches analytiques ou informatiques pour déconvoluer les phénotypes métaboliques distincts des sous-types cellulaires à l'intérieur même de la tumeur solide et/ou dans son microenvironnement : les cellules cancéreuses, les fibroblastes, les lymphocytes et les cellules

endothéliales. Cela permettrait de comprendre les relations métaboliques entre les différentes populations de cellules au sein d'une tumeur et d'évaluer si la reprogrammation métabolique des cellules du stroma offre des opportunités thérapeutiques.

Ce travail va dans le sens des défis actuels des études du métabolisme tumoral. Nous avons pu identifier un sous-groupe de gliomes malins présentant des caractéristiques métaboliques différentes grâce à la métabolomique par RMN HRMAS et facilement identifiable *in vivo* par l'imagerie TEP au  $^{18}\text{F}$ -FDG. Afin de réaliser des analyses de flux métaboliques par  $^{13}\text{C}$  chez l'Homme, nous avons mis en place des outils fiables d'identification et de quantification des métabolites. À ce titre, nous venons d'obtenir un financement du Cancéropôle Grand-Est pour réaliser un premier travail exploratoire sur cette problématique chez l'Homme. Ce projet préliminaire consiste à étudier les flux métaboliques privilégiés dans ces deux « types » de gliomes de haut grade mis en évidence dans notre travail. Nous envisageons d'utiliser une sonde métabolique marquée au  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}_6$ -glucose) infusée en peropératoire (Figure 84) et de récupérer l'échantillon tumoral pour une analyse en RMN HRMAS et en spectrométrie de masse-MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) afin d'avoir une vision complète du métabolisme tumoral. Les données du métabolisme seront corrélées à l'expression de la voie OXPHOS, aux transporteurs GLUT1 (glucose), MCT1 et MCT4 (lactate), ASCT2 et SLC1A5 (glutamine), CD36/FAT et CPT1 (acides gras) et à la chaîne respiratoire mitochondriale.

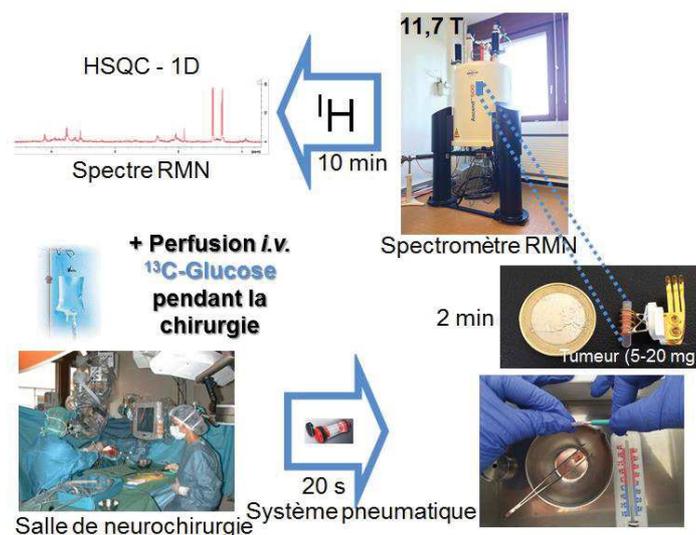


Figure 84 : Schéma du protocole d'acheminement d'un échantillon jusqu'à l'analyse spectrale avec perfusion pré-chirurgicale du  $^{13}\text{C}_6$ -glucose.

L'analyse par imagerie MALDI permettra la localisation des métabolites sur l'ensemble de l'échantillon tumoral récupéré pour créer des images moléculaires (218).

Au cours de nos travaux, nous avons également réalisé les premières images MALDI de gliomes afin d'ajuster le protocole (Figure 85).

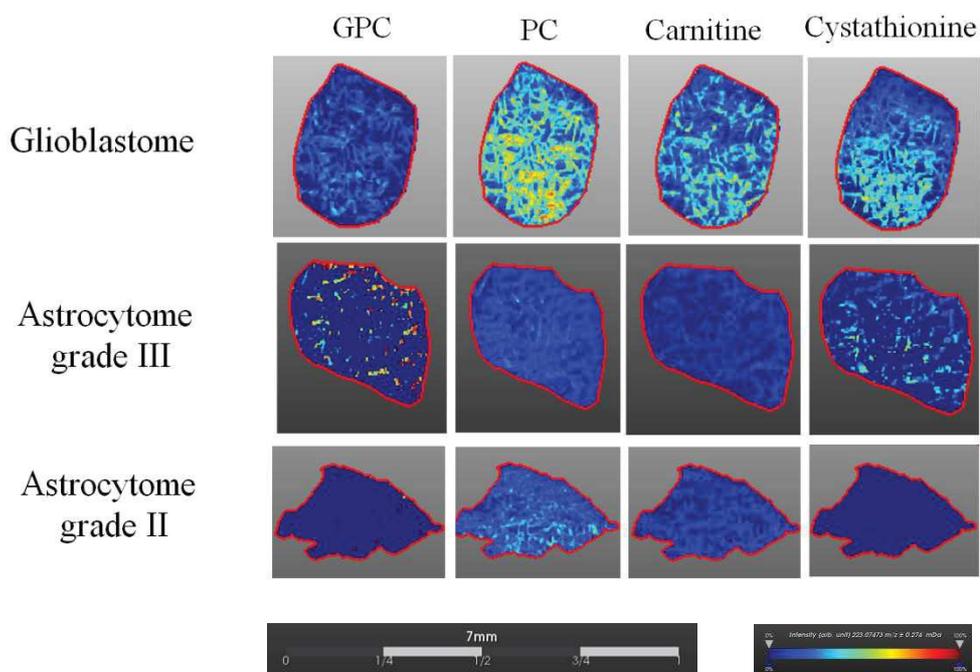


Figure 85 : Imagerie MALDI : exemple de la distribution spatiale de 4 métabolites de gliomes d'origine astrocytaire.

Enfin, ce travail a permis d'identifier différents biomarqueurs pronostiques des gliomes, détectables de façon rapide et fiable, même en peropératoire. Ces biomarqueurs montrent également les voies métaboliques privilégiées utilisées par les gliomes et pourront devenir les cibles de nouveaux traitements. Nous poursuivrons le développement méthodologique en vue d'études de réponse aux traitements sur cultures cellulaires et/ou tumeurs intactes de gliomes. Cette approche pourrait aussi s'appliquer à d'autres domaines de la cancérologie. L'utilisation de la métabolomique permettra de mieux comprendre l'activité anti-proliférative des traitements, leur pharmacocinétique et leurs conséquences sur les différentes voies métaboliques. Elle permettra de monitorer et d'adapter les différents traitements chez l'Homme. Nous espérons ainsi améliorer la prise en charge des patients par une thérapeutique personnalisée.

## **6. BIBLIOGRAPHIE**

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 7 janv 2000;100(1):57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4 mars 2011;144(5):646-74.
3. Huggins C, Hodges C. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Research*. avr 1941;
4. Shih C, Shilo BZ, Goldfarb MP, Dannenberg A, Weinberg RA. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. nov 1979;76(11):5714-8.
5. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. juill 1960;25:85-109.
6. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 5 avr 2001;344(14):1031-7.
7. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1 sept 1988;319(9):525-32.
8. Garnis C, Buys TPH, Lam WL. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Mol Cancer*. 22 mars 2004;3:9.
9. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 8 mars 2012;366(10):883-92.
10. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. juin 2008;13(6):472-82.
11. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. HIF at a glance. *J Cell Sci*. 15 avr 2009;122(Pt 8):1055-7.
12. Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res*. 10 mars 2001;264(1):169-84.
13. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)*. juin 2016;131(6):803-20.
14. Verreault M, Delattre J-Y, Idbaih A. [Adult diffuse glioma: genetic heterogeneity and therapeutic implications]. *Med Sci MS*. oct 2012;28(10):813-6.
15. gliomes\_anat\_path\_.pdf [Internet]. [cité 27 août 2015]. Disponible sur: [http://campus.neurochirurgie.fr/IMG/pdf/gliomes\\_anat\\_path\\_.pdf](http://campus.neurochirurgie.fr/IMG/pdf/gliomes_anat_path_.pdf)
16. Figarella-Branger D, Labrousse F, Mohktari K, Société française de neuropathologie, Réseau de neuro-oncologie pathologique. [Guidelines for adult diffuse gliomas WHO grade II, III and IV: pathology and biology. Société française de neuropathologie . Réseau de neuro-oncologie pathologique]. *Ann Pathol*. oct 2012;32(5):318-27.

17. Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer*. 1 avr 1997;79(7):1381-93.
18. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, Yung WKA, Salama SR, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med*. 25 juin 2015;372(26):2481-98.
19. Andronesi OC, Kim GS, Gerstner E, Batchelor T, Tzika AA, Fantin VR, et al. Detection of 2-hydroxyglutarate in IDH-mutated glioma patients by in vivo spectral-editing and 2D correlation magnetic resonance spectroscopy. *Sci Transl Med*. 11 janv 2012;4(116):116ra4.
20. Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ, Hatanpaa KJ, Rakheja D, Kovacs Z, et al. 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. *Nat Med*. avr 2012;18(4):624-9.
21. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 26 sept 2008;321(5897):1807-12.
22. Wang X-W, Ciccarino P, Rossetto M, Boisselier B, Marie Y, Desestret V, et al. IDH mutations: genotype-phenotype correlation and prognostic impact. *BioMed Res Int*. 2014;2014:540236.
23. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 10 déc 2009;462(7274):739-44.
24. Molenaar RJ, Radivoyevitch T, Maciejewski JP, van Noorden CJF, Bleeker FE. The driver and passenger effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in oncogenesis and survival prolongation. *Biochim Biophys Acta*. déc 2014;1846(2):326-41.
25. Romo CG, Palsgrove DN, Sivakumar A, Elledge CR, Kleinberg LR, Chaichana KL, et al. Widely metastatic IDH1-mutant glioblastoma with oligodendroglial features and atypical molecular findings: a case report and review of current challenges in molecular diagnostics. *Diagn Pathol*. 9 févr 2019;14(1):16.
26. Nabors LB, Portnow J, Ammirati M, Baehring J, Brem H, Butowski N, et al. NCCN Guidelines Insights: Central Nervous System Cancers, Version 1.2017. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. 2017;15(11):1331-45.
27. Chen X, Yan Y, Zhou J, Huo L, Qian L, Zeng S, et al. Clinical prognostic value of isocitrate dehydrogenase mutation, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation, and 1p19q co-deletion in glioma patients. *Ann Transl Med*. oct 2019;7(20):541.
28. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst*. 7 oct 1998;90(19):1473-9.
29. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*. 28 janv 2016;164(3):550-63.
30. Hu X, Martinez-Ledesma E, Zheng S, Kim H, Barthel F, Jiang T, et al. Multigene signature for predicting prognosis of patients with 1p19q co-deletion diffuse glioma. *Neuro-Oncol*. 01 2017;19(6):786-95.

31. Kim Y-H, Nobusawa S, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, et al. Molecular classification of low-grade diffuse gliomas. *Am J Pathol.* déc 2010;177(6):2708-14.
32. Gil-Benso R, Lopez-Gines C, Benito R, López-Guerrero JA, Callaghan RC, Pellín A, et al. Concurrent EGFR amplification and TP-53 mutation in glioblastomas. *Clin Neuropathol.* oct 2007;26(5):224-31.
33. Lacroix M, Linares LK, Le Cam L. [Role of the p53 tumor suppressor in metabolism]. *Med Sci MS.* déc 2013;29(12):1125-30.
34. Han S, Meng L, Jiang Y, Cheng W, Tie X, Xia J, et al. Lithium enhances the antitumour effect of temozolomide against TP53 wild-type glioblastoma cells via NFAT1/FasL signalling. *Br J Cancer.* 9 mai 2017;116(10):1302-11.
35. Mansouri A, Hachem LD, Mansouri S, Nassiri F, Laperriere NJ, Xia D, et al. MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma: refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro-Oncol.* 14 2019;21(2):167-78.
36. Hegi ME, Genbrugge E, Gorlia T, Stupp R, Gilbert MR, Chinot OL, et al. MGMT Promoter Methylation Cutoff with Safety Margin for Selecting Glioblastoma Patients into Trials Omitting Temozolomide: A Pooled Analysis of Four Clinical Trials. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 mars 2019;25(6):1809-16.
37. Hegi ME, Stupp R. Withholding temozolomide in glioblastoma patients with unmethylated MGMT promoter--still a dilemma? *Neuro-Oncol.* nov 2015;17(11):1425-7.
38. Wick W, Gorlia T, Bady P, Platten M, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, et al. Phase II Study of Radiotherapy and Temozolomide versus Radiochemotherapy with Temozolomide in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma without MGMT Promoter Hypermethylation (EORTC 26082). *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 oct 2016;22(19):4797-806.
39. Herrlinger U, Schäfer N, Steinbach JP, Weyerbrock A, Hau P, Goldbrunner R, et al. Bevacizumab Plus Irinotecan Versus Temozolomide in Newly Diagnosed O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Nonmethylated Glioblastoma: The Randomized GLARIUS Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 2016;34(14):1611-9.
40. Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res.* 1 mars 2000;60(5):1383-7.
41. Altieri R, Agnoletti A, Quattrucci F, Garbossa D, Calamo Specchia FM, Bozzaro M, et al. Molecular biology of gliomas: present and future challenges. *Transl Med UniSa.* sept 2014;10:29-37.
42. Li B, Yuan M, Kim I-A, Chang C-M, Bernhard EJ, Shu H-KG. Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. *Oncogene.* 3 juin 2004;23(26):4594-602.
43. Han F, Hu R, Yang H, Liu J, Sui J, Xiang X, et al. PTEN gene mutations correlate to poor prognosis in glioma patients: a meta-analysis. *OncoTargets Ther.* 2016;9:3485-92.
44. Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci.* juill 2001;114(Pt 13):2375-82.

45. Jiang B-H, Liu L-Z. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. janv 2008;1784(1):150-8.
46. Lambin P, Rios-Velazquez E, Leijenaar R, Carvalho S, van Stiphout RGPM, Granton P, et al. Radiomics: extracting more information from medical images using advanced feature analysis. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. mars 2012;48(4):441-6.
47. Lieberman F. Glioblastoma update: molecular biology, diagnosis, treatment, response assessment, and translational clinical trials. *F1000Research*. 2017;6:1892.
48. Varlet P, Jouvret A, Miquel C, Saint-Pierre G, Beuvon F, Daumas-Duport C. [Criteria of diagnosis and grading of oligodendrogliomas or oligo-astrocytomas according to the WHO and Sainte-Anne classifications]. *Neurochirurgie*. sept 2005;51(3-4 Pt 2):239-46.
49. Bracard S, Taillandier L, Antoine V, Kremer S, Taillandier C, Schmitt E. [Cerebral gliomas: imaging diagnosis and follow-up]. *J Radiol*. juin 2006;87(6 Pt 2):779-91.
50. Rees JH, Smirniotopoulos JG, Jones RV, Wong K. Glioblastoma multiforme: radiologic-pathologic correlation. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc*. nov 1996;16(6):1413-38; quiz 1462-3.
51. Scott JN, Brasher PMA, Sevick RJ, Rewcastle NB, Forsyth PA. How often are nonenhancing supratentorial gliomas malignant? A population study. *Neurology*. 24 sept 2002;59(6):947-9.
52. Ginsberg LE, Fuller GN, Hashmi M, Leeds NE, Schomer DF. The significance of lack of MR contrast enhancement of supratentorial brain tumors in adults: histopathological evaluation of a series. *Surg Neurol*. avr 1998;49(4):436-40.
53. Bund C, Heimburger C, Imperiale A, Lhermitte B, Chenard M-P, Lefebvre F, et al. FDOPA PET-CT of Nonenhancing Brain Tumors. *Clin Nucl Med*. avr 2017;42(4):250-7.
54. Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 avr 2010;28(11):1963-72.
55. Gillard J, Waldman A, Barker P. *Clinical MR neuroimaging*. 2009. (Cambridge University Press).
56. Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ, Hatanpaa KJ, Rakheja D, Kovacs Z, et al. 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. *Nat Med*. 26 janv 2012;18(4):624-9.
57. Pope WB, Prins RM, Albert Thomas M, Nagarajan R, Yen KE, Bittinger MA, et al. Non-invasive detection of 2-hydroxyglutarate and other metabolites in IDH1 mutant glioma patients using magnetic resonance spectroscopy. *J Neurooncol*. mars 2012;107(1):197-205.
58. Albert NL, Weller M, Suchorska B, Galldiks N, Soffietti R, Kim MM, et al. Response Assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro-Oncol*. 2016;18(9):1199-208.
59. Avril N. GLUT1 expression in tissue and (18)F-FDG uptake. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. juin 2004;45(6):930-2.

60. Chen W, Silverman DHS. Advances in evaluation of primary brain tumors. *Semin Nucl Med.* juill 2008;38(4):240-50.
61. De Witte O, Lefranc F, Levivier M, Salmon I, Brotchi J, Goldman S. FDG-PET as a prognostic factor in high-grade astrocytoma. *J Neurooncol.* sept 2000;49(2):157-63.
62. Padma MV, Said S, Jacobs M, Hwang DR, Dunigan K, Satter M, et al. Prediction of pathology and survival by FDG PET in gliomas. *J Neurooncol.* sept 2003;64(3):227-37.
63. Hanson MW, Glantz MJ, Hoffman JM, Friedman AH, Burger PC, Schold SC, et al. FDG-PET in the selection of brain lesions for biopsy. *J Comput Assist Tomogr.* oct 1991;15(5):796-801.
64. Levivier M, Goldman S, Bidaut LM, Luxen A, Stanus E, Przedborski S, et al. Positron emission tomography-guided stereotactic brain biopsy. *Neurosurgery.* oct 1992;31(4):792-7; discussion 797.
65. Dankbaar JW, Snijders TJ, Robe PA, Seute T, Eppinga W, Hendrikse J, et al. The use of (18)F-FDG PET to differentiate progressive disease from treatment induced necrosis in high grade glioma. *J Neurooncol.* oct 2015;125(1):167-75.
66. Jansen NL, Graute V, Armbruster L, Suchorska B, Lutz J, Eigenbrod S, et al. MRI-suspected low-grade glioma: is there a need to perform dynamic FET PET? *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* juin 2012;39(6):1021-9.
67. Fueger BJ, Czernin J, Cloughesy T, Silverman DH, Geist CL, Walter MA, et al. Correlation of 6-18F-fluoro-L-dopa PET uptake with proliferation and tumor grade in newly diagnosed and recurrent gliomas. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* oct 2010;51(10):1532-8.
68. Janvier L, Olivier P, Blonski M, Morel O, Vignaud J-M, Karcher G, et al. Correlation of SUV-Derived Indices With Tumoral Aggressiveness of Gliomas in Static 18F-FDOPA PET: Use in Clinical Practice. *Clin Nucl Med.* sept 2015;40(9):e429-435.
69. Ledezma CJ, Chen W, Sai V, Freitas B, Cloughesy T, Czernin J, et al. 18F-FDOPA PET/MRI fusion in patients with primary/recurrent gliomas: initial experience. *Eur J Radiol.* août 2009;71(2):242-8.
70. Lieberman BP, Ploessl K, Wang L, Qu W, Zha Z, Wise DR, et al. PET imaging of glutaminolysis in tumors by 18F-(2S,4R)4-fluoroglutamine. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* déc 2011;52(12):1947-55.
71. Ploessl K, Wang L, Lieberman BP, Qu W, Kung HF. Comparative evaluation of 18F-labeled glutamic acid and glutamine as tumor metabolic imaging agents. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* oct 2012;53(10):1616-24.
72. Venneti S, Dunphy MP, Zhang H, Pitter KL, Zanzonico P, Campos C, et al. Glutamine-based PET imaging facilitates enhanced metabolic evaluation of gliomas in vivo. *Sci Transl Med.* 11 févr 2015;7(274):274ra17.
73. Zhu L, Ploessl K, Zhou R, Mankoff D, Kung HF. Metabolic Imaging of Glutamine in Cancer. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* avr 2017;58(4):533-7.

74. Dunphy MPS, Harding JJ, Venneti S, Zhang H, Burnazi EM, Bromberg J, et al. In Vivo PET Assay of Tumor Glutamine Flux and Metabolism: In-Human Trial of 18F-(2S,4R)-4-Fluoroglutamine. *Radiology*. 2018;287(2):667-75.
75. Salamanca-Cardona L, Keshari KR. (13)C-labeled biochemical probes for the study of cancer metabolism with dynamic nuclear polarization-enhanced magnetic resonance imaging. *Cancer Metab*. 2015;3:9.
76. Gallagher FA, Kettunen MI, Day SE, Lerche M, Brindle KM. 13C MR spectroscopy measurements of glutaminase activity in human hepatocellular carcinoma cells using hyperpolarized 13C-labeled glutamine. *Magn Reson Med*. août 2008;60(2):253-7.
77. Gallagher FA, Kettunen MI, Day SE, Hu D, Karlsson M, Gisselsson A, et al. Detection of tumor glutamate metabolism in vivo using (13)C magnetic resonance spectroscopy and hyperpolarized [1-(13)C]glutamate. *Magn Reson Med*. juill 2011;66(1):18-23.
78. Cabella C, Karlsson M, Canapè C, Catanzaro G, Colombo Serra S, Miragoli L, et al. In vivo and in vitro liver cancer metabolism observed with hyperpolarized [5-(13)C]glutamine. *J Magn Reson San Diego Calif* 1997. juill 2013;232:45-52.
79. Collet S, Valable S, Constans JM, Lechapt-Zalcman E, Roussel S, Delcroix N, et al. [(18)F]-fluoro-L-thymidine PET and advanced MRI for preoperative grading of gliomas. *NeuroImage Clin*. 2015;8:448-54.
80. Chen W, Delaloye S, Silverman DHS, Geist C, Czernin J, Sayre J, et al. Predicting treatment response of malignant gliomas to bevacizumab and irinotecan by imaging proliferation with [18F] fluorothymidine positron emission tomography: a pilot study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 oct 2007;25(30):4714-21.
81. Jacobs AH, Kracht LW, Gossmann A, Rügner MA, Thomas AV, Thiel A, et al. Imaging in neurooncology. *NeuroRx J Am Soc Exp Neurother*. avr 2005;2(2):333-47.
82. Grech-Sollars M, Ordidge KL, Vaqas B, Davies C, Vaja V, Honeyfield L, et al. Imaging and Tissue Biomarkers of Choline Metabolism in Diffuse Adult Glioma: 18F-Fluoromethylcholine PET/CT, Magnetic Resonance Spectroscopy, and Choline Kinase  $\alpha$ . *Cancers*. 7 déc 2019;11(12).
83. García Vicente AM, Pérez-Beteta J, Amo-Salas M, Pena Pardo FJ, Villena Martín M, Sandoval Valencia H, et al. 18F-Fluorocholine PET/CT in the Prediction of Molecular Subtypes and Prognosis for Gliomas. *Clin Nucl Med*. oct 2019;44(10):e548-58.
84. Tan H, Chen L, Guan Y, Lin X. Comparison of MRI, F-18 FDG, and 11C-choline PET/CT for their potentials in differentiating brain tumor recurrence from brain tumor necrosis following radiotherapy. *Clin Nucl Med*. nov 2011;36(11):978-81.
85. Toyonaga T, Hirata K, Yamaguchi S, Hatanaka KC, Yuzawa S, Manabe O, et al. (18)F-fluoromisonidazole positron emission tomography can predict pathological necrosis of brain tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. juill 2016;43(8):1469-76.
86. Altwaairgi AK, Raja S, Manzoor M, Aldandan S, Alsaeed E, Balbaid A, et al. Management and treatment recommendations for World Health Organization Grade III and IV gliomas. *Int J Health Sci*. sept 2017;11(3):54-62.

87. Stummer W, Reulen H-J, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn J-C, et al. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*. mars 2008;62(3):564-76; discussion 564-576.
88. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 10 mars 2005;352(10):987-96.
89. Wick W, Roth P, Hartmann C, Hau P, Nakamura M, Stockhammer F, et al. Long-term analysis of the NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with PCV or temozolomide. *Neuro-Oncol*. 2016;18(11):1529-37.
90. Seystahl K, Hentschel B, Loew S, Gramatzki D, Felsberg J, Herrlinger U, et al. Bevacizumab versus alkylating chemotherapy in recurrent glioblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 21 nov 2019;
91. Bailly C, Vidal A, Bonnemaire C, Kraeber-Bodéré F, Chérel M, Pallardy A, et al. Potential for Nuclear Medicine Therapy for Glioblastoma Treatment. *Front Pharmacol*. 2019;10:772.
92. Wang W-L, Aru N, Liu Z, Shen X, Ding Y-M, Wu S-J, et al. Prognosis of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with molecularly targeted drugs combined with radiotherapy vs temozolomide monotherapy: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. nov 2019;98(45):e17759.
93. Wick W, Platten M. Understanding and treating glioblastoma. In: *Neurologic Clinics*. 2018. (Elsevier).
94. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. 2017;14(2):284-97.
95. Nakamura JL, Karlsson A, Arvold ND, Gottschalk AR, Pieper RO, Stokoe D, et al. PKB/Akt mediates radiosensitization by the signaling inhibitor LY294002 in human malignant gliomas. *J Neurooncol*. févr 2005;71(3):215-22.
96. Karpel-Massler G, Nguyen TTT, Shang E, Siegelin MD. Novel IDH1-Targeted Glioma Therapies. *CNS Drugs*. déc 2019;33(12):1155-66.
97. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol*. 2017;18(6):e315-29.
98. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N Engl J Med*. 16 2017;376(11):1027-37.
99. Li L, Quang TS, Gracely EJ, Kim JH, Emrich JG, Yaeger TE, et al. A Phase II study of anti-epidermal growth factor receptor radioimmunotherapy in the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurosurg*. août 2010;113(2):192-8.
100. Reardon DA, Gokhale PC, Klein SR, Ligon KL, Rodig SJ, Ramkissoon SH, et al. Glioblastoma Eradication Following Immune Checkpoint Blockade in an Orthotopic, Immunocompetent Model. *Cancer Immunol Res*. févr 2016;4(2):124-35.

101. Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(10):1373-85.
102. Liu Z, Wang F, Chen X. Integrin targeted delivery of radiotherapeutics. *Theranostics.* 1 mars 2011;1:201-10.
103. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 18 nov 2004;432(7015):396-401.
104. Zhang P, Lathia JD, Flavahan WA, Rich JN, Mattson MP. Squelching glioblastoma stem cells by targeting REST for proteasomal degradation. *Trends Neurosci.* nov 2009;32(11):559-65.
105. Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, Nixon C, MacKay G, Mrowinska A, et al. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature.* 12 déc 2013;504(7479):296-300.
106. Kalhan SC, Hanson RW. Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino acid. *J Biol Chem.* 8 juin 2012;287(24):19786-91.
107. Armitage EG, Southam AD. Monitoring cancer prognosis, diagnosis and treatment efficacy using metabolomics and lipidomics. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* 2016;12:146.
108. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov.* 31 août 2011;10(9):671-84.
109. Veech RL, Lawson JW, Cornell NW, Krebs HA. Cytosolic phosphorylation potential. *J Biol Chem.* 25 juill 1979;254(14):6538-47.
110. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* janv 2008;7(1):11-20.
111. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol.* janv 1999;19(1):1-11.
112. Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol.* févr 2009;19(1):12-6.
113. Moussard C. Biochimie structurale et métabolique : cours. 3e éd. De Boeck; 2006.
114. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 24 févr 1956;123(3191):309-14.
115. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science.* 10 août 1956;124(3215):269-70.
116. San-Millán I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis.* 01 2017;38(2):119-33.
117. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer.* mai 2011;11(5):325-37.

118. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 22 mai 2009;324(5930):1029-33.
119. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 12 janv 2016;23(1):27-47.
120. Gentric G, Mieulet V, Mechta-Grigoriou F. Heterogeneity in Cancer Metabolism: New Concepts in an Old Field. *Antioxid Redox Signal*. 20 2017;26(9):462-85.
121. Frattini V, Pagnotta SM, Tala null, Fan JJ, Russo MV, Lee SB, et al. A metabolic function of FGFR3-TACC3 gene fusions in cancer. *Nature*. 11 2018;553(7687):222-7.
122. Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T, Cho S, Baek H, Yang X-L, et al. Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell Metab*. 6 juin 2012;15(6):827-37.
123. Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev*. 1 juin 2001;15(11):1406-18.
124. Wang Z, Jeon HY, Rigo F, Bennett CF, Krainer AR. Manipulation of PK-M mutually exclusive alternative splicing by antisense oligonucleotides. *Open Biol*. oct 2012;2(10):120133.
125. Eigenbrodt E, Reinacher M, Scheefers-Borchel U, Scheefers H, Friis R. Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Crit Rev Oncog*. 1992;3(1-2):91-115.
126. Dayton TL, Jacks T, Vander Heiden MG. PKM2, cancer metabolism, and the road ahead. *EMBO Rep*. 2016;17(12):1721-30.
127. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 déc 2007;104(49):19345-50.
128. Grassian AR, Metallo CM, Coloff JL, Stephanopoulos G, Brugge JS. Erk regulation of pyruvate dehydrogenase flux through PDK4 modulates cell proliferation. *Genes Dev*. 15 août 2011;25(16):1716-33.
129. Fogal V, Richardson AD, Karmali PP, Scheffler IE, Smith JW, Ruoslahti E. Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation. *Mol Cell Biol*. mars 2010;30(6):1303-18.
130. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*. 3 janv 2020;11(1):102.
131. Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab*. 27 janv 2010;7:7.
132. Intlekofer AM, Wang B, Liu H, Shah H, Carmona-Fontaine C, Rustenburg AS, et al. L-2-Hydroxyglutarate production arises from noncanonical enzyme function at acidic pH. *Nat Chem Biol*. 2017;13(5):494-500.

133. Nadtochiy SM, Schafer X, Fu D, Nehrke K, Munger J, Brookes PS. Acidic pH Is a Metabolic Switch for 2-Hydroxyglutarate Generation and Signaling. *J Biol Chem.* 16 2016;291(38):20188-97.
134. Bergström J, Fürst P, Norée LO, Vinnars E. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J Appl Physiol.* juin 1974;36(6):693-7.
135. Erickson JW, Cerione RA. Glutaminase: a hot spot for regulation of cancer cell metabolism? *Oncotarget.* déc 2010;1(8):734-40.
136. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene.* 21 janv 2010;29(3):313-24.
137. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang X-Y, Pfeiffer HK, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 déc 2008;105(48):18782-7.
138. Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* avr 2010;10(4):267-77.
139. Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol.* 2 juill 2007;178(1):93-105.
140. Gao P, Tchernyshyov I, Chang T-C, Lee Y-S, Kita K, Ochi T, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature.* 9 avr 2009;458(7239):762-5.
141. Curthoys NP, Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:133-59.
142. Kung H-N, Marks JR, Chi J-T. Glutamine synthetase is a genetic determinant of cell type-specific glutamine independence in breast epithelia. *PLoS Genet.* août 2011;7(8):e1002229.
143. Fan J, Kamphorst JJ, Mathew R, Chung MK, White E, Shlomi T, et al. Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Mol Syst Biol.* 3 déc 2013;9:712.
144. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 déc 2007;104(49):19345-50.
145. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 1 mai 2009;137(3):413-31.
146. Wang J-B, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, et al. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell.* 14 sept 2010;18(3):207-19.
147. Zhang J, Pavlova NN, Thompson CB. Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *EMBO J.* 15 2017;36(10):1302-15.

148. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci.* août 2010;35(8):427-33.
149. Daye D, Wellen KE. Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol.* juin 2012;23(4):362-9.
150. Garcia-Bermudez J, Baudrier L, La K, Zhu XG, Fidelin J, Sviderskiy VO, et al. Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):775-81.
151. Altman BJ, Stine ZE, Dang CV. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(11):749.
152. Liu W, Le A, Hancock C, Lane AN, Dang CV, Fan TW-M, et al. Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 juin 2012;109(23):8983-8.
153. Richards NG, Schuster SM. Mechanistic issues in asparagine synthetase catalysis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1998;72:145-98.
154. Wellen KE, Lu C, Mancuso A, Lemons JMS, Ryczko M, Dennis JW, et al. The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes Dev.* 15 déc 2010;24(24):2784-99.
155. Gaglio D, Metallo CM, Gameiro PA, Hiller K, Danna LS, Balestrieri C, et al. Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Mol Syst Biol.* 16 août 2011;7:523.
156. Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature.* 20 nov 2011;481(7381):380-4.
157. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, et al. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell.* oct 2005;8(4):311-21.
158. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase (FASN) as a therapeutic target in breast cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2017;21(11):1001-16.
159. Lin H-P, Cheng Z-L, He R-Y, Song L, Tian M-X, Zhou L-S, et al. Destabilization of Fatty Acid Synthase by Acetylation Inhibits De Novo Lipogenesis and Tumor Cell Growth. *Cancer Res.* 01 2016;76(23):6924-36.
160. Vazquez A, Kamphorst JJ, Markert EK, Schug ZT, Tardito S, Gottlieb E. Cancer metabolism at a glance. *J Cell Sci.* 15 2016;129(18):3367-73.
161. Tong X, Zhao F, Thompson CB. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr Opin Genet Dev.* févr 2009;19(1):32-7.
162. Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *J Cell Biol.* 02 2018;217(7):2291-8.

163. Riganti C, Gazzano E, Polimeni M, Aldieri E, Ghigo D. The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radic Biol Med.* 1 août 2012;53(3):421-36.
164. Wang D-W, Wu L, Cao Y, Yang L, Liu W, E X-Q, et al. A novel mechanism of mTORC1-mediated serine/glycine metabolism in osteosarcoma development. *Cell Signal.* 2017;29:107-14.
165. Geck RC, Toker A. Nonessential amino acid metabolism in breast cancer. *Adv Biol Regul.* 2016;62:11-7.
166. Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, Agostini M, Melino G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci.* avr 2014;39(4):191-8.
167. Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol.* juill 2011;43(7):969-80.
168. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell.* 6 févr 2009;136(3):521-34.
169. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 18 févr 1972;175(4023):720-31.
170. Ishidate K. Choline/ethanolamine kinase from mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta.* 4 sept 1997;1348(1-2):70-8.
171. Ramírez de Molina A, Rodríguez-González A, Gutiérrez R, Martínez-Piñero L, Sánchez J, Bonilla F, et al. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* 23 août 2002;296(3):580-3.
172. Cheng M, Bhujwalla ZM, Glunde K. Targeting Phospholipid Metabolism in Cancer. *Front Oncol.* 2016;6:266.
173. Podo F. Tumour phospholipid metabolism. *NMR Biomed.* nov 1999;12(7):413-39.
174. Glunde K, Bhujwalla ZM, Ronen SM. Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer.* 17 nov 2011;11(12):835-48.
175. Azzi S, Gavard J. [Blood vessels in cancer: can't stop whispering]. *Med Sci MS.* avr 2014;30(4):408-14.
176. Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol.* nov 2006;8(11):1223-34.
177. Turpin A, Sharif A, Stoven L, Blond S, Maurage C-A, Le Rhun É. [The stem cell niche in glioblastoma: from fundamental aspects to targeted therapies]. *Bull Cancer (Paris).* janv 2015;102(1):24-33.
178. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 25 mai 2006;441(7092):437-43.
179. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer.* 15 déc 2011;12(1):9-22.

180. Eales KL, Hollinshead KER, Tennant DA. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis*. 25 janv 2016;5:e190.
181. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. févr 2010;20(1):51-6.
182. Hasmim M, Messai Y, Noman MZ, Chouaib S. [Tumor hypoxia: a key player in the regulation of stromal and anti-tumor responses]. *Med Sci MS*. avr 2014;30(4):422-8.
183. Womeldorff M, Gillespie D, Jensen RL. Hypoxia-inducible factor-1 and associated upstream and downstream proteins in the pathophysiology and management of glioblastoma. *Neurosurg Focus*. déc 2014;37(6):E8.
184. Fujiwara S, Nakagawa K, Harada H, Nagato S, Furukawa K, Teraoka M, et al. Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas. *Int J Oncol*. avr 2007;30(4):793-802.
185. Jensen RL. Hypoxia in the tumorigenesis of gliomas and as a potential target for therapeutic measures. *Neurosurg Focus*. 15 avr 2006;20(4):E24.
186. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*. juin 2006;9(6):425-34.
187. Xie H, Hanai J-I, Ren J-G, Kats L, Burgess K, Bhargava P, et al. Targeting lactate dehydrogenase--a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. *Cell Metab*. 6 mai 2014;19(5):795-809.
188. Patra KC, Wang Q, Bhaskar PT, Miller L, Wang Z, Wheaton W, et al. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell*. 12 août 2013;24(2):213-28.
189. Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*. 18 août 2011;476(7360):346-50.
190. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. 4 juin 2005;330(7503):1304-5.
191. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, et al. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *eLife*. 13 mai 2014;3:e02242.
192. Griss T, Vincent EE, Egnatchik R, Chen J, Ma EH, Faubert B, et al. Metformin Antagonizes Cancer Cell Proliferation by Suppressing Mitochondrial-Dependent Biosynthesis. *PLoS Biol*. déc 2015;13(12):e1002309.
193. Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, Bayraktar EC, Thiru P, Yucel B, et al. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature*. 3 avr 2014;508(7494):108-12.

194. Shroff EH, Eberlin LS, Dang VM, Gouw AM, Gabay M, Adam SJ, et al. MYC oncogene overexpression drives renal cell carcinoma in a mouse model through glutamine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 mai 2015;112(21):6539-44.
195. Comerford SA, Huang Z, Du X, Wang Y, Cai L, Witkiewicz AK, et al. Acetate dependence of tumors. *Cell*. 18 déc 2014;159(7):1591-602.
196. Mashimo T, Pichumani K, Vemireddy V, Hatanpaa KJ, Singh DK, Sirasanagandla S, et al. Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases. *Cell*. 18 déc 2014;159(7):1603-14.
197. Ma Y, Chapman J, Levine M, Polireddy K, Drisko J, Chen Q. High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. *Sci Transl Med*. 5 févr 2014;6(222):222ra18.
198. Dreyer C, Raymond E, Faivre S. PI3K / AKT / mTOR signalling pathway. *Cancéro dig*. 2009;1(3):187-9.
199. Cordier-Bussat M, Thibert C, Sujobert P, Genestier L, Fontaine É, Billaud M. [Even the Warburg effect can be oxidized: metabolic cooperation and tumor development]. *Med Sci MS*. sept 2018;34(8-9):701-8.
200. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MNC, Nakano K, Bartrons R, et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*. 14 juill 2006;126(1):107-20.
201. Battini S, Imperiale A, Taïeb D, Elbayed K, Cicek AE, Sebag F, et al. High-resolution magic angle spinning (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy metabolomics of hyperfunctioning parathyroid glands. *Surgery*. août 2016;160(2):384-94.
202. Imperiale A, Elbayed K, Moussallieh F-M, Reix N, Piotto M, Bellocq J-P, et al. Metabolomic profile of the adrenal gland: from physiology to pathological conditions. *Endocr Relat Cancer*. oct 2013;20(5):705-16.
203. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 17 juin 2010;465(7300):966.
204. Imperiale A, Moussallieh F-M, Sebag F, Brunaud L, Barlier A, Elbayed K, et al. A new specific succinate-glutamate metabolomic hallmark in SDHx-related paragangliomas. *PloS One*. 2013;8(11):e80539.
205. Fan TWM, Lane AN, Higashi RM, Farag MA, Gao H, Bousamra M, et al. Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by (13)C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Mol Cancer*. 26 juin 2009;8:41.
206. Hensley CT, Faubert B, Yuan Q, Lev-Cohain N, Jin E, Kim J, et al. Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. *Cell*. 11 févr 2016;164(4):681-94.
207. Fan TW-M, Lane AN. Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. févr 2016;92-93:18-53.
208. Martínez-Bisbal MC, Esteve V, Martínez-Granados B, Celda B. Magnetic resonance microscopy contribution to interpret high-resolution magic angle spinning metabolomic data of human tumor tissue. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011.

209. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* janv 2013;41(Database issue):D801-807.
210. Ruhland E, Bund C, Outilaft H, Piotta M, Namer I-J. A metabolic database for biomedical studies of biopsy specimens by high-resolution magic angle spinning nuclear MR: a qualitative and quantitative tool. *Magn Reson Med.* juill 2019;82(1):62-83.
211. Canlet, Shintu, Elena-Herrmann. La métabolomique par RMN et ses applications en biologie végétale, toxicologie et médecine. août 2012;59-68.
212. R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. [Internet]. ISBN 3-900051-07-0; 2008. Disponible sur: <http://www.R-project.org>
213. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 1 janv 2000;28(1):27-30.
214. Salway J.G. *Metabolism at a glance*. 3rd edition Blackwell Publishing, Malden (MI). 2014.
215. Cicek AE, Bederman I, Henderson L, Drumm ML, Ozsoyoglu G. ADEMA: an algorithm to determine expected metabolite level alterations using mutual information. *PLoS Comput Biol.* 2013;9(1):e1002859.
216. Nguyen A, Legrain M, Noel G, Coca A, Meyer Ea N, Schott R, et al. An Innovative Fluorescent Semi-quantitative Methylation-specific PCR Method for the Determination of MGMT Promoter Methylation is Reflecting Intra-tumor Heterogeneity. *Curr Cancer Drug Targets.* 2015;15(7):624-40.
217. Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol.* mars 1992;12(3):954-61.
218. Franck J, Arafah K, Elayed M, Bonnel D, Vergara D, Jacquet A, et al. MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics MCP.* sept 2009;8(9):2023-33.

## **7. ANNEXES**



## An integrated genomic and metabolomic approach for defining survival time in adult oligodendrogliomas patients

Caroline Bund<sup>1,2</sup> · Mariana Guergova-Kuras<sup>3</sup> · A. Ercument Cicek<sup>4,5</sup> · François-Marie Moussalieh<sup>1</sup> · Nassim Dali-Youcef<sup>6,7</sup> · Martial Piotto<sup>8</sup> · Pilar Schneider<sup>3</sup> · Rémy Heller<sup>9</sup> · Natacha Entz-Werle<sup>10</sup> · Benoît Lhermitte<sup>11</sup> · Marie-Pierre Chenard<sup>11</sup> · Roland Schott<sup>12</sup> · François Proust<sup>13</sup> · Georges Noël<sup>14</sup> · Izzie Jacques Namer<sup>1,2,15</sup>

Received: 15 October 2018 / Accepted: 1 April 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

### Abstract

**Introduction** The identification of frequent acquired mutations shows that patients with oligodendrogliomas have divergent biology with differing prognoses regardless of histological classification. A better understanding of molecular features as well as their metabolic pathways is essential.

**Objectives** The aim of this study was to examine the relationship between the tumor metabolome, six genomic aberrations (isocitrate dehydrogenase I [IDH1] mutation, 1p/19q codeletion, tumor protein p53 [TP53] mutation, O<sup>6</sup>-methylguanin-DNA methyltransferase [MGMT] promoter methylation, epidermal growth factor receptor [EGFR] amplification, phosphate and tensin homolog [PTEN] methylation), and the patients' survival time.

**Methods** We applied <sup>1</sup>H high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to 72 resected oligodendrogliomas.

**Results** The presence of IDH1, TP53, 1p19q codeletion, MGMT promoter methylation reduced the relative risk of death, whereas PTEN methylation and EGFR amplification were associated with poor prognosis. Increased concentration of 2-hydroxyglutarate (2HG), N-acetyl-aspartate (NAA), myo-inositol and the glycerophosphocholine/phosphocholine (GPC/PC) ratio were good prognostic factors. Increasing the concentration of serine, glycine, glutamate and alanine led to an increased relative risk of death.

**Conclusion** HRMAS NMR spectroscopy provides accurate information on the metabolomics of oligodendrogliomas, making it possible to find new biomarkers indicative of survival. It enables rapid characterization of intact tissue and could be used as an intraoperative method.

**Keywords** HRMAS-NMR spectroscopy · Metabolomics · Oligodendroglioma · Overall survival · IDH · PTEN

### 1 Introduction

Oligodendrogliomas, divided into low-grade (grade II) and high-grade (grade III) (Louis et al. 2007), are one of the most difficult therapeutic challenges in neurosurgery and neuro-oncology, because of their sensitivity to radio- and chemotherapy, which improve survival in some subtypes. These tumors are frequently diagnosed after convulsive

seizures, although the patients remain asymptomatic, often for several years even if the tumor continues to progress slowly. However, after this period of lull, the tumor inevitably turns to aggressive growth. In contrast to this classical evolution, in clinical practice, it is not unusual to observe that some low-grade cases present a poor prognosis with rapid malignant transformation and conversely that some high-grade cases survive beyond 10 years. Although EORTC trial showed the radiotherapy can delay the low-grade tumor progression, this trial failed to demonstrate an overall survival improvement. Consequently, in lack of progression, and in absence of aggressive tumor feature, radiotherapy is often postponed at progression time. Recently a new trial has been open to inclusions for the patients with high-grade oligodendrogliomas to compare chemotherapy with PCV and

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11306-019-1522-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Caroline Bund  
Caroline.BUND@chru-strasbourg.fr

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 29 April 2019

Springer

immediate radiotherapy and the same chemotherapy with a radiotherapy delayed at progression time. Furthermore, early treatment could expose asymptomatic patients to functional risks. So, the choice and the time of the therapeutic intervention are a real issue and obviously are linked to the expected survival.

Over the last few years, the identification of frequent acquired mutations shows that patients with oligodendrogliomas have divergent biology with differing prognoses. Consequently, since 2016, molecular characteristics are included in the WHO classification (Louis et al. 2016) (Banan and Hartmann 2017), including two new entities: IDH-mutant and 1p19q codeleted oligodendrogliomas and anaplastic oligodendrogliomas, IDH-mutant and 1p/19q codeleted. These molecular features provide prognostic and/or predictive data, which make it crucial for treatment choice because of their relation to survival (Chen et al. 2015) (Wirsching and Weller 2016). Other genetic mutations are being studied in clinical routine, but their impact is not well understood. A better understanding of molecular features as well as their metabolic pathways is essential.

Metabolomics is a technique that has been maturing over the past few years, making it possible to relate genotype and phenotype, providing a better understanding of tumor metabolism by measuring the metabolite concentration impacted by down- or up-regulation of a specific gene transcript (Griffin and Shoccor 2004) (Mörén et al. 2015). HRMAS NMR spectroscopy enables identification and quantification of metabolites in intact tissue samples with excellent resolution (Battini et al. 2016) and can be used in clinical routine (samples are quickly transported by a pneumatic tube system in our hospital).

The aim of this study was to examine the relationship between the tumor metabolome, six genomic aberrations (IDH1 mutation, 1p/19q codeletion, TP53 mutation, MGMT promoter methylation, EGFR amplification, PTEN methylation), and the survival time of patients.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Patient population

Between February 2002 and December 2016, 72 patients with an oligodendroglioma, 23 grade II and 49 grade III (WHO 2007), were included. WHO 2016 classification is also provided taking into account molecular biology. Thus, we included 19 low-grade- WHO 2016 and 53 high grade—WHO 2016. All of them underwent surgical subtotal resection followed by temozolomide adjuvant chemotherapy. Only high-grade (according to WHO 2007) oligodendroglioma patients underwent brain radiotherapy. One patient was excluded from survival analysis, because of

a multimetastatic bronchial cancer development leading to death 3 years after the diagnosis of oligodendroglioma grade II. All patients gave their written informed consent. The local Ethics Committee approved the study.

### 2.2 HRMAS NMR analysis

#### 2.2.1 Sample preparation

Tissue specimens were collected with minimum ischemic delays after resection (average time  $2 \pm 1$  min) and snap-frozen in liquid nitrogen before being stored at  $-80$  °C. Each brain biopsy sample was prepared at  $-20$  °C by introducing approximately 18 mg biopsy into a disposable Kelf insert.

#### 2.2.2 HRMAS NMR data acquisition

All HRMAS NMR spectra were acquired on a Bruker (Karlsruhe, Germany) Avance III 500 spectrometer (installed in our University Hospital) operating at a proton frequency of 500.13 MHz. The temperature was maintained at 4 °C throughout the acquisition time. A one-dimensional (1D) proton spectrum using a Carr–Purcell–Meiboom–Gill pulse sequence was acquired with a 285- $\mu$ s inter-pulse delay and a 10-min acquisition time for each tissue sample. The number of loops was set at 328, giving the CPMG pulse train a total length of 93 ms. The chemical shift was calibrated to the peak of the methyl proton of L-lactate at 1.33 ppm. To confirm resonance assignments in a few representative samples, two-dimensional (2D)  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  experiments were also recorded. Metabolites were assigned using standard metabolite chemical shift tables (Wishart et al. 2013).

#### 2.2.3 HRMAS NMR data processing

The region between 4.50 and 0.70 ppm of each 1D HRMAS NMR spectrum was automatically bucketed into integral regions of 0.01 ppm, using AMIX 3.9.14 software (Bruker).

The metabolites were quantified using the PULCON method, a very accurate quantification method (Dreier and Wider 2006; Imperiale et al. 2013). Twenty-eight metabolites were quantified using an external reference standard of lactate (3  $\mu$ mol) scanned under the same analytical conditions as the tissue samples. The spectra were normalized according to sample weight. Peaks of interest were automatically defined using an in-house program under MATLAB 7.0 (MathWorks, Natick, MA, USA). The peak integration for each metabolite was then compared to the peak integration of the lactate reference and corrected according to the number of protons. The results are expressed in  $\text{nmol mg}^{-1}$  of tissue.

### 2.2.4 Histopathology

After NMR HRMAS analysis, the inserts were cut, and for half the content of each sample, the percentage of tumor cells in the total sample of cells with regard to the total surface were calculated based on frozen hematoxylin & eosin-stained sections.

### 2.2.5 Biomolecular analysis (detailed in supplemental digital content)

Genetic analysis of *IDH1* mutation status was determined on genomic DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue from the other half of the content of inserts. For the other genetic analyses, the mirror sample of the insert material was used.

MGMT promoter methylation was also studied with a fluorescent semi-quantitative methylation-specific PCR (FSQ-MS-PCR) developed in-house (Nguyen et al. 2015). Genomic alterations of the other genes (*IDH1*, *1p19q*, *TP53*, *EGFR* and *PTEN*) were assessed using PCR by means of allelotyping of microsatellites located in or flanking each of the different genes or chromosomal regions studied.

Genomic DNA was isolated using the usual techniques with the QIAamp<sup>®</sup> DNA purification kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). A Nanodrop<sup>®</sup> (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA) spectrophotometer was used to assess the DNA quality and quantification. The genomic DNA concentrations from tumor or blood paired samples ranged from 50 to 400 ng/ $\mu$ L and from 50 to 150 ng/ $\mu$ L, respectively.

### 2.3 Statistical analysis

The normality of the distribution of the metabolite results was estimated using the Wilks-Shapiro test. The differences between two independent groups were estimated using the Mann-Whitney U-test. The differences between more than two groups were assessed using the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance test. The correlation between continuous variables was assessed using the Spearman R calculation, a nonparametric comparison based on the ranks of the observations, rather than on the values themselves ("Hmisc" package). The association between mutations was evaluated using the Chi square statistics on the contingency tables generated for each pair of genes.

Survival analysis between groups of patients was performed using the Kaplan-Maier method and significance was estimated based on the log-rank test. Single markers as well as combining metabolites and genetic markers were assessed using the Cox proportional hazards model and the

significance level was set as 0.05 using the likelihood ratio test.

All statistical analyses were performed with the statistical software R (R Development Core Team 2008) ([www.cran.r-project.org](http://www.cran.r-project.org)). To uncover all significant associations between the genetic context of a tumor and the steady-state level of the metabolites, we performed association rules based on data-mining (Hastie et al. 2009). Association rules between metabolites and genetic markers were extracted from a binarized data set, where the presence of mutation in a patient's tumor was labeled 1 and the concentration levels of each metabolite were discretized in two bin1998s applying different thresholds. The association rules were generated using KEM<sup>®</sup> software (Jullian and Afshar 2008) (Liquiere and Sallantin 1998) and filtered using the four usual interestingness metrics: support, confidence, lift and *p* value (Lallich et al. 2006).

### 2.4 Network analysis

The algorithm to determine expected metabolite level alterations (ADEMA) network analyses using mutual information were applied to the metabolite quantification values (Cicek et al. 2013). The network was constructed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kanehisa and Goto 2000; Minoru Kanehisa et al. 2014) and Salway's work (Salway 2014). The ADEMA algorithm evaluates the change in groups of metabolites between concentration data from two experimental groups instead of analyzing metabolite concentrations one by one. Based on mutual information, the algorithm determines whether some metabolites are biomarkers when considered together, and it can predict the direction of the expected change per metabolite depending on the metabolic network topology considered. Various groups of metabolites related to the metabolic pathways involved were compared:

- Taurine, hypotaurine, aspartate, serine, methionine
- Aspartate, asparagine, acetate, threonine, NAA
- Aspartate, threonine, isoleucine
- Glucose, serine, glycine
- Glucose, valine
- Glucose, isoleucine
- Glucose, acetate
- Glucose, lactate
- Valine, lactate, alanine
- Glucose, myo-inositol, ascorbate, glutathione, glycine, glutamate
- Glutamate, histidine, glutamine, 2HG
- Aspartate, succinate, fumarate, 2HG
- Glutamate, histidine, glutamine, glycine
- Glutamate, glycine, creatine
- Choline, GPC, PC, total choline

### 3 Results

All statistical analysis was done on all oligodendrogliomas: 72 tissue samples for studying the relationship between genetic mutations and metabolomics and 71 for survival analysis without taking into account the histopathological grading of oligodendrogliomas. According to WHO 2016 classification, 19 low-grade and 53 high-grade were included.

For all patients, we measured the concentration of 28 metabolites and also used the ratio between glycerophosphocholine and phosphocholine (GPC/PC) and total choline (choline + GPC + PC) as additional parameters in the statistical analyses.

Figure 1 shows the Kaplan–Meier survival curves according to WHO 2007 (Fig. 1a) and WHO 2016 (Fig. 1b).

#### 3.1 Impact of genetic mutations on tumor metabolomics

The presence of IDH1 mutation (Fig. 2a) was associated with an elevated concentration for glucose, myo-inositol, GPC, histidine, creatine and 2HG and a low concentration for lactate, serine, glycine, alanine, isoleucine, threonine, aspartate, acetate, methionine, hypotaurine, PC, choline, GSH and glutamate. The accumulation of 2HG, as measured using HRMAS, was strongly dependent on the presence of the IDH1 mutation ( $p = 1.8 \times 10^{-7}$ ). In the absence of the IDH1 mutation, the level of 2HG was on the order of  $0.42 \pm 0.71$  nmol/mg, with only three tumors showing levels higher than 1 nmol/mg, whereas in the presence of the IDH1 mutation, the average level of accumulated 2HG in the tissue was found to be more than 2.5 times higher ( $1.05 \pm 1.0$  nmol/mg).

The 1p19q codeletion was associated with elevated concentrations of glucose, myo-inositol, ascorbate, valine, isoleucine, asparagine, GPC, PC, choline, taurine, histidine, glutamate, glutamine, 2HG and creatine. Alanine, aspartate and acetate were inversely correlated to the presence of this codeletion.

The presence of MGMT was associated with elevated concentrations of GPC, PC, asparagine, acetate, ascorbate, histidine and 2HG and low levels of glucose, aspartate, glutamate, alanine and hypotaurine.

Glucose and threonine concentrations were elevated for TP53-mutated oligodendrogliomas, and lactate, isoleucine, asparagine, aspartate, fumarate, methionine, GPC, PC, choline, serine, histidine, glutamate, glutamine and creatine had low rates.

The presence of a PTEN mutation (Fig. 2b) was associated with a rise in alanine, lactate, isoleucine, threonine,

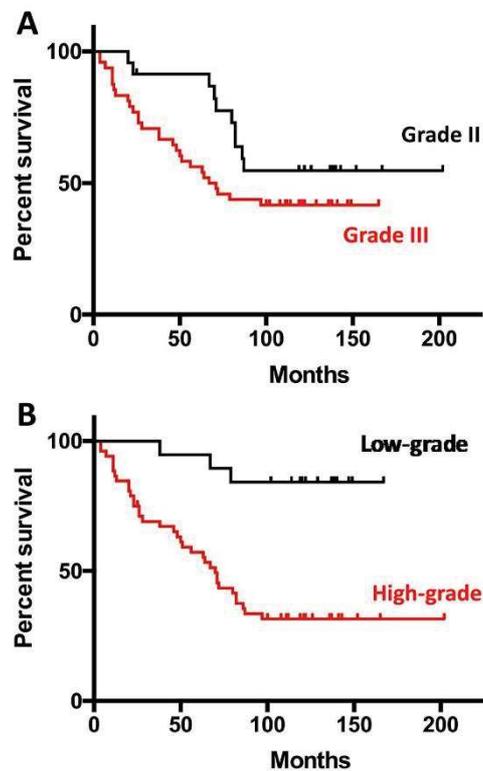


Fig. 1 Kaplan–Meier survival curves according to WHO 2007 (a) and WHO 2016 (b) classifications: low-grade oligodendrogliomas in black lines and high-grade oligodendrogliomas in red lines

aspartate, methionine, fumarate, PC, choline, serine, hypotaurine, glycine, GSH and glutamate and a decrease in acetate, NAA, glucose, myo-inositol and creatine and a reduction in glucose, myo-inositol, creatine, acetate and NAA.

The presence of EGFR was associated with a high concentration for alanine, serine, glycine, lactate, threonine, aspartate, methionine, fumarate, choline, hypotaurine, GSH, glutamate and glutamine and a low concentration for 2HG, creatine, GPC, NAA, glucose and myo-inositol.

#### 3.2 Relationship between genetic mutations and overall survival

In Fig. 3, Kaplan–Meier survival curves show the relationship between genetic mutations and overall survival. 28 out of the 71 patients died during the follow-up period (mean,

66 ± 34 months; range, 1–125 months). In the univariate survival analysis, all six genetic markers measured on the samples were found as significant prognostic predictors. Presence of a mutation on EGFR and PTEN, which were strongly associated (Chi square test of  $p = 1.4 \times 10^{-10}$ ), increased the relative risk (RR) (2.675 and 3.078, respectively) of the patients dying. Inversely, the presence of a mutation on IDH1, TP53, 1p/19q codeletion and MGMT methylation reduced the relative risk for the patients (RR = 0.316,  $p < 0.0001$ ; RR = 0.902,  $p = 0.406$ , RR = 0.457,  $p = 0.0045$ ; RR = 0.574,  $p = 0.0003$  respectively). In this patient set we found that the presence of the EGFR mutation is strongly anti-correlated to the presence of the IDH1 mutation ( $p = 8.9 \times 10^{-8}$ ). The IDH1 mutation also frequently co-occurred with MGMT methylation ( $p = 0.0008$ ), TP53 mutation ( $p = 0.005$ ) and 1p/19q codeletion ( $p = 0.03$ ).

### 3.3 Relationship between metabolomics and overall survival

When using the measured concentration of the metabolites as independent continuous variables in the Cox proportional hazards model, 11 out of the 30 metabolite parameters measured were found to be significant prognostic predictors. For eight of them (GPC/PC, 2HG, Myo-inositol, NAA, Glycine, Glutamate, Alanine, Serine) the concentrations measured allowed a precise estimate of the relative risks (RR) to be calculated. We also compared patient survival by establishing thresholds (in nmol/mg) for the concentrations of each metabolite (Table 1). Increased concentration of 2HG ( $> 0.3$  nmol/mg, RR = 0.396,  $p < 0.0001$ ), myo-inositol ( $> 3.12$  nmol/mg, RR = 0.415,  $p = 0.0016$ ), NAA ( $> 1.35$  nmol/mg, RR = 0.438,  $p = 0.101$ ) and the GPC/PC ratio ( $> 0.42$  nmol/mg, RR = 0.388,  $p < 0.0001$ ) were good significant prognostic factors. In contrast, increasing the concentration of serine ( $> 0.55$  nmol/mg, RR = 2.242,  $p < 0.0001$ ), glycine ( $> 1.36$  nmol/mg, RR = 1.788,  $p = 0.0097$ ), glutamate ( $> 1.48$  nmol/mg, RR = 1.991,  $p = 0.0007$ ) and alanine ( $> 0.52$  nmol/mg, RR = 2.044,  $p = 0.0001$ ) led to an increased relative risk of death for patients. When using binary values for the metabolites, we obtained the Kaplan–Meier survival curves shown in Fig. 4.

### 3.4 Relationship between genomics, metabolomics and overall survival

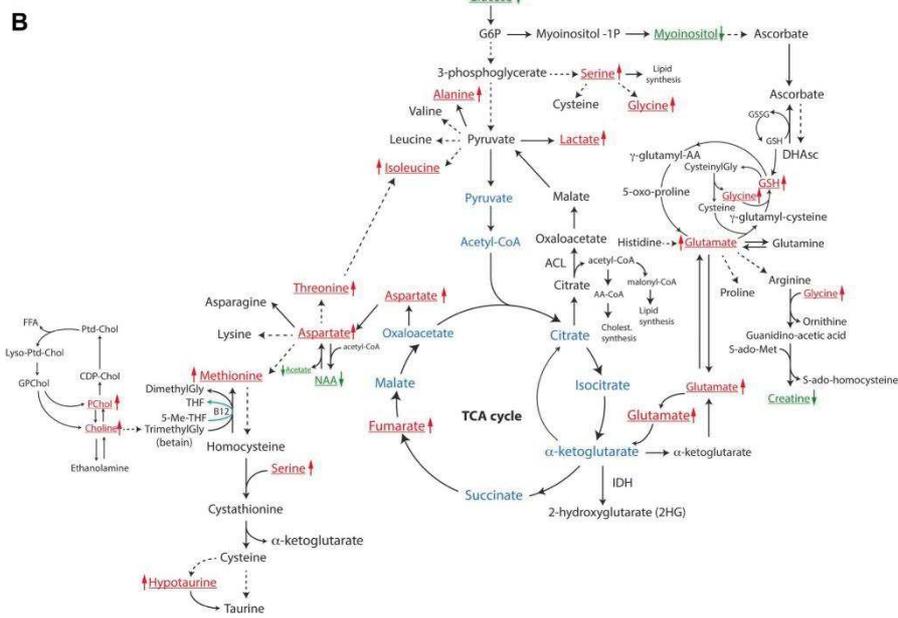
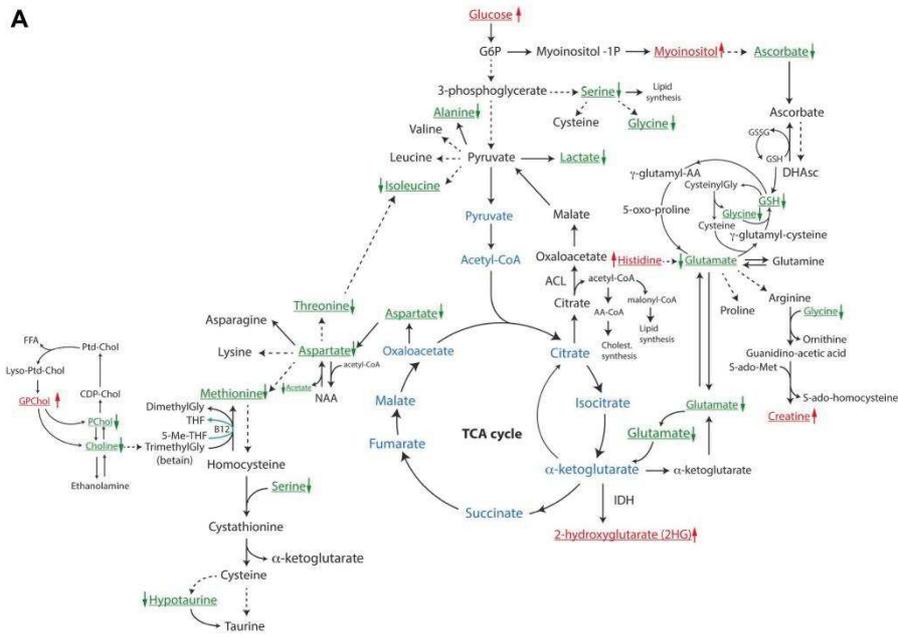
To summarize the associations between tumor genetic background and the metabolite levels in the tumor tissues, we performed unsupervised data mining using association rules in the entire data set and graphically represented the rules obtained as two networks linked to the overall survival (Fig. 5).

## 4 Discussion

The high demand of proliferating cells from catabolites in order to meet the increased demand of bioenergetics, maintain homeostasis and generate biomass, produces increased consumption and alterations on the metabolism of two major nutrients, glucose and glutamine. These complex metabolic changes occur as a function of the tumor oncogenotype and the microenvironment in different tissues. The main objective of the present study was to evaluate the relationship between different genetic mutations, tumor metabolism and patient outcome in oligodendrogliomas in order to find potential metabolic biomarkers to malignancy. In fact, adding biomolecular information led to a better classification of oligodendrogliomas, which is why biomolecular features are now used in WHO 2016 classification (Louis et al. 2016). It allows a better correlation with survival. Moreover, the metabolic classification seems to provide a closer correlation with the patient evolution than the histopathological analysis (Erb et al. 2008).

In agreement with the literature (Wang et al. 2014; Kong et al. 2015; Ducray et al. 2011; Zou et al. 2013; Cairncross et al. 1998; Smith et al. 2000; Karayan-Tapon et al. 2010; Sanson et al. 2009) the results presented in this study demonstrate that the presence of a mutation on IDH1, TP53, 1p19q codeletion and MGMT methylation slow down cellular metabolism and increase overall survival, particularly with IDH1, which presents a relative risk of 0.316. Since the first report of Parsons et al. (2008), many studies demonstrated that IDH mutations facilitate reduction of  $\alpha$ -ketoglutarate to 2HG, reduce nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, which is necessary for regeneration of reduced glutathione (Ducray et al. 2011; Dang et al. 2009; Cairns and Mak 2013) and generate competitive inhibition for enzymes that regulate DNA methylation and histone demethylations (Siegal 2015). This novel enzymatic activity with overproduction of 2HG does not participate in any known productive metabolic pathway, but does not seem to be an epiphenomena (Koivunen et al. 2012; Losman et al. 2013) and alters cellular genetic and epigenetic programs. The 2HG is involved in oncogenesis through the hypoxia inducible factor 1- $\alpha$  (HIF1- $\alpha$ ) in gliomas and sensitizes tumor cells to chemotherapy, increasing cellular oxidative stress (Wang et al. 2014; Dang et al. 2009; Molenaar et al. 2014). The results reported herein demonstrated several metabolic markers predictive of overall survival and in relation with IDH1 status. The most important are 2HG, GPC, myo-inositol, threonine, alanine, methionine, acetate and glutamate.

Inversely, PTEN and EGFR mutations were associated with up cellular metabolism (glycolysis, lactic acid fermentation, amino acid metabolism, lipid metabolism) and



**Fig. 2 a** Association of the level of metabolite accumulation in oligodendroglioma tumors and the presence of the IDH1 mutation. The metabolites underlined and written in *red* and *green* with an arrows for each one, respectively, indicate the metabolites that are predicted to increase and decrease in oligodendrogliomas, in presence of the IDH1 mutation. The metabolites in blue are present in the mitochondria. **b** Association of the level of metabolite accumulation in oligodendroglioma tumors and the presence of the PTEN mutation. The metabolites underlined and written in *red* and *green* with an arrows for each one, respectively, indicate the metabolites that are predicted to increase and decrease in oligodendrogliomas in presence of the PTEN mutation. The metabolites in blue are present in the mitochondria

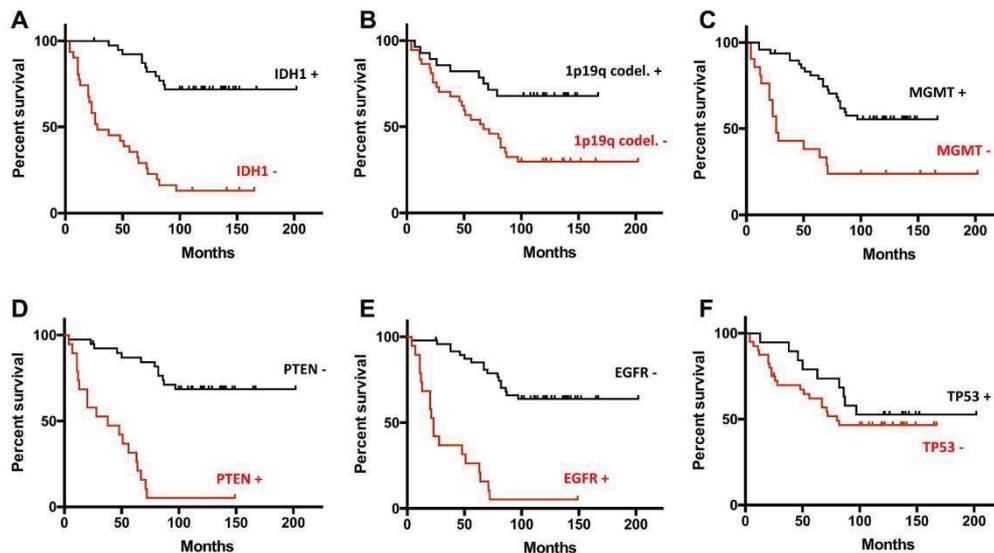
a poor prognosis: increasing the relative risk for death to 3.078 and 2.675, respectively, in accordance with previous reports for the association of these two genes with an adverse prognosis in multiple cancers (de Muga et al. 2010) and gliomas (Altieri et al. 2014; Han et al. 2016). The loss of PTEN function leads to the activation of the AKT/PKB signaling pathway and the activation of HIF1- $\alpha$ , thereby promoting tumor cell growth, survival, migration and neoangiogenesis (Yamada and Araki 2001; Jiang and Liu 2008).

In the present study, we observed that several metabolic markers were in relation with IDH and/or PTEN status (Fig. 5). Among them, six metabolic markers are closely related to overall survival: 2HG, alanine, myo-inositol, glycine, glutamate and the GPC/PC ratio (Fig. 4). The relation

**Table 1** Univariate survival analysis using genomics markers as binary variables and metabolites concentrations as continuous variables

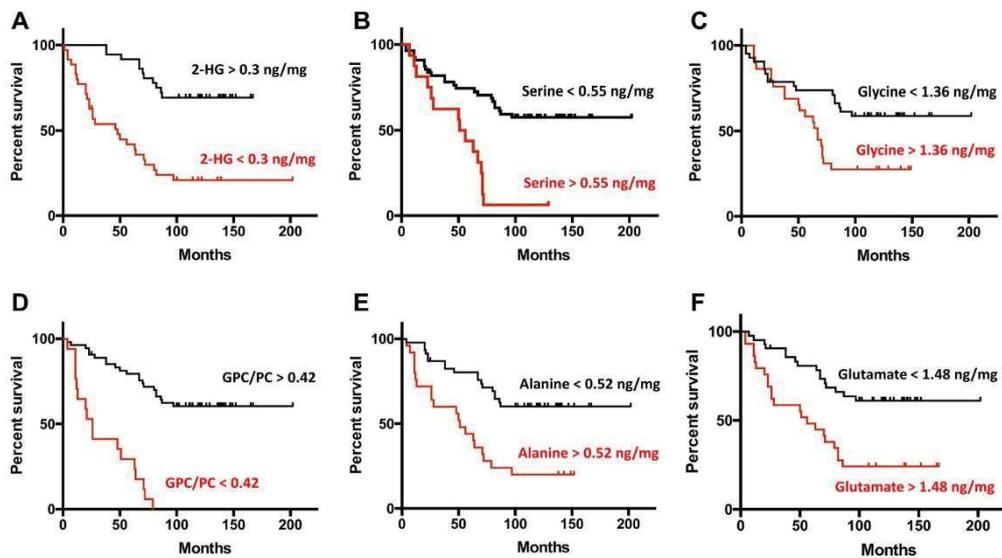
Parameter	Status	Relative risk	95% CI	P-value
IDH1	+	0.316	0.05–0.3	<0.0001
1p19q	+	0.457	0.15–0.92	0.0045
MGMT	+	0.574	0.11–0.53	0.0003
TP53	+	0.902	0.08–0.97	0.406
EGFR	+	2.675	3.49–18.64	<0.0001
PTEN	+	3.078	3.51–22.98	<0.0001
Threshold in nmol/mg				
GPC/PC	>0.42	0.388	0.027–0.22	<0.0001
2HG	>0.3	0.396	0.23–0.97	<0.0001
Myo-inositol	>3.12	0.415	0.554–0.92	0.0016
NAA	>1.35	0.438	0.245–1.03	0.101
Glycine	>1.36	1.788	1.021–1.24	0.0097
Glutamate	>1.48	1.991	1.1–1.953	0.0007
Alanine	>0.52	2.044	1.5–3.26	0.0001
Serine	>0.55	2.242	1.79–15.82	<0.0001

between the 2HG level and overall survival confirms the large clinical studies that support the hypothesis that IDH mutations occur early during oncogenesis and subsequently other mutations determine the progression of disease (Ichimura 2012).

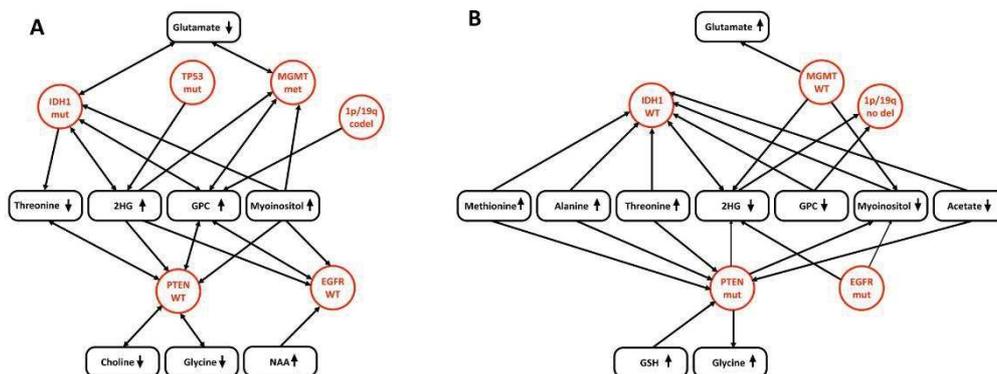


**Fig. 3** Comparison of the survival rates between groups of patients with different status of genomics markers (a vIDH1, b 1p19q, c MGMT, d PTEN, e EGFR, f TP53) measured in the tumor tissues.

Survival in the presence of the mutation is shown as black lines for genomic aberrations associated to a good prognosis and as red lines for genomic aberrations associated to a poor prognosis and vice versa



**Fig. 4** Comparison of the survival rates between groups of patients with different levels of accumulation of six metabolites (a 2HG, b Alanine, c Glycine, d GPC/PC, e Serine, f Glutamate) measured in the tumor tissues



**Fig. 5** Associations between tumor genetic background and the metabolite levels in the tumor tissues for patients having mutations associated to a good prognosis (a) and a poor prognosis (b)

Myo-inositol, a precursor of phosphatidylinositol, GPC and PC make up the phospholipid membrane involved in cell signaling (Tzika et al. 2007). A high level of GPC is associated with a good prognosis and was observed in low-grade gliomas (Sabatier et al. 1999). The GPC/PC ratio has been reported to positively correlate with survival time and associated with the expression of the histone deacetylase genes

HDAC1 and HDAC4, influencing tumor aggressiveness in human gliomas (Dali-Youcef et al. 2015).

Glycine, a nonessential amino acid, is a precursor to make proteins, lipid and nucleic acids, and is synthesized through several pathways, principally via intermediate glycolysis (with serine) and from choline (Giskeødegård et al. 2012). Many cancer cells exhibit increased flux from glucose

into serine and glycine biosynthesis (Locasale and Cantley 2010).

Finally, the glutamate–glutamine cycle played a major role in cancer cell metabolism. We have known for some time that cancers used glutamine, whose uptake and metabolism are regulated by the MYC oncogene. MYC-transformed cells become addicted to glutamine through increased expression of glutamine transporters and glutamine catabolic enzymes (Dang 2010; Lunt and Vander Heiden 2011). Glutamine is the major substrate that is oxidizable by tumor cells (Baggetto 1992) and a major source of nitrogen for nucleotide and amino acid synthesis (Vander Heiden 2011). This amino acid can be used as a precursor for lipid synthesis, especially in hypoxic environments.

In conclusion, HRMAS NMR spectroscopy provides accurate information on the metabolomics of oligodendrogliomas, making it possible to find new biomarkers indicative of survival. It enables rapid characterization of intact tissue and could be used as an intraoperative method, opening the perspectives of real-time metabolic profiling during surgery and therefore could influence the operative strategy.

**Acknowledgments** We gratefully acknowledge K. Elbayed for the Matlab scripts that he developed to quantify the metabolites. The laboratory staff of the Tumor Bio-bank (Centre de Ressources Biologiques) of Strasbourg University Hospitals are also gratefully acknowledged for their technical assistance.

**Author contributions** CB: writer, interpretation of data; MGK: writer, statistical analysis; AEC: network analysis; FMM: NMR data acquisition, spectra analysis; NDY: participation of biochemical construction of network model, manuscript review; MP: spectra analysis; PS: statistical analysis; RH: IDH1 analysis; NEW: genomics analysis; BL: pathological analysis; MPC: pathological analysis; RS: patient oncological management; FP: patient surgical management; GN: patient radiotherapy management, manuscript review; IJN: writer, experimental design, data analysis.

**Data availability** The datasets generated during and/or analysed during the current study are available through EMBL-EBI MetaboLights, with the accession number MTBLS869.

### Compliance with ethical standards

**Conflicts of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethics approval** The Ethics Committee of Strasbourg approved the study (No. 100/2003, 09.12.2003 and No. 2013-37, 12.11.2013).

**Informed consent** A written informed consent was obtained from all the included patients.

### References

- Baggetto, L. G. (1992). Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie*, *74*(11), 959–974.
- Banan, R., & Hartmann, C. (2017). The new WHO 2016 classification of brain tumors—what neurosurgeons need to know. *Acta Neurochirurgica*, *159*(3), 403–418. <https://doi.org/10.1007/s00701-016-3062-3>.
- Battini, S., Imperiale, A., Taïeb, D., Elbayed, K., Cicek, A. E., Sebag, F., et al. (2016). High-resolution magic angle spinning (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy metabolomics of hyperfunctioning parathyroid glands. *Surgery*, *160*(2), 384–394. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.03.002>.
- Cairncross, J. G., Ueki, K., Zlatescu, M. C., Lisle, D. K., Finkelstein, D. M., Hammond, R. R., et al. (1998). Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *Journal of the National Cancer Institute*, *90*(19), 1473–1479.
- Cairns, R. A., & Mak, T. W. (2013). Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: Mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer Discovery*, *3*(7), 730–741. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-13-0083>.
- Chen, R., Ravindra, V. M., Cohen, A. L., Jensen, R. L., Salzman, K. L., Prescott, A. P., et al. (2015). Molecular features assisting in diagnosis, surgery, and treatment decision making in low-grade gliomas. *Neurosurgical Focus*, *38*(3), E2. <https://doi.org/10.3171/2015.1.focus14745>.
- Cicek, A. E., Bederman, I., Henderson, L., Drumm, M. L., & Ozsoyoglu, G. (2013). ADEMA: An algorithm to determine expected metabolite level alterations using mutual information. *PLoS Computational Biology*, *9*(1), e1002859. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002859>.
- Dali-Youcef, N., Froelich, S., Moussallieh, F.-M., Chibbaro, S., Noël, G., Namer, I. J., et al. (2015). Gene expression mapping of histone deacetylases and co-factors, and correlation with survival time and 1H-HRMAS metabolomic profile in human gliomas. *Scientific Reports*, *5*, 9087. <https://doi.org/10.1038/srep09087>.
- Dang, C. V. (2010). Glutaminolysis: Supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells? *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *9*(19), 3884–3886. <https://doi.org/10.4161/cc.9.19.13302>.
- Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., et al. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, *462*(7274), 739–744. <https://doi.org/10.1038/nature08617>.
- de Muga, S., Hernández, S., Agell, L., Salido, M., Juanpere, N., Lorenzo, M., et al. (2010). Molecular alterations of EGFR and PTEN in prostate cancer: Association with high-grade and advanced-stage carcinomas. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc*, *23*(5), 703–712. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.45>.
- Dreier, L., & Wider, G. (2006). Concentration measurements by PULCON using X-filtered or 2D NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *44*, S206–S212. <https://doi.org/10.1002/mrc.1838>.
- Ducray, F., Idhah, A., Wang, X.-W., Cheneau, C., Labussiere, M., & Sanson, M. (2011). Predictive and prognostic factors for gliomas. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *11*(5), 781–789. <https://doi.org/10.1586/era.10.202>.
- Erb, G., Elbayed, K., Piotto, M., Raya, J., Neuville, A., Mohr, M., et al. (2008). Toward improved grading of malignancy in oligodendrogliomas using metabolomics. *Magnetic Resonance in Medicine*, *59*(5), 959–965. <https://doi.org/10.1002/mrm.21486>.
- Giskeoedgård, G. F., Lundgren, S., Sitter, B., Fjøsne, H. E., Postma, G., Buydens, L. M. C., et al. (2012). Lactate and glycine-potential MR biomarkers of prognosis in estrogen receptor-positive breast

- cancers. *NMR in Biomedicine*, 25(11), 1271–1279. <https://doi.org/10.1002/nbm.2798>.
- Griffin, J. L., & Shoccoor, J. P. (2004). Metabolic profiles of cancer cells. *Nature Reviews Cancer*, 4(7), 551–561. <https://doi.org/10.1038/nrc1390>.
- Han, F., Hu, R., Yang, H., Liu, J., Sui, J., Xiang, X., et al. (2016). PTEN gene mutations correlate to poor prognosis in glioma patients: A meta-analysis. *Oncotargets and Therapy*, 9, 3485–3492. <https://doi.org/10.2147/ott.s99942>.
- Hastie, T., Tibshirani, R., & Friedman, J. (2009). Unsupervised learning in the elements of statistical learning. *Unsupervised learning in the elements of statistical learning* (pp. 487–501). New York: Springer.
- Ichimura, K. (2012). Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathology*, 29(3), 131–139. <https://doi.org/10.1007/s10014-012-0090-4>.
- Imperiale, A., Elbayed, K., Moussallieh, F.-M., Reix, N., Piotto, M., Bellocq, J.-P., et al. (2013). Metabolomic profile of the adrenal gland: From physiology to pathological conditions. *Endocrine-Related Cancer*, 20(5), 705–716. <https://doi.org/10.1530/erc-13-0232>.
- Jiang, B.-H., & Liu, L.-Z. (2008). PI3 K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784(1), 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.09.008>.
- Jullian N., Afshar M (2008) Current Computer-Aided Drug Design. In *Current Computer-Aided Drug Design* (Vol. 4, pp. 35–45).
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30.
- Kanehisa, Minoru, Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D199–D205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1076>.
- Karayan-Tapon, L., Quillien, V., Guilhot, J., Wager, M., Fromont, G., Saikali, S., et al. (2010). Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *Journal of Neuro-Oncology*, 97(3), 311–322. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-0031-1>.
- Koivunen, P., Lee, S., Duncan, C. G., Lopez, G., Lu, G., Ramkissoon, S., et al. (2012). Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*, 483(7390), 484–488. <https://doi.org/10.1038/nature10898>.
- Kong, D.-S., Kim, H. R., Choi, Y.-R., Seol, H. J., Lee, J.-I., & Nam, D.-H. (2015). Prognostic impact of molecular phenotype in patients with recurrent anaplastic glioma treated with prolonged administration of temozolomide. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 22(9), 1425–1429. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.02.036>.
- Liquiere, M., & Sallantin, J. (1998). Structural Machine Learning With Galois Lattice and Graphs. *ICML'98: 5th International Conference on Machine Learning Madison*, 98, 305–313.
- Locasale, J. W., & Cantley, L. C. (2010). *Altered metabolism in cancer*. *BMC biology*, 8, 88. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-88>.
- Losman, J.-A., Looper, R. E., Koivunen, P., Lee, S., Schneider, R. K., McMahon, C., et al. (2013). (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6127), 1621–1625. <https://doi.org/10.1126/science.1231677>.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., et al. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., et al. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- Lunt, S. Y., & Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic glycolysis: Meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>.
- Molenaar, R. J., Radivoyevitch, T., Maciejewski, J. P., van Noorden, C. J. F., & Bleeker, F. E. (2014). The driver and passenger effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in oncogenesis and survival prolongation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1846(2), 326–341. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.05.004>.
- Mörén, L., Bergenheim, A. T., Ghasimi, S., Brännström, T., Johansson, M., & Antti, H. (2015). Metabolomic screening of tumor tissue and serum in glioma patients reveals diagnostic and prognostic information. *Metabolites*, 5(3), 502–520. <https://doi.org/10.3390/metabo5030502>.
- Nguyen, A., Legrain, M., Noel, G., Coca, A., Meyer Ea, N., Schott, R., et al. (2015). An innovative fluorescent semi-quantitative methylation-specific PCR method for the determination of MGMT promoter methylation is reflecting intra-tumor Heterogeneity. *Current Cancer Drug Targets*, 15(7), 624–640.
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York)*, 321(5897), 1807–1812. <https://doi.org/10.1126/science.1164382>.
- R Development Core Team. (2008). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0.
- Sabatier, J., Gilard, V., Malet-Martino, M., Ranjeva, J. P., Terral, C., Breil, S., et al. (1999). Characterization of choline compounds with in vitro 1H magnetic resonance spectroscopy for the discrimination of primary brain tumors. *Investigative Radiology*, 34(3), 230–235.
- Salway, J. G. (2014). *Metabolism at a glance* (3rd ed.). Malden (MI): Blackwell Publishing.
- Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., et al. (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(25), 4150–4154. <https://doi.org/10.1200/jco.2009.21.9832>.
- Siegel, T. (2015). Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 22(3), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2014.10.004>.
- Smith, J. S., Perry, A., Borell, T. J., Lee, H. K., O'Fallon, J., Hosek, S. M., et al. (2000). Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(3), 636–645. <https://doi.org/10.1200/jco.2000.18.3.636>.
- Lallich, S., Teytaud, O., Prudhomme, E., (2006). Association rule interestingness: Measure and statistical validation. In F. J. Guillet & H. J. Hamilton (Eds.), *Quality measures in data mining* (p. 25). Berlin: Springer.
- Tzika, A. A., Astrakas, L., Cao, H., Mintzopoulos, D., Andronesi, O. C., Mindrinos, M., et al. (2007). Combination of high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy and microscale genomics to type brain tumor biopsies. *International Journal of Molecular Medicine*, 20(2), 199–208.
- Vander Heiden, M. G. (2011). Targeting cancer metabolism: A therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(9), 671–684. <https://doi.org/10.1038/nrd3504>.
- Wang, X.-W., Ciccarino, P., Rossetto, M., Boisselier, B., Marie, Y., Desestret, V., et al. (2014). IDH mutations: Genotype-phenotype correlation and prognostic impact. *BioMed Research*

- International*, 2014, 540236. <https://doi.org/10.1155/2014/540236>.
- Wirsching, H.-G., & Weller, M. (2016). The role of molecular diagnostics in the management of patients with gliomas. *Current Treatment Options in Oncology*, 17(10), 51. <https://doi.org/10.1007/s11864-016-0430-4>.
- Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., et al. (2013). HMDB 3.0—the human metabolome database in 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D801–D807. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1065>.
- Yamada, K. M., & Araki, M. (2001). Tumor suppressor PTEN: Modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 13), 2375–2382.
- Zou, P., Xu, H., Chen, P., Yan, Q., Zhao, L., Zhao, P., et al. (2013). IDH1/IDH2 mutations define the prognosis and molecular profiles of patients with gliomas: A meta-analysis. *PLoS ONE*, 8(7), e68782. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068782>.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Affiliations

Caroline Bund<sup>1,2</sup>  · Mariana Guergova-Kuras<sup>3</sup> · A. Ercument Cicek<sup>4,5</sup> · François-Marie Moussallieh<sup>1</sup> · Nassim Dali-Youcef<sup>6,7</sup> · Martial Piotto<sup>8</sup> · Pilar Schneider<sup>3</sup> · Rémy Heller<sup>9</sup> · Natacha Entz-Werle<sup>10</sup> · Benoît Lhermitte<sup>11</sup> · Marie-Pierre Chenard<sup>11</sup> · Roland Schott<sup>12</sup> · François Proust<sup>13</sup> · Georges Noël<sup>14</sup> · Izzie Jacques Namer<sup>1,2,15</sup>

<sup>1</sup> Service de Biophysique et Médecine Nucléaire, Hôpital de Haute-pierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1, Avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex 09, France

<sup>2</sup> ICube, Université de Strasbourg/CNRS, UMR 7357, Strasbourg, France

<sup>3</sup> Ariana Pharmaceuticals SA, Paris, France

<sup>4</sup> Lane Center of Computational Biology, School of Computer Science, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, USA

<sup>5</sup> Computer Engineering Department, Bilkent University, Ankara, Turkey

<sup>6</sup> IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire)/CNRS UMR 7104/INSERM U964, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>7</sup> Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>8</sup> Bruker Biospin, Wissembourg, France

<sup>9</sup> Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, Hôpitaux Civils de Colmar, Colmar, France

<sup>10</sup> Service de Pédiatrie Onco-hématologie, Hôpital de Haute-pierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>11</sup> Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital de Haute-pierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>12</sup> Département d'Oncologie Médicale, Centre Paul Strauss, Strasbourg, France

<sup>13</sup> Service de Neurochirurgie, Hôpital de Haute-pierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>14</sup> Département de Radiothérapie, Centre Paul Strauss, Strasbourg, France

<sup>15</sup> FMTS (Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg), Faculté de Médecine, Strasbourg, France

# What Does Reduced FDG Uptake Mean in High-Grade Gliomas?

Caroline Bund, MD,\*†‡ Benoît Lhermitte, MD,§ A. Ercument Cicek, PhD,||¶ Elisa Ruhland, MSc,\*† François Proust, MD,\*\* and Izzie Jacques Namer, MD, PhD\*†‡

**Purpose:** As well as in many others cancers, FDG uptake is correlated with the degree of malignancy in gliomas, that is, commonly high FDG uptake in high-grade gliomas. However, in clinical practice, it is not uncommon to observe high-grade gliomas with low FDG uptake. Our aim was to explore the tumor metabolism in 2 populations of high-grade gliomas presenting high or low FDG uptake.

**Methods:** High-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy was realized on tissue samples from 7 high-grade glioma patients with high FDG uptake and 5 high-grade glioma patients with low FDG uptake. Tumor metabolomics was evaluated from 42 quantified metabolites and compared by network analysis.

**Results:** Whether originating from astrocytes or oligodendrocytes, the high-grade gliomas with low FDG avidity represent a subgroup of high-grade gliomas presenting common characteristics: low aspartate, glutamate, and creatine levels, which are probably related to the impaired electron transport chain in mitochondria; high serine/glycine metabolism and so one-carbon metabolism; low glycerophosphocholine-phosphocholine ratio in membrane metabolism, which is associated with tumor aggressiveness; and finally negative MGMT methylation status.

**Conclusions:** It seems imperative to identify this subgroup of high-grade gliomas with low FDG avidity, which is especially aggressive. Their identification could be important for early detection for a possible personalized treatment, such as antifolate treatment.

**Key Words:** FDG PET, glioma, metabolomics, HRMAS-NMR spectroscopy

(*Clin Nucl Med* 2019;44: 936–942)

FDG is the first and indisputably the most important radiotracer for imaging tumor metabolism and is used in clinical practice for tumor malignancy grading, staging, and therapeutic response evaluation in many cancers. FDG uptake reflects the increase in aerobic glycolysis with lactic fermentation used for energy production

(Warburg phenomenon) and/or the anabolic reactions (glucose is a major donor), both involved in tumor growth.

In gliomas, FDG PET is also a useful tool for the evaluation of the degree of malignancy. It is commonly accepted that high-grade gliomas are characterized by increased FDG uptake and that low-grade gliomas reduced FDG uptake. This property has been used to diagnose malignant transformation of low-grade gliomas and for the management of high-grade gliomas to guide biopsies, to assess posttreatment response, and to detect early tumor relapse compared with radionecrosis.<sup>1–6</sup>

Few studies have focused on high-grade gliomas with reduced glucose avidity.<sup>3,7,8</sup> The aim of this study was to compare the tumor metabolomics using high-resolution magic-angle spinning (HRMAS) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in 2 populations of high-grade gliomas presenting high or low FDG uptake. We also compared the tumor metabolomics of high-grade gliomas with low FDG uptake and low-grade gliomas presenting low FDG uptake.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient Population

The high-grade glioma group consisted of 12 patients, 8 patients with a high-grade astrocytoma (7 glioblastomas and 1 grade III astrocytoma, World Health Organization [WHO] 2016) and 4 patients with a high-grade oligodendroglioma (grade III, WHO 2016). The patient characteristics are listed in Table 1. For 8 high-grade astrocytomas, 4 patients presented high FDG uptake (normalized SUV [nSUV],  $\geq 1.84$ ) and 4 patients presented low FDG uptake (nSUV,  $\leq 0.85$ ) despite the same histologic and morphologic aspects on MRI, that is, intense contrast enhancement, central necrosis, and expanded perilesional edema (Fig. 1). Of the 4 patients with high-grade oligodendrogliomas, 3 presented high FDG uptake (nSUV,  $\geq 1.43$ ) and 1 patient presented low FDG uptake (nSUV, 0.66) despite the same histologic, MRI, and F-DOPA PET aspects (Fig. 2).

The low-grade glioma group consisted of 6 patients (1 with grade II astrocytoma and 5 with grade II oligodendroglioma, WHO 2016). In this group, the mean age was 34.2 years (range, 19–46 years) with 5 women and 1 man. Mean overall survival was 79.5 months (range, 38.5–91.9 months). All patients are still alive. In all cases, we observed the same morphologic aspects on MRI (no contrast enhancement, no necrosis, and no significant perilesional edema) and the same metabolic imaging aspects, that is, low FDG uptake (mean nSUV, 0.48; range, 0.41–0.55; standard deviation, 0.06) and moderate F-DOPA uptake in PET (Figs. 1, 2).

All patients fulfilled the following criteria: (1) histopathologic confirmation of glioma grading after rereading; (2) presence of FDG PET imaging before surgery; and (3) presence of tumor tissue samples in the Strasbourg University Hospitals' Tumor Bio-bank for HRMAS NMR spectroscopy analysis.

### FDG PET Imaging

PET examinations were performed on a GE Discovery ST (GE Medical System, Milwaukee, WI) until May 2013 and on a Siemens mCT128 Biograph (Siemens Medical Solutions, Erlangen,

Received for publication April 30, 2019; revision accepted July 4, 2019.

From the \*Service de Biophysique et Médecine Nucléaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg; †MNMS-Platform, Hôpital de Haute-pierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg; ‡ICube, Université de Strasbourg/CNRS, UMR 7357; §Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital de Haute-pierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France; ||Computer Engineering Department, Bilkent University, Ankara, Turkey; ¶Computational Biology Department, School of Computer Science, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA; and \*\*Service de Neurochirurgie, Hôpital de Haute-pierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

Ethics approval and consent to participate: The Ethics Committee of Strasbourg approved the study (no. 2003-100, September 12, 2003 and no. 2013-37, December 11, 2013). Written informed consent was obtained from all patients included.

Informed consent: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. A written informed consent was obtained from all the patients included.

Conflicts of interest and sources of funding: none declared.

Correspondence to: Caroline Bund, MD, MSc, Service de Biophysique et de Médecine Nucléaire, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Haute-pierre, 1, Avenue Molière, 67098 Strasbourg Cedex 09, France. E-mail: Caroline.BUND@chru-strasbourg.fr.

Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0363-9762/19/4412-0936

DOI: 10.1097/RLU.0000000000002765

TABLE 1. Characteristics of High-Grade Glioma Patients

Case	Age/Sex	Pathology	FDG PET (nSUV)	OS, mo	P7EN Deletion	EGFR Amplification	IDH1 Mutation	1p/19q Codeletion	TP53 Mutation	MGMT Methylation	ATRX Mutation
1	50/F	GBM	3.45	87.4*	+	0	-	ND	+	+	+
2	54/M	GBM	2.85	10.5	+	0	+	ND	+	+	ND
3	47/F	GBM	1.84	99.6	+	200	-	ND	-	+	+
4	36/M	AST III	2.04	36.9	+	0	-	ND	-	+	+
5	36/F	ODG III	1.43	103.3	-	200	+	-	-	+	+
6	45/M	ODG III	2.87	114.6	+	200	-	-	-	+	+
7	31/M	ODG III	2.33	76.7	-	200	+	-	-	ND	ND
8	51/M	GBM	0.79	8.2	+	0	-	ND	+	-	+
9	66/F	GBM	0.67	8.1*	+	200	-	ND	-	-	+
10	63/M	GBM	0.85	6.8*	+	200	-	ND	-	-	+
11	38/F	GBM	0.74	39.3*	+	200	-	ND	-	-	+
12	28/F	ODG III	0.66	103.3	-	200	+	-	+	-	+

\*Dead.  
ND indicates not done.

Germany) after May 2013. <sup>18</sup>F-FDG was injected intravenously at 2.5 MBq/kg and 2 MBq/kg, respectively, after at least 6 hours of fasting (with the exception of ad libitum water intake) and capillary glycemia lower than 6.6 mmol/L. Image acquisition was initiated 30 minutes and 4 hours after <sup>18</sup>F-FDG injection, including low-dose noncontrast transmission CT scan followed by a 3-dimensional PET scan with an acquisition time of 15 minutes. PET data were reconstructed with and without CT-based attenuation correction using a common iterative algorithm (ordered subset expectation maximization, 2 iterations, 21 subsets, matrix 128 × 128).

For semiquantitative analysis of FDG uptake, we used the SUV<sub>max</sub> per focus defined as: SUV = [maximum value of radioactivity concentration (kBq/mL)]/[injected dose (MBq)/patient weight (kg)]. Normalized SUV was calculated as the ratio of maximum tumor FDG uptake obtained using the volume of interest covering the entire tumor to maximum cerebellum FDG uptake. An nSUV value equal to or greater than 1 is considered hypermetabolic; less than 1 is considered hypometabolic.

### HRMAS NMR Analysis

#### Sample Preparation

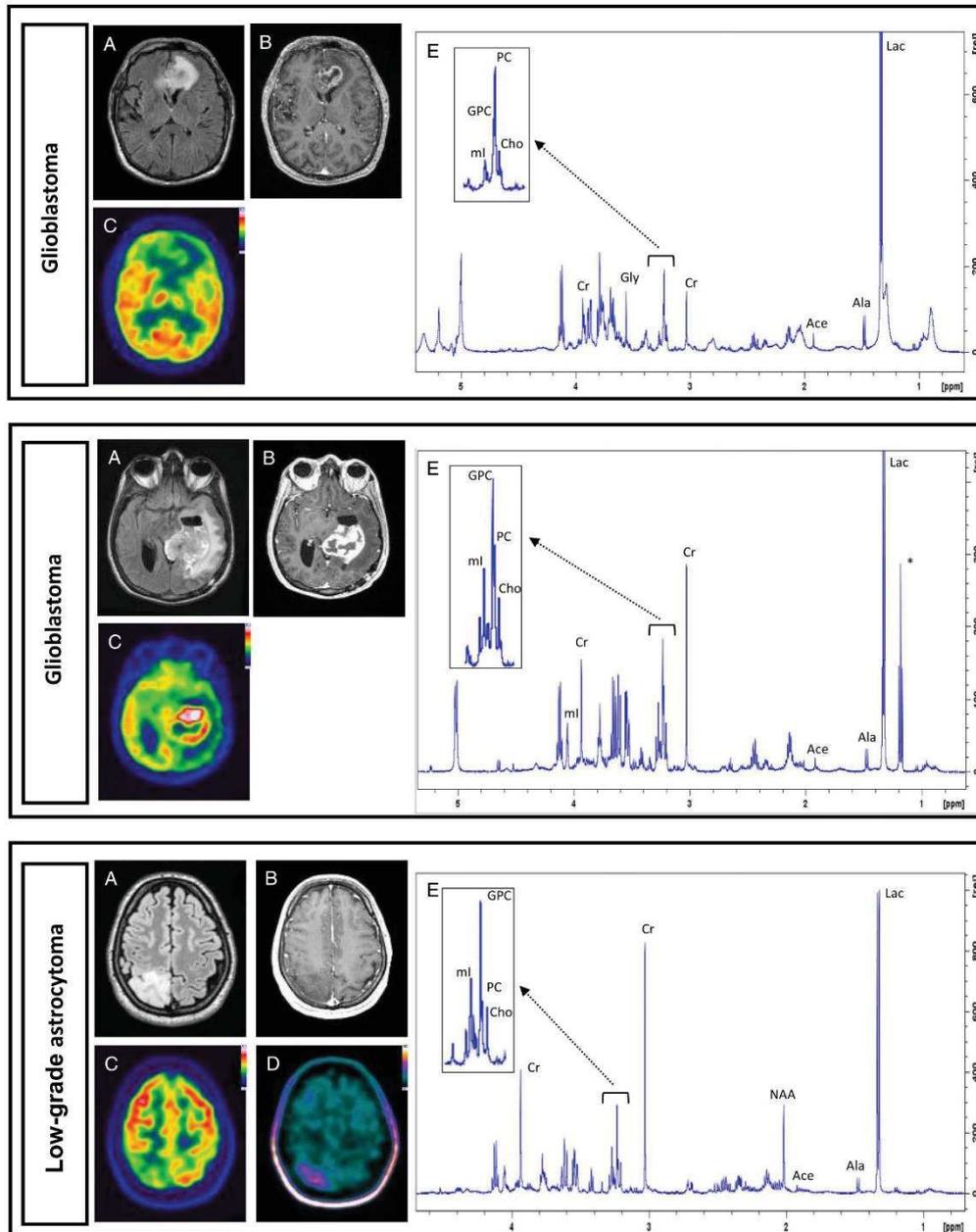
Tissue specimens were collected with minimum ischemic delays after resection (average time 2 ± 1 minute) and snap-frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C. All tissue samples exhibited a viable tumor/necrosis ratio and were quantitatively and qualitatively adequate to perform satisfactory HRMAS analysis. Each brain biopsy sample was prepared at -20°C by introducing a 15- to 18-mg biopsy into a disposable 30-μL Kelf insert. To provide a lock frequency for the NMR spectrometer, 10 μL of D<sub>2</sub>O was also added to the insert.

#### HRMAS NMR Data Acquisition

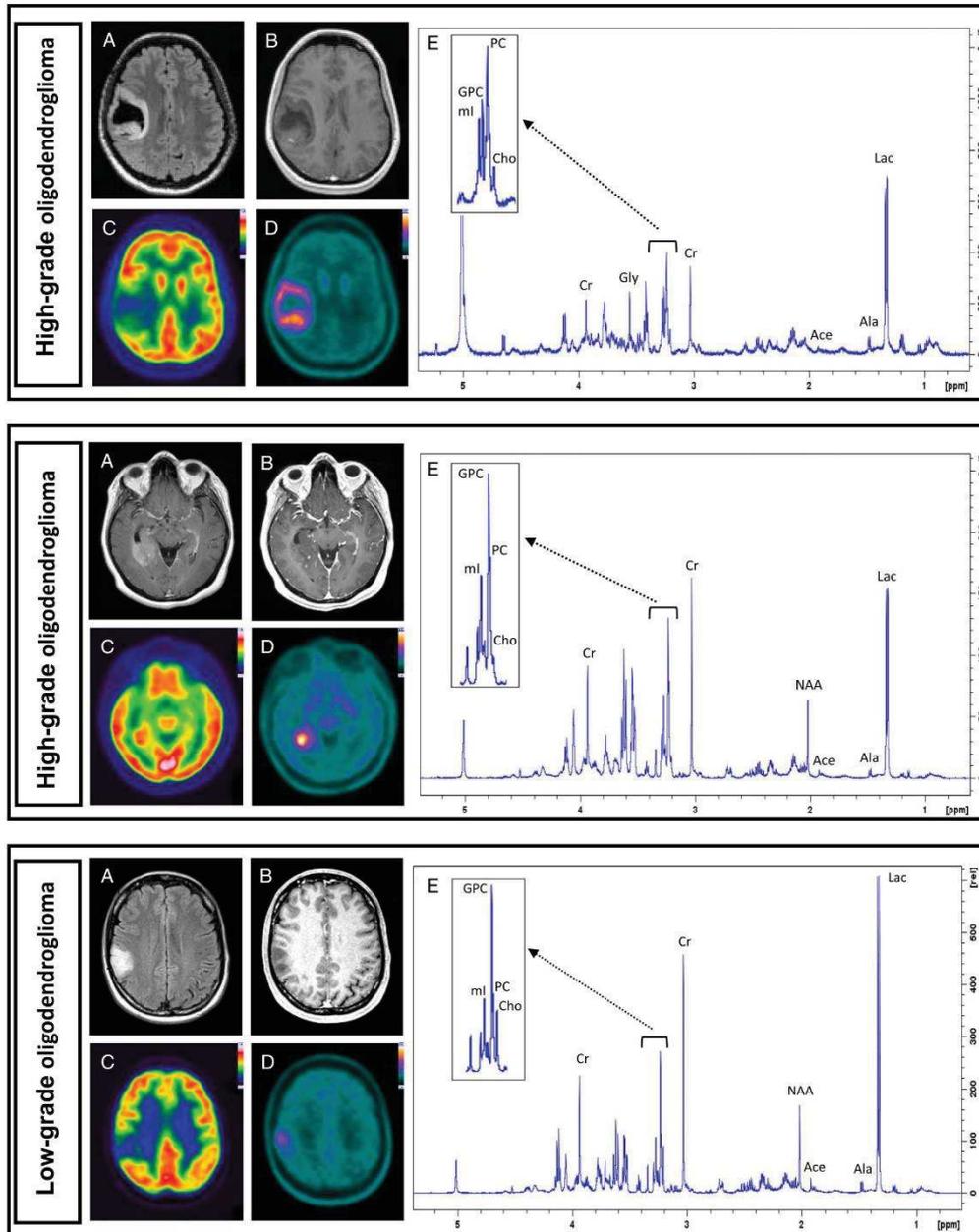
All HRMAS NMR spectra were acquired on a Bruker (Karlsruhe, Germany) Avance III 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13 MHz and equipped with a 4-mm triple-resonance gradient HRMAS probe (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>31</sup>P). The temperature was maintained at 4°C throughout the acquisition time to reduce the effects of tissue degradation during the spectrum acquisition. A 1-dimensional proton spectrum using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence was acquired with a 285-μs interpulse delay and a 10-minute acquisition time for each tissue sample. The number of loops was set at 328, giving the CPMG pulse train a total length of 93 milliseconds. The chemical shift was calibrated to the peak of the methyl proton of L-lactate at 1.33 ppm. To confirm resonance assignments in a few representative samples, 2-dimensional heteronuclear experiments (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) were also recorded immediately after ending the 1-dimensional spectra acquisition.

#### HRMAS NMR Data Processing

Metabolite assignment and quantification was done with Chenomx software (Edmonton, Alberta, Canada), using a database of NMR spectra of 76 metabolites acquired in our laboratory under the same CPMG pulse sequence as the tissue samples.<sup>9</sup> We could detect and quantify 42 metabolites in glioma samples: acetate, adenosine, alanine, allocystathionine, arginine, ascorbate, asparagine, aspartate, betaine, choline, creatine, ethanolamine, fumarate, gamma-aminobutyric acid (GABA), glycine, glucose, glutamate, glutamine, glutathione (GSH), glycerol, glycerophosphocholine (GPC), hydroxybutyrate, 2-hydroxyglutarate (2HG), hypotaurine, isoleucine, lactate, lysine, methionine, myoinositol, N-acetyl-aspartate (NAA), N-acetyl-lysine, ornithine, phenylalanine, phosphocholine (PC), proline, serine, scylloinositol, succinate, taurine, threonine, tyrosine, and valine. The results are expressed in nmol·mg<sup>-1</sup> of tissue. We



**FIGURE 1.** Three representative cases for astrocytomas: 2 different metabolic patterns of glioblastomas (first with low FDG uptake and second with high FDG uptake) compared with low-grade astrocytoma (third case). For each one, we showed matched transverse slices of FLAIR (A) and Gd-enhanced T1-weighted (B) MRI, FDG PET (C), FDOPA PET (D), and HRMAS NMR spectra (E). HRMAS NMR spectra demonstrates clearly inverted GPC/PC ratio, increased glycine (Gly), decreased creatine (Cr), and decreased myoinositol (ml) levels in glioblastoma with low FDG uptake (first case). Levels of acetate (Ace), alanine (Ala), lactate (Lac), and choline (Cho) remain similar. The asterisk shows ethanol contamination.



**FIGURE 2.** Three representative cases for oligodendrogliomas: 2 different metabolic patterns of high-grade oligodendrogliomas (first with low FDG uptake and second with high FDG uptake) compared with low-grade oligodendroglioma (third case). For each one, we showed matched transverse slices of FLAIR (A) and Gd-enhanced T1-weighted (B) MRI, FDG PET (C), FDOPA PET (D), and HRMAS NMR spectra (E). HRMAS NMR spectra demonstrates, as in glioblastoma cases, inverted GPC/PC ratio, increased glycine (Gly), and decreased creatine (Cr) levels in high-grade oligodendroglioma with low FDG uptake (first case). Levels of acetate (Ace), alanine (Ala), lactate (Lac), myoinositol (ml), and choline (Cho) remain similar.

used also total choline (choline + GPC + PC) as additional parameters in network analysis.

### Network Analysis

The algorithm to determine the expected metabolite level alterations (ADEMA) network analyses using mutual information were applied to the metabolite quantification values.<sup>10</sup> ADEMA includes information on the metabolic pathway in a unidirectional or bidirectional manner. The network was constructed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes<sup>11,12</sup> and Salway's work.<sup>13</sup> Using the metabolic network topology, the ADEMA algorithm evaluates the change in groups of metabolites between concentration data from 2 experimental groups instead of analyzing metabolite concentrations one by one. Based on mutual information, the algorithm determines whether some metabolites are biomarkers when considered together, and it can predict the direction of the expected change per metabolite depending on the metabolic network topology considered. Various groups of metabolites related to the metabolic pathways involved were compared):

- Taurine, hypotaurine, aspartate, methionine, allocystathionine, serine
- Aspartate, asparagine, acetate, threonine, NAA
- Aspartate, lysine, *N*-acetyl-lysine
- Acetate, threonine, allocystathionine, methionine
- Glucose, acetate, hydroxybutyrate
- Aspartate, threonine, isoleucine
- Glucose, glycine, serine
- Glucose, glycerol, phenylalanine, tyrosine
- Glucose, valine, isoleucine
- Glucose, lactate
- Valine, lactate, alanine
- Glucose, myoinositol, ascorbate, GSH, glycine, glutamate
- Myoinositol, scylloinositol
- Glutamate, GABA, proline
- Aspartate, adenosine, succinate, fumarate, 2HG
- Glutamate, glutamine, glycine, 2HG
- Glutamate, arginine, glycine, creatine, ornithine
- Aspartate, arginine, ornithine
- Ethanolamine, choline, GPC, PC, total choline
- Choline, betaine, glycine

### Histopathology

After NMR HRMAS analysis, the inserts were cut, and for half the content of each sample, the percentage of tumor cells in the total sample of cells with regard to the total surface were calculated based on frozen hematoxylin and eosin-stained sections.

## RESULTS

Table 2 summarizes the network analysis results obtained on metabolite concentration comparisons between on one hand high-grade gliomas with low and high FDG uptake, and on the other hand high-grade gliomas with low-grade gliomas.

### High-Grade Gliomas

The HRMAS NMR spectra of high-grade glioma patients with low or high FDG uptake are clearly different (Figs. 1, 2). The ADEMA network analysis shows that the low FDG uptake was associated with an elevated concentration for taurine, hypotaurine, valine, isoleucine, GSH, serine, glycine, PC, lysine, hydroxybutyrate, phenylalanine, and tyrosine, and a low concentration for allocystathionine, glucose, myoinositol, scylloinositol, ascorbate, glutamate, 2HG, aspartate, creatine, NAA, acetate, ethanolamine, GPC, total

choline, *N*-acetyl-lysine, GABA, proline, adenosine, glycerol, and betaine (Fig. 3, Table 2).

### Comparison With Low-Grade Gliomas

Compared with low-grade gliomas, high-grade gliomas with low FDG uptake were associated with an elevated concentration for methionine, glucose, alanine, valine, isoleucine, GSH, serine, glycine, fumarate, asparagine, PC, *N*-acetyl-lysine, hydroxybutyrate, ornithine, phenylalanine, and tyrosine, and a low concentration for allocystathionine, myoinositol, scylloinositol, ascorbate, glutamate, succinate, 2HG, creatine, aspartate, NAA, arginine, acetate, ethanolamine, GPC, total choline, GABA, adenosine, glycerol, and betaine (Table 2).

Compared with low-grade gliomas, high-grade gliomas with high FDG uptake were associated with an elevated concentration for methionine, glucose, alanine, valine, isoleucine, fumarate, acetate, asparagine, choline, PC, and ornithine, and a low concentration for allocystathionine, myoinositol, scylloinositol, GSH, succinate, 2HG, NAA, creatine, arginine, GPC, GABA, and adenosine (Table 2).

## DISCUSSION

The results presented in this study demonstrate that the high-grade gliomas with low FDG avidity are more aggressive than the high-grade gliomas with high FDG avidity. Whether originating from astrocytes or oligodendrocytes, these gliomas form a subgroup of high-grade gliomas with common characteristics.

First, low aspartate, glutamate, and creatine levels are probably related to the impaired electron transport chain in mitochondria and considered as a predictive metabolic marker of the degree of hypoxia.<sup>14</sup> Even if there are no significant differences in alanine and lactate levels, high levels of many amino acids produced by anaerobic pathways (valine, isoleucine, lysine, etc) and a high GSH level showing cellular oxidative stress support this idea.

Second, high serine/glycine metabolism is probably related to overexpression of serine hydroxymethyltransferase described in many cancers and gliomas and is associated with a poor prognosis.<sup>15</sup> In anabolic pathways, the serine/glycine pathway represents a crucial turning point in glucose conversion.<sup>16</sup> Imported serine and serine derived from a branch of glycolysis can be converted to glycine, which in turn provides carbon units for one-carbon metabolism.<sup>17,18</sup> The synthesis of proteins, lipids, nucleic acids, and other cofactors requires one-carbon metabolism, which is a complex metabolite network that is based on the chemical reactions of folate compounds. The one-carbon unit proceeds in a cyclical pathway from which it is transferred to other metabolic pathways. The importance of this metabolic pathway is underlined by the fact that antifolate chemotherapy is currently widely used in cancer treatment and has been since its discovery more than 50 years ago.<sup>18</sup>

Third, there is a decreased GPC/PC ratio in membrane metabolism, which is associated with tumor aggressiveness,<sup>19,20</sup> knowing that increased choline kinase activity enhances the PC level and increased glycerophosphodiesterase activity decreases the GPC level.<sup>21-23</sup>

Finally, the MGMT methylation status, which predicts the beneficial effect of temozolomide treatment in glioblastoma,<sup>24,25</sup> is systematically absent in low-FDG-uptake cases (Table 1).

## CONCLUSIONS

This study demonstrates that there exists a subgroup of high-grade gliomas especially aggressive that can be identified using FDG PET, which shows low FDG avidity, and in vivo MR spectroscopy, which detects low creatine level.<sup>26</sup> Their identification could be important for early detection for a possible personalized treatment.



## ACKNOWLEDGMENTS

The laboratory staff of Strasbourg University Hospitals' Tumor Bio-bank (Centre de Ressources Biologiques) is gratefully acknowledged for their technical assistance.

## REFERENCES

- Chen W, Silverman DH. Advances in evaluation of primary brain tumors. *Semin Nucl Med.* 2008;38:240–250.
- De Witte O, Lefranc F, Levivier M, et al. FDG-PET as a prognostic factor in high-grade astrocytoma. *J Neurooncol.* 2000;49:157–163.
- Padma MV, Said S, Jacobs M, et al. Prediction of pathology and survival by FDG PET in gliomas. *J Neurooncol.* 2003;64:227–237.
- Hanson MW, Glantz MJ, Hoffman JM, et al. FDG-PET in the selection of brain lesions for biopsy. *J Comput Assist Tomogr.* 1991;15:796–801.
- Levivier M, Goldman S, Bidaut LM, et al. Positron emission tomography-guided stereotactic brain biopsy. *Neurosurgery.* 1992;31:792–797; discussion 797.
- Dankbaar JW, Snijders TJ, Robe PA, et al. The use of (18)F-FDG PET to differentiate progressive disease from treatment induced necrosis in high grade glioma. *J Neurooncol.* 2015;125:167–175.
- Davis WK, Boyko OB, Hoffman JM, et al. [<sup>18</sup>F]2-fluoro-2-deoxyglucose-positron emission tomography correlation of gadolinium-enhanced MR imaging of central nervous system neoplasia. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1993;14:515–523.
- Atkinson M, Juhász C, Shah J, et al. Paradoxical imaging findings in cerebral gliomas. *J Neurol Sci.* 2008;269:180–183.
- Ruhland E, Bund C, Outilaft H, et al. A metabolic database for biomedical studies of biopsy specimens by high-resolution magic angle spinning nuclear MR: a qualitative and quantitative tool. *Magn Reson Med.* 2019.
- Cieck AE, Bederman I, Henderson L, et al. ADEMA: an algorithm to determine expected metabolite level alterations using mutual information. *PLoS Comput Biol.* 2013;9:e1002859.
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:27–30.
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, et al. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D199–D205.
- Salway JG. *Metabolism at a Glance.* 4th ed. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell Publishing; 2017.
- Garcia-Bermudez J, Baudrier L, La K, et al. Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours. *Nat Cell Biol.* 2018;20:775–781.
- Wang DW, Wu L, Cao Y, et al. A novel mechanism of mTORC1-mediated serine/glycine metabolism in osteosarcoma development. *Cell Signal.* 2017;29:107–114.
- Kalhan SC, Hanson RW. Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino acid. *J Biol Chem.* 2012;287:19786–19791.
- Geck RC, Tokar A. Nonessential amino acid metabolism in breast cancer. *Adv Biol Regul.* 2016;62:11–17.
- Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, et al. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2014;39:191–198.
- Dali-Youcef N, Froelich S, Moussallich FM, et al. Gene expression mapping of histone deacetylases and co-factors, and correlation with survival time and 1H-HRMAS metabolomic profile in human gliomas. *Sci Rep.* 2015;5:9087.
- Bund C, Guergova-Kuras M, Cieck AE, et al. An integrated genomic and metabolomic approach for defining survival time in adult oligodendrogliomas patients. *Metabolomics.* 2019.
- Cuadrado A, Carnero A, Dolfi F, et al. Phosphorylcholine: a novel second messenger essential for mitogenic activity of growth factors. *Oncogene.* 1993;8:2959–2968.
- Glunde K, Shah T, Winnard PT, et al. Hypoxia regulates choline kinase expression through hypoxia-inducible factor-1 alpha signaling in a human prostate cancer model. *Cancer Res.* 2008;68:172–180.
- Stewart JD, Marchan R, Lesjak MS, et al. Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 drives tumor cell migration and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:8155–8160.
- Wick W, Platten M, Meisner C, et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13:707–715.
- Malmström A, Grönberg BH, Marosi C, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13:916–926.
- Ben Sellem D, Heymann S, Imperiale A, et al. Importance of metabolic imaging in monitoring glioblastomas. *Médecine Nucléaire.* 2008;32:205.

## Hétérogénéité métabolique des gliomes : apport de la spectroscopie RMN HRMAS

### Résumé

La métabolomique par spectroscopie RMN HRMAS permet de travailler directement sur des tissus biologiques hétérogènes intacts ; elle identifie et quantifie de nombreux métabolites avec une excellente sensibilité.

Nous l'avons utilisée pour étudier l'hétérogénéité du métabolisme des gliomes et établir un lien avec la biologie moléculaire et le pronostic. Différents biomarqueurs pronostiques ont ainsi été identifiés. Ces biomarqueurs montrent les voies métaboliques privilégiées utilisées par les gliomes et pourront devenir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Par ailleurs, nous avons mis au point des outils d'analyse des voies métaboliques en utilisant des sondes moléculaires marquées au  $^{13}\text{C}$  sur cultures cellulaires et modèles de xénogreffe dans la perspective d'une application chez l'Homme.

Mots clés : Métabolomique, RMN HRMAS, gliomes, hétérogénéité tumorale, biomarqueurs, cancer

## Metabolic heterogeneity of gliomas : contribution of HRMAS NMR spectroscopy

### Abstract

Metabolomics by HRMAS NMR spectroscopy allows working directly on intact heterogeneous biological tissues; it identifies and quantifies many metabolites with an excellent sensitivity.

We have used this method to study the heterogeneity of glioma metabolism and related it to molecular biology and tumoral prognosis. Different prognostic biomarkers have thus been identified. These biomarkers show the preferred metabolic pathways used by gliomas and may become new therapeutic targets.

In addition, we have developed tools for the analysis of metabolic pathways using  $^{13}\text{C}$ -labelled molecular probes on cell cultures and xenograft models with a view to their application in medicine.

Keywords: Metabolomics, HRMAS NMR, gliomas, tumor heterogeneity, biomarkers, cancer