



HAL
open science

Adaptations métaboliques impliquées dans le développement et la rechute des glioblastomes : Etude du rôle du métabolisme du lactate

Claire Larrieu

► **To cite this version:**

Claire Larrieu. Adaptations métaboliques impliquées dans le développement et la rechute des glioblastomes : Etude du rôle du métabolisme du lactate. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0060 . tel-04763850

HAL Id: tel-04763850

<https://theses.hal.science/tel-04763850v1>

Submitted on 3 Nov 2024

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.

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE N°154 : Sciences de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par **Claire, Maria LARRIEU**

**Adaptations métaboliques impliquées dans le
développement et la rechute des glioblastomes**

Étude du rôle du métabolisme du lactate

Sous la direction du Dr. Thomas DAUBON

Soutenue le 12 avril 2024

Membres du jury :

Pr. Luc PELLERIN, Professeur	Université de Poitiers	Président
Dr. Anthony LEMARIE, Maître de Conférences	Université Toulouse III Paul Sabatier	Rapporteur
Dr. Marie-Pierre JUNIER, Directrice de Recherche	Université Paris Sorbonne	Rapportrice
Dr. Hélène CASTEL, Directrice de Recherche	Université de Normandie, Rouen	Examinatrice
Dr. Thomas DAUBON, Directeur de Recherche	Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Pour toi Mams,

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit marque la fin de plus de 3 ans et demi de travaux et découvertes passionnantes, de rebondissements et péripéties bien sûr, mais surtout de rencontres. Ainsi, je souhaite adresser mes premiers remerciements à l'ensemble des personnes qui ont croisé ou partagé un bout de mon chemin, et qui sont animées et transmettent chaque jour la lumineuse étincelle de leur passion pour la science, la biologie et la curiosité de la vie.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude aux membres du jury d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer mon travail. Merci à Monsieur Luc Pellerin, Professeur de l'Université de Poitiers, d'avoir accepté de présider ce jury, je suis véritablement honorée de pouvoir profiter le temps de cet échange de votre expérience sur le métabolisme du lactate dans le cerveau. Je remercie également Madame Marie-Pierre Junier, Directrice de recherche à l'INSERM, et Monsieur Anthony Lemarié, Maître de Conférences à l'Université de Toulouse, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, je suis également honorée de pouvoir compter sur vos avis, critiques et conseils sur mes travaux. Pour finir, merci à Madame Hélène Castel, Directrice de recherche au CNRS, d'avoir accepté d'examiner mon travail.

J'adresse ensuite un remerciement tout particulier à Monsieur Thomas Daubon, pour la confiance que tu m'as accordée en m'accueillant dans ton équipe. Merci pour ton encadrement bienveillant tout au long de ces années de thèse, pour ta motivation et ta passion pour chaque nouveau résultat (et pour la science en général), pour ton enthousiasme, ton aiguillage et ton soutien au cours des trouvailles mais aussi des péripéties de cette thèse. Je te remercie d'avoir été une véritable force motrice et rassemblante pour moi et pour toute l'équipe. Malgré l'adversité notamment des multiples déménagements, tu as su chaque fois relancer notre motivation ! Je suis ravie pour toi et pour l'équipe qu'elle puisse (enfin !) officiellement prendre son envol ! Enfin et surtout, merci d'avoir été toujours à l'écoute de mes idées, de l'être pour chacun d'entre nous dans le labo, de m'avoir impliquée dans différents projets et collaborations, et d'avoir ainsi participé à forger mon indépendance, ma curiosité, mon esprit critique et ma science.

Je voudrais aussi spécialement remercier Monsieur Antonio Christian Pagano Zottola. Les mots me manquent pour te dire toute ma gratitude. Tu es certainement ma plus jolie rencontre de cette folle aventure de thèse et je te suis infiniment reconnaissante d'être un collègue si cool et rigolo, un papa scientifique au quotidien qui a toujours su me guider et m'épauler, et un ami top de chez top avec qui de nombreuses heures de littérature se sont perdues autour de discussions, cafés, bières et poutines. Je te remercie pour ton influence

scientifique toujours pertinente qui a été vraiment déterminante pour moi. Merci pour ces tonnes de manips en parallèle, de m'avoir fait partager et impliquée dans toutes tes projets. Enfin, ayant presque été l'une des premières élèves du Prof Toto, j'ai la certitude que tu seras un excellent et passionnant professeur (même si tu notes tes élèves qu'en fonction de leur coupe de cheveux) et un talentueux chercheur, et je te souhaite toute la réussite possible, une réussite bien méritée, dans la science comme dans la vie.

Un très grand merci est évidemment destiné à toutes les personnes ayant contribué à ces travaux, qui sont, comme toute recherche, le fruit d'un travail d'équipe bien plus que d'une avancée individuelle. Je commencerai par remercier nos collaborateurs techniques, qui ont permis l'élaboration de nombreux résultats exposés dans ce manuscrit.

En premier lieu, j'aimerais particulièrement remercier l'équipe de l'animalerie mutualisée de Talence, et spécialement à Marie-Alix Derieppe et Julie Martineau, pour le nombre incalculable de souris implantées, réséquées et tendrement monitorées, merci à vous pour votre sympathie, votre adaptabilité et disponibilité à toute épreuve, sans quoi le projet résection n'aurait pas vu le jour, merci merci !

J'adresse également un remerciement à l'équipe du Dr Michel Salzet à Lille, plus particulièrement Yanis Zirem, ainsi qu'à Jérémie Teillon du Bordeaux Imaging center, pour leur collaboration dans le projet résection.

Merci à Benoît Pinson et à toute la plateforme SAM avec qui nous avons collaboré pour des dosages métaboliques lors de manips pour le moins sportives ! Merci Benoît pour les discussions avisées et passionnantes qui s'en sont suivies, sur nos résultats et le métabolisme en général, j'ai été vraiment ravie de collaborer avec vous.

Je tiens aussi à adresser un grand remerciement à l'ensemble de l'équipe 1 du BRIC au B2, qui accueillent une partie d'entre nous à temps complet, et les autres squatteurs comme moi presque à temps partiel. Merci pour votre accueil et gentillesse, pour les conseils, les manips partagées ensemble et également pour avoir partagé votre équipement avec nous aussi bien en culture que pour les nombreuses perfusions intracardiaques un peu trash qu'on a pu faire chez vous. Merci à Lucie, Thomas, Ahmad, Ouioui, Laura, Cloé...

Je remercie également le Professeur Quignard, qui m'a accueilli dans son unité d'enseignement pour deux années consécutives de mission d'enseignement, et j'adresse un grand merci spécial à Delphine et Claire, mes collègues de TP, qui m'ont beaucoup appris et m'ont toujours fait confiance.

Je souhaiterais également remercier l'ensemble des membres de l'équipe Daubon, qui ont tous participé à former une équipe sympa et solidaire, qui ont rythmé et partagé mon quotidien tout au long de ces 3 années de thèse et avec qui j'ai toujours partagé de chouettes moments, scientifiques et moins scientifiques !

Aux anciens de la team,

Un grand merci à Boutaina pour ta bienveillance et ta réflexion scientifique toujours pertinente, j'espère avoir été digne de ta succession dans le duo avec Antonio !!

Merci à Cyrielle pour ta formation technique et scientifique toujours pointue qui, je n'en doute pas, feront de toi une très bonne chercheuse.

Merci à Joris, pour ta super macro invasion qui nous sauve la vie chaque jour et surtout pour m'avoir intégré dans ton projet de thèse qui se retrouve à nouveau ici sur le devant de la scène.

Aux (à peine) moins anciens,

Thanks to you Maya, my lab and office roommate for almost 3 years already! I am grateful for the long discussions about lab and life, for the few worlds I learnt in Arabic which I will never be able to pronounce and remember, and most of all thanks for your kind and caring attentions (I will put zaatar in all my cooking and will take nice care of the aloe vera, promis!). Big up for the end of your thesis, you will do good!!

Merci également à Océane, déjà d'être la pro de l'organisation et du teambuilding, mais surtout de m'avoir aidée à mettre un pied dans le monde de l'enseignement qui, je pense, te passionne autant qu'à moi !

J'ai aussi une pensée toute particulière pour Sylvain et pour sa famille. Merci à toi Sylvain, tu nous auras fait rayonner le labo de ta bonne humeur et ton sourire, tu nous auras bien fait rire, aidé et supporté dans tous nos projets, et finalement bien chamboulé et bien manqué.

Aux (un peu) plus récents,

Un grand merci à Manon et Doriane pour votre soutien et votre implication dans les projets, pour votre bonne humeur qui illumine le labo et pour tous les bons moments passés ensemble ! Un merci particulier à Manon pour ton immense gentillesse et ton aide sur le projet résection particulièrement au moment où c'était un peu rude pour moi. Et mention spéciale à Doriane pour avoir fleuri le labo et pour nous faire des bons gâteaux, et merci à toi de m'avoir coaché à l'implantation et à la résection des souris !

Merci également aux collègues de la team délocalisés au B2 ou ailleurs : Audrey, Mathieu, Mathis, Johanna, ainsi qu'aux nouveaux arrivants Seb & Joana.

Je voudrais également remercier profondément Monsieur Arnaud Mourier et toute son équipe Claudine, Manuel, Philippe, Orane, Guillaume, Rose, Chloé et Camille ainsi que Thibaut parmi les anciens, aussi bien pour le support scientifique que technique tout au long de ma thèse ainsi que pour les cafés, gâteaux et rigolades partagés.

Un grand merci Arnaud de m'avoir accueillie dans l'équipe et de m'avoir transmis un peu de ta passion pour la science. J'ai adoré discuter avec toi (parfois très très longtemps) des joies de l'étude de la mitochondrie et merci d'avoir toujours pris le temps de te plonger dans la réflexion scientifique de mes projets.

Je remercie aussi spécialement Claudine et Thibaut pour toute la formation technique et leurs nombreux conseils, des Western Blots jusqu'à la respi.

Merci également à toutes les équipes de l'IBGC qui m'auront presque toutes vues passer au gré des 5 déménagements, et spécialement à l'équipe de Muriel Priault et Déborah Tribouillard-Tanvier pour nous avoir si bien accueilli dans vos labos.

Un petit clin d'œil également à la super team des jeunes de l'IBGC (en tant que madre officielle, je me permets!) : Claire, Landry, David, Irène, Tom, Guillaume, Orane, Léa, Camille, Dorian, ainsi que tous ceux que j'ai déjà cités et ceux que j'oublie certainement ! A tous les chouettes moments ensemble, les crêpes du vendredi, les verres au Petit Q, les matchs et encore les verres au bar (apparemment il y a un thème quand même).

Mention spéciale à mes coquines préférées,

Merci à toi Orane d'être le plus mignon rayon de soleil du labo, de ta bonne humeur, de tes blagues presque toujours marrantes, de tes expériences culinaires, de ton talent inégalé d'organisatrice sociale mais surtout de l'aide, du soutien et de tous les bons moments depuis notre bureau partagé chez Arnaud jusqu'à aujourd'hui.

Merci aussi à toi Guigui, petit Guigui de master 1 devenu grand, merci pour les nombreuses rigolades, et surtout qu'on se le dise, pour cette danse de Shakira inoubliable.

Et merci Tom, parce que même si tu râles tout le temps, on t'aime énormément quand même. Plus sérieusement, ne change rien Tomitom !

Au-delà des collaborateurs et collègues, je souhaiterais aussi adresser mon immense gratitude à mes proches, qui m'ont suivie, encouragée et soutenue depuis le premier jour, et à qui je dois pour beaucoup mon parcours.

A mes amis,

Un tout grand merci à mon gang de zouzes sur qui je peux toujours compter : Jade, Jeanne, Cam's, Math B., Math P., Louise, Mamel, Yulie, Margot, Chacha et Célia. Merci pour le soutien tout du long de cette thèse mais aussi bien avant, dans les coups de mou comme dans les bons moments, merci pour ces milliers de souvenirs créés ensemble et qui sont toujours comme un petit baume au cœur. Je me réjouis de voir chacune de vos jolies personnalités s'épanouir et briller dans la vie.

Au quatuor de Suricates, merci à vous Nathan et Caroline d'être toujours présents même de (un peu) plus loin. Toujours dispo pour rigoler, célébrer ou trinquer aux bonnes occasions, et il n'est pas difficile de se les créer (cf depuis Édimbourg à aujourd'hui (vous nous devez toujours un billet d'avion)).

Un grand merci aussi à Lorène et Jérémie pour votre amitié sans faille, votre rire communicatif (coucou Lorène !) et vos chouettes valeurs qui font du bien. Rdv très bientôt pour gagner de nouveaux quizz et pour descendre jusqu'à Bayonne en vélo !

A Boubou et Lucie, merci les copains de longue date, bravo à vous les doc et rendez-vous dans notre futur centre de recherche contre le cancer !

Une pensée aussi à ma Momo du love, notre futur grand capitaine (pirate), aventurière inspirante et joli rayon de soleil que je suivrai jusqu'au bout du monde.

A ma famille,

Un grand merci pour les petits coups de téléphone de mes grands-parents du Lot-et-Garonne juste pour me dire qu'ils pensent à moi, pour les jolis rosiers et toutes les petites attentions qui comptent.

Un merci spécial à ma tante Pascale pour toutes nos longues discussions sur les choses de la vie. Merci encore et toujours de m'avoir soutenue sans faille tout au long de ce projet de thèse et de me guider dans toutes les étapes de ma vie.

A ma cousine Jeanne, merci d'être une bouffée d'air frais, drôle et franche, dans toutes nos aventures, depuis les soirées étudiantes jusqu'aux cours de salsa, et hâte de vivre ensemble toutes les prochaines !

Merci à tous les Larrieu pour les dimanches en famille autour du feu, les discussions sur l'avenir, les jeux de société, les bons repas et les fêtes de Chapelle tous ensemble !

A mon père Jean-Bernard, qui m'a montré depuis toujours l'importance de concilier métier et passion. Merci pour tes petites attentions quand on rentre respirer l'air pur béarnais. J'espère que tu es fier de moi, car moi je suis fière de toi.

A la meilleure sœur du monde, Pauline, qui d'ailleurs relit ma thèse depuis l'autre bout de la planète, un immense merci à toi. Merci d'être cette belle personne à la générosité sans égal. Merci de ton amour inconditionnel bien que tu aies dû me supporter toutes ces années comme petite sœur, merci de m'avoir tiré vers le haut et donné l'exemple. Merci à vous deux de m'avoir toujours épaulée, dans les bons comme les moins bons moments. Allan, merci pour ta présence et ta gentillesse, de ton œil avisé et ton oreille attentive, et merci de compléter si bien ma super sistah de la mort (ps : nous sommes preneurs de ta recette de pâtes carbo).

J'adresse aussi un très grand et chaleureux merci à Gabriela et Michel. Merci d'avoir toujours une pensée pour moi, un petit mot, ou une attention (sous la forme par exemple de délicieux petits plats !!) qui me font toujours sentir de la famille. Merci de votre soutien de chaque instant tout au long de cette thèse, et dans la vie en général.

Merci également à Andreas et Indri, toujours de bons supporters, derrière moi pour la thèse ou ensemble dans les tribunes !

Et surtout, merci à Stephen. S'il est une personne à qui je dois dédicacer ce manuscrit c'est bien à toi. Merci d'être un fabuleux et inspirant pilier de vie au quotidien et le meilleur ami, confident, soutien, et amoureux que l'on puisse avoir. Merci de m'encourager à être la meilleure version de moi-même, de me faire rire et de rire encore à (presque) toutes mes blagues. Je n'aurai jamais assez de mots pour t'exprimer à quel point je te suis reconnaissante, merci pour tous ces moments doux qui réconfortent et rendent plus forte. Merci de partager et d'illuminer ma vie depuis déjà toutes ces années, vivement la suite de nos projets et belles aventures.

Enfin, bien sûr, à toi Mams, toi qui n'es pas là mais à qui je dois tout. Cette thèse est pour toi.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	11
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX.....	16
INTRODUCTION.....	17
I- SYSTÈME NERVEUX CENTRAL ET TUMEURS CÉRÉBRALES	23
A. Le système nerveux central	23
1. Organisation générale du système nerveux central	23
2. Populations cellulaires cérébrales	24
2.1. Les neurones, messagers de l'information nerveuse	25
2.2. La glie, un compartiment fonctionnel, de soutien et de régulation	26
2.3. Microglie et autres cellules immunitaires : une immunité cérébrale très spécifique	29
B. Les tumeurs du système nerveux central	30
1. Epidémiologie et facteurs de risque	30
2. Classification des tumeurs cérébrales	31
2.1. La génétique s'invite dans la classification.....	31
2.2. Gradation des tumeurs cérébrales.....	34
II- LE GLIOBLASTOME.....	36
A. Origine et physiopathologie	36
1. Caractéristiques histopathologiques et progression du GB.....	36
2. Origine des glioblastomes.....	39
3. Classification.....	40
4. Hétérogénéité et plasticité des GB	42
1.1. Hétérogénéité intra-tumorale.....	43
1.2. Plasticité cellulaire dans le GB	46
1.3. Influence et échanges avec le microenvironnement	47
B. Prise en charge thérapeutique.....	50
1. Diagnostic et symptomatologie du glioblastome	50
1.1. Signes cliniques	50
1.2. Imagerie cérébrale.....	51
1.3. Analyse de biopsie : histopathologie et recherche d'altérations géniques	51
2. Prise en charge et traitements	52
2.1. Standard thérapeutique et suivi de progression des GB	52
2.2. Traitements symptomatiques.....	55
2.3. Traitement des récurrences	55
C. Explorations et challenges thérapeutiques dans le GB	57
1. Une localisation sensible.....	57
2. Le SNC : un système bien protégé	58
3. Exploiter les spécificités du GB : avancées thérapeutiques et essais cliniques actuels	60
3.1. Inhiber l'angiogenèse tumorale.....	60
3.2. Dérégulations génétiques et thérapies ciblées.....	61
3.3. Ciblage de populations spécifiques.....	62
3.4. Technologies spécifiques pour le traitement du GB	64
4. Mécanismes d'échappement et de résistances : plasticité et hétérogénéité du GB au cœur des challenges thérapeutiques	65
III- CANCER & METABOLISME.....	67
A. Métabolisme énergétique cérébral	67
1. Généralités	67
1.1. La glycolyse.....	68
1.2. La mitochondrie et le système des oxydations phosphorylantes	69
1.3. La fermentation lactique	71
2. Organisation métabolique cérébrale	71
2.1. Organisation métabolique et activité cérébrale	71
2.2. Focus sur le rôle du lactate.....	73
2.3. Equilibre redox	75
B. Métabolisme et cancer : état des lieux dans le GB.....	77

MODÈLES & MÉTHODES EXPÉRIMENTAUX	83
I. MODÈLES EXPÉRIMENTAUX	85
A. Modèles in vitro	85
1. Lignées cellulaires dérivées de patients	85
1.1. Extraction à partir de biopsie fraîche et établissement de lignées cellulaires.....	85
1.2. Conditions de culture et d'entretien des lignées cellulaires : cellules de type souche et modèle 3D de sphéroïdes	86
1.3. Principaux modèles cellulaires utilisés dans le laboratoire	87
2. Autres modèles de glioblastome humain disponibles.....	87
2.1. Lignées cellulaires commerciales	87
2.2. Xénogreffes dérivées de patient (PDX).....	88
B. Modèles in vivo	88
1. Modèle in vivo de glioblastome	88
2. Modèle in vivo de résection tumorale.....	90
II. TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES PHARES	92
A. Expérimentations in vitro	92
1. Standardisation de la culture cellulaire en 3D	92
2. Analyse de la progression du GB.....	92
2.1. Analyse de la prolifération cellulaire : expérience de croissance de sphéroïdes.....	93
2.2. Analyse des capacités de prolifération : marquage EdU sur cellules dissociées	93
2.3. Analyse des capacités invasives : invasion de sphéroïdes en matrice de collagène	94
3. Analyses métaboliques et fonctionnelles	94
3.1. Western Blot.....	94
3.2. Immunofluorescence sur cellules.....	95
3.3. Analyse de l'activité mitochondriale : Respiration cellulaire, potentiel de membrane mitochondrial, masse mitochondriale.....	96
3.4. Dosage de la production de ROS intracellulaire.....	97
3.5. Dosage enzymatique de la concentration de lactate intra- et extra-cellulaire	98
3.6. Dosage de métabolites intra- et extra-cellulaire par chromatographie ionique (Integrion).....	98
B. Expérimentations in vivo / ex vivo	99
1. Expérimentation in vivo	99
2. Bioluminescence in vivo	99
3. Immunohistochimie	99
4. Microdissection par capture laser (LCM).....	100
5. Clearing de cerveaux murins	101
6. Imagerie métabolique par spectrométrie de masse sur coupes	102
RÉSULTATS.....	103
PARTIE I : SYMBIOSE MÉTABOLIQUE DANS LE GLIOBLASTOME.....	105
I. ÉTUDE DE L'IMPLICATION DES LACTATE DÉSHYDROGENASES DANS LA PROGRESSION DES GB.....	105
A. Expression différentielle des isoformes LDHA et LDHB dans des zones tumorales spécifiques	106
B. Le lactate est un moteur de la progression du GB.....	108
C. Le blocage des LDHs et de la production de lactate altère la progression du GB.....	109
1. Suppression génétique des isoformes LDHA et LDHB	109
2. Blocage pharmacologique des LDHs, vers le repositionnement thérapeutique du stiripentol	111
D. Le blocage des LDHs induit une réorganisation métabolique mitochondriale	112
II. ÉTUDE DE L'IMPLICATION DES PYRUVATE DÉSHYDROGÉNASE KINASES DANS LA PROGRESSION DES GB.....	115
PARTIE II : ADAPTATIONS MÉTABOLIQUES POST-RÉSECTION TUMORALE	137
I. DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES D'ÉTUDES POUR LA RÉSECTION	139
A. Modèle in vivo	139
1. Amélioration de la technique chirurgicale.....	139

2. Validation de l'efficacité du modèle de résection et reproductibilité.....	140
2.1. Validation histologique.....	140
2.2. Validation par suivi de bioluminescence tumorale.....	141
2.3. Validation de la sécurité pour l'animal.....	142
B. Modèle in vitro.....	143
II. ADAPTATIONS MÉTABOLIQUES POST-RÉSECTION TUMORALE.....	146
A. La résection tumorale prive les cellules invasives résiduelles de leur source carbonée privilégiée, le lactate.....	146
B. La résection tumorale induit des modulations métaboliques dans les cellules résiduelles in vivo	147
1. Analyse moléculaire de l'expression de gènes métaboliques.....	147
2. Analyse histologique dans le modèle in vivo de résection.....	148
C. La privation de lactate module l'activité métabolique des cellules P3 in vitro : impact sur les capacités de prolifération et invasion.....	151
1. Impact sur l'activité mitochondriale	153
2. Effets sur les capacités de progression du GB	155
3. Modulations protéiques induites par la privation de lactate	156
D. Vers une approche thérapeutique : modulation métabolique pour contrer la rechute tumorale	158
1. Altération de la production ou l'utilisation de lactate : le stiripentol comme thérapie complémentaire à la résection	158
2. Traitement MitoTEMPO : inhibition de la signalisation ROS induite par la résection.....	159
DISCUSSION & CONCLUSIONS	161
PARTIE I : SYMBIOSE METABOLIQUE DANS LE GB, LE ROLE CENTRAL DU LACTATE.....	163
A. Expression spatiale régiolocalisée des acteurs du métabolisme du lactate	163
B. Altération du métabolisme du lactate et progression du GB	166
C. Plasticité métabolique thérapie-induite : quand les cellules de GB s'adaptent pour échapper aux traitements	167
D. Perspectives thérapeutiques	169
PARTIE II : ADAPTATIONS METABOLIQUES POST-RESECTION TUMORALE.....	171
A. Résection tumorale et métabolisme du lactate.....	171
B. Établissement et validation de modèles in vitro et in vivo d'études pour la résection du GB ..	172
C. Conséquences métaboliques et phénotypiques de la privation de lactate liée à la résection ..	173
D. Vers la mise en place de thérapies métaboliques pour prévenir la rechute du GB.....	177
E. Des limites imposées par les modèles	178
CONCLUSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES	181
RÉFÉRENCES	185
ANNEXES	216
LISTE DES PUBLICATIONS	220
ABSTRACT.....	222

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-ALA : acide 5-aminolevulinique	DAM : <i>Disease associated microglia</i> , ou microglies associées aux maladies
ABC : Transporteurs des xénobiotiques	DCA : Dichloroacétate
AC-like : <i>Astrocyte-like</i>	EC : Extracellulaire
ADN : Acide désoxyribonucléique	EEG : Electro-encéphalogramme
ADAMs : <i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>	EGF : Epidermal growth factor
ADP : Adénosine diphosphate	EGFR : Récepteur à l'EGF
AKT ou PKB : Protéine kinase B	EGFRvIII : variant III de l'EGFR
AMP : Adénosine monophosphate	FAD : Flavine adénine dinucléotide
AMPc : AMP cyclique	FDA : <i>Food and Drug Administration</i>
ANLS : <i>Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle</i> , ou Navette lactate entre astrocytes et neurones	FLAIR : <i>Fluid attenuated inversion recovery</i>
ARN : Acide ribonucléique	FGF : <i>Fibroblast growth factor</i>
ATP : Adénosine triphosphate	GABA : acide γ -aminobutyrique
ATRX : <i>α-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>	GB : Glioblastome
BAM : <i>Border associated macrophages</i> , ou macrophages associés aux bordures	GFP : <i>Green Fluorescent protein</i>
BHE : Barrière hémato-encéphalique, ou BBB : <i>blood-brain barrier</i>	GLUT : Transporteurs du glucose
BRAF : Gène codant pour la protéine B-Raf	GPR81 (ou HCAR1) : <i>G-protein-coupled receptor 81 (ou hydroxycarboxylic acid receptor 1)</i>
CAIX : Carbonic anhydrase IX	GSH : Glutathion sous forme réduite
CAR : <i>Chimeric Antigen Receptor</i>	GSSG : Glutathion sous forme oxydée
CAR-T : lymphocyte modifié par ajout de CAR	HCl : Acide chlorhydrique
CDKN2A/B ou ARF : <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2 A/B</i>	HER2 : <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-2</i>
CD44 : cluster de différenciation 44	HIF : <i>Hypoxia Induced Factor</i>
CSGs : Cellules type-souche de GB, ou <i>Glioblastoma Stem-cells (GSCs)</i>	IC : Intracellulaire
CSNs : Cellules souches neurales	ICI : Inhibiteurs de checkpoint immunitaire
CTLA-4 : Antigène 4 des lymphocytes cytotoxiques	IDH : Isocitrate déshydrogénase
CoA : Coenzyme A	IL-x : Interleukine-x
	IP : Intra-péritonéal
	IRM : Imagerie par résonance magnétique
	IRMf : IRM fonctionnelle

KPS : Indice de Karnofsky

KO : Knock-out

LCS : Liquide cérébro-spinal

LDH A/B : Lactate déshydrogénase A/B

LT : Lymphocyte T

LTP : Potentialisation à long terme

Luc : Luciférase

MALDI-MSI : Imagerie par spectrométrie de masse

MAPK : Voie des MAP kinases

MCTs : Transporteurs des monocarboxylates

MDM2/4 : *Murine double minute 2/4*

MEC : Matrice extracellulaire

MEK : *Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase*

MES-like : *Mesencymal-like*

MGMT : *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*

MIM : Membrane interne mitochondriale

MMP : Métalloprotéases matricielles

MMR : Système de réparation de l'AND
Mismatch Repair

MMSE : *Mini-Mental state examination*

MoCA : *Montreal cognitive assessment*

MPC : *Mitochondrial Pyruvate Carrier*

MRC : *Medical research council*

mTOR : *mamalian target of rapamycin*

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NB : Neurobasal

NES : Gène codant pour la nestine

NF1 : Gène codant pour la neurofibrine 1

NFκB : Facteur nucléaire κB

NG2 : Neuron-glia antigen 2

NKs : Lymphocytes *Natural Killer*

NO : Oxyde nitrique

NPC-like : *Neural progenitor-like*

NRF2 : *Nuclear factor-erythroid 2-related factor-2*

OLIG2 : Facteur de transcription oligodendrocytaire

OMS : Organisation mondiale de la Santé

OPCs : *Oligodendrocyte progenitor cell*, ou cellule progénitrice des oligodendrocytes

OPC-like : *Oligodendrocyte progenitor-like*

OxPhos : Système des oxydations phosphorylantes

PBS : Tampon phosphate

PD-1 : *Programmed cell death protein 1*

PD-1 : *Programmed cell death protein 1 Ligand*

PDX : Xénogreffe dérivée de patient

PDGFRA : *Platelet derived growth factor receptor alpha*

PDH : Pyruvate déshydrogénase

PDHK : Pyruvate déshydrogénase kinase

PFKFB3 : 6-phosphofructose-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3

PI3K : *Phosphoinositide 3 kinase*

PMM : Potentiel de membrane mitochondrial

PPP : Voie des pentoses phosphate

PS : Indice de Performance Status

PTEN : *Phosphatase and Tensin homolog*

RANO : *Response Assessment in Neuro-Oncology*

RB1 : Protéine retinoblastoma 1

RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

ROS : Espèces radicalaires de l'oxygène

RTK : Récepteur à Tyrosine kinase

SI : Système immunitaire

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

SOX2 : *SRY-box transcription factor 2*

TCA : *Tricarboxylic acid cycle, ou cycle de Krebs, ou cycle de citrate*

TCGA : The Cancer Genome Atlas

TERT : *Telomerase reverse transcriptase*

TGF : *Transforming growth factor*

TMRM : Tetraméthylrhodamine

TMZ : Témazolomide

TNF α : *Tumor Necrosis factor α*

TP53 : Tumor protein 53

TTFs : *Tumor Treating Fields*

UNV : Unité neurovasculaire, ou NVU : *neurovascular unit*

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

YKL40 : protéine 1 de type-chitinase 3

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : NEUROANATOMIE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL (ADAPTE DE KANDEL ET AL., 2021 [1]).	24
FIGURE 2 : PRINCIPALES MODALITES DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE (EXTRAIT ET ADAPTE DE PEREDA, 2014 [15]).	26
FIGURE 3 : L'UNITE NEUROVASCULAIRE (NVU) ET LA SYNAPSE TRIPARTITE, EXTRAIT DE KUGLER ET AL., 2021 [27].	28
FIGURE 4 : OLIGODENDROCYTES ET MYELINE.	28
FIGURE 5 : ALTERATIONS GENETIQUES PERMETTANT LA CLASSIFICATION DES PRINCIPAUX GLIOMES (ADAPTE DE LOUIS ET AL. [61]).	32
FIGURE 6 : IRM DE GB DANS LE LOBE FRONTAL GAUCHE AVANT ET APRES RESECTION, PUIS APRES RECURRENCE (EXTRAIT DE [99]).	37
FIGURE 7 : ALTERATIONS GENETIQUES SOUTENANT LA SURVIE ET LA PROLIFERATION DU GB : 3 VOIES DE SIGNALISATIONS CENTRALES (EXTRAIT DES TRAVAUX DE THE CANCER GENOME ATLAS (TCGA) RESEARCH NETWORK [76]).	38
FIGURE 8 : REPRESENTATION DES DIFFERENTS ETATS CELLULAIRES DANS LE GB, D'APRES NEFTEL ET AL., 2019 [108].	41
FIGURE 9 : FACTEURS INFLUENÇANT L'HETEROGENEITE ET LA PLASTICITE DES GLIOBLASTOMES (D'APRES YABO ET AL., 2022 [127]).	43
FIGURE 10 : HETEROGENEITE INTRA-TUMORALE DES GLIOBLASTOMES (D'APRES COMBA ET AL., 2021 [133]).	44
FIGURE 11 : IRM CEREBRAL D'UN PATIENT ATTEINT DE GLIOBLASTOME DANS LE LOBE TEMPORAL DROIT (EXTRAIT DE OMURO & DEANGELIS, 2013 [168]).	51
FIGURE 12 : SCHEMA THERAPEUTIQUE DU PROTOCOLE STUPP.	52
FIGURE 13 : TRACTOGRAMME DU CERVEAU HUMAIN, D'APRES [52].	57
FIGURE 14 : STRATEGIES IMMUNOTHERAPEUTIQUES EN COURS D'EVALUATION DANS LE GB (EXTRAIT DE SEGURA-COLLAR ET AL., 2023 [253]).	62
FIGURE 15 : PLASTICITE CELLULAIRE DANS LE GLIOBLASTOME, EXTRAIT ET ADAPTE DE GIMPLE ET AL., 2022 [147].	66
FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA GLYCOLYSE.	68
FIGURE 17 : LE DEVENIR MITOCHONDRIAL DU PYRUVATE, CYCLE DE KREBS ET OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES, EXTRAIT DE [294].	70
FIGURE 18 : FERMENTATION LACTIQUE ASSUREE PAR LES LDH DANS LE CYTOSOL.	71
FIGURE 19 : CONCEPT D'ASTROCYTE-NEURON LACTATE SHUTTLE, DECRIT INITIALEMENT PAR PELLERIN ET MAGISTRETTI [29] (SCHEMA EXTRAIT ET ADAPTE DE [302]).	73
FIGURE 20 : SCHEMA DE L'APPAREIL STEREOTAXIQUE ET DES COORDONNEES D'IMPLANTATION.	89
FIGURE 21 : TIMELAPSE DU DEROULEMENT D'UN PROTOCOLE DE RESECTION TUMORALE IN VIVO.	91
FIGURE 22 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROTOCOLE DE FORMATION, DE CROISSANCE ET D'INVASION DES SPHEROÏDES.	92
FIGURE 23 : EXPERIENCE DE CROISSANCE DE SPHEROÏDES.	93
FIGURE 24 : INVASION D'UN SPHEROÏDE INCLUS DANS UNE MATRICE DE COLLAGENE [344].	94
FIGURE 25 : PRINCIPE DU DOSAGE ENZYMATIQUE DU L-LACTATE [357].	98
FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ZONES MICRODISSEQUEES PAR LCM SUR COUPE DE CERVEAU MURIN.	101
FIGURE 27 : EXPRESSION LOCOREGIONALE DES LDHS DANS LE GB.	107
FIGURE 28 : EFFET DU LACTATE SUR LA PROGRESSION DU GB.	108
FIGURE 29 : EFFET DU LACTATE SUR LA PROGRESSION DU GB (SUITE).	109
FIGURE 30 : MODULATION DU NIVEAU DE LACTATE INTRACELLULAIRE DANS LES CELLULES P3 sgCONT, sGLDHA, sGLDHB ET sGLDHA/B.	110
FIGURE 31 : IMPACT DES DIFFERENTS KO LDH SUR LES CAPACITES PROLIFERATIVES ET INVASIVES DES CELLULES P3 DE GB.	110
FIGURE 32 : IMPACT IN VIVO DE LA SUPPRESSION GENETIQUE DES LDHS.	111
FIGURE 33 : EFFET DU STIRIPENTOL SUR LA PROGRESSION DU GB.	112
FIGURE 34 : DEREGULATIONS METABOLIQUES ASSOCIEES A L'ABOLITION DES LDHS.	113
FIGURE 35 : ADAPTATIONS MITOCHONDRIALES INDUITES PAR LE KO DE LDHA/B.	113
FIGURE 36 : REPRESENTATION HISTOLOGIQUE DE CERVEAUX MURINS IMPLANTES AVEC DES CELLULES P3, RESEQUEES OU NON.	140
FIGURE 37 : EVOLUTION HISTOLOGIQUE DES TUMEURS P3 : CROISSANCE ET RESECTION.	141
FIGURE 38 : SUIVI DE LA BIOLUMINESCENCE ET VALIDATION DU MODELE DE RESECTION TUMORALE.	142
FIGURE 39 : EVOLUTION DES POIDS ET DE LA SURVIE DES SOURIS IMPLANTEES ET RESEQUEES.	143
FIGURE 40 : MODELE IN VITRO DE FLUCTUATION DE LACTATE.	144
FIGURE 41 : DETECTION DE LA CONCENTRATION DE LACTATE SUR COUPES HISTOLOGIQUES.	146
FIGURE 42 : IMPACT DE LA RESECTION TUMORALE SUR L'EXPRESSION DES GENES IMPLIQUES DANS LE METABOLISME DU GLUCOSE ET LACTATE.	148
FIGURE 43 : PROTOCOLE D'ANALYSE HISTOLOGIQUE.	149
FIGURE 44 : ANALYSE IMMUNOHISTOLOGIQUE DE LA ZONE INVASIVE POST-RESECTION.	150
FIGURE 45 : CONCENTRATIONS INTRA- ET EXTRACELLULAIRES DE LACTATE DANS LES CELLULES P3.	152

FIGURE 46 : CONTENU ADENYLIQUE DES CELLULES P3 EXPOSEES A DES FLUCTUATIONS DE LACTATE.	153
FIGURE 47 : ACTIVITE ET CONTENU MITOCHONDRIaux DANS LES CELLULES P3 TRAITEES, PUIS PRIVEES OU NON DE LACTATE.	154
FIGURE 48 : INFLUENCE DE LA FLUCTUATION DE LACTATE SUR LA PRODUCTION DE ROS DANS LES CELLULES P3.	154
FIGURE 49 : CAPACITES INVASIVES ET PROLIFERATIVES DES CELLULES P3 SOUMISES A DES FLUCTUATIONS DE LACTATE.	155
FIGURE 50 : SCREENING PAR WESTERN BLOT DE L'EXPRESSION D'ACTEURS METABOLIQUES DANS LES CELLULES P3, COMPLEMENTEES OU PRIVEES DE LACTATE.	157
FIGURE 51 : INFLUENCE DU STIRIPENTOL SUR L'EVOLUTION DE LA CROISSANCE TUMORALE POST-RESECTION IN VIVO.	158
FIGURE 52 : INFLUENCE DU TRAITEMENT MITOTEMPO SUR LA REPOUSSE TUMORALE POST-RESECTION.	159
FIGURE 53 : CLICHES IRM PONDERES T1 ET T2 AVANT ET APRES RESECTION TUMORALE DE GB (D'APRES KARSCHNIA ET AL., 2023 [169]).	172

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION DES GLIOMES, TUMEURS GLIONEURONALES ET NEURONALES D'APRES L'OMS (EXTRAIT ET ADAPTE DE LA 5^{EME} EDITION DE LA CLASSIFICATION DES TUMEURS DU SNC DE L'OMS, 2021 [73]).	35
--	----

INTRODUCTION

“The principles of neural science do not reduce the complexity of human thought to a set of molecules or mathematical axioms. Rather, they allow us to appreciate a certain beauty –a Darwinian elegance– in the complexity of the brain that accounts for mind and behavior.”

Eric R. Kandel, Principles of neural science (6th ed.),

“The most important factor in survival is neither intelligence nor strength but adaptability.”

Charles Darwin, On the origin of species, 1859.

S'il est un sujet pour lequel Darwin et Kandel se complètent si bien, c'est certainement dans l'étude du rôle impactant que joue le cerveau dans l'évolution de l'être humain.

Les générations scientifiques précédentes ont construit un socle solide de connaissances en biologie humaine, avec un focus particulier sur la génétique au siècle dernier, mais une part grandissante de la communauté scientifique du XXI^e siècle se penche désormais sur la biologie du cerveau et de l'esprit, aussi appelée neurobiologie. Comment en effet ne pas s'intéresser à cet organe (de seulement 1,5 kg) responsable à lui seul de la création du savoir, des pensées, de la mémoire, des émotions ou encore des actions déterminant l'individualité de chaque être humain ? Comment étudier alors un système si petit et si complexe, siège d'extraordinaires interconnexions et régulations ?

Les neurosciences apparaissent comme une science moderne à l'interface entre neurophysiologie, anatomie, biologie cellulaire, moléculaire mais aussi psychologie [1]. Autrefois appréhendées par le simple biais de la dissection anatomique, de nombreuses avancées technologiques en imagerie médicale, et notamment en neuro-imagerie, ont permis au fil des années de décrypter le fonctionnement cérébral de manière moins invasive [2] (à noter : les études des Dr. H. Berger et W. Grey Walter, pionniers de l'électro-encéphalogramme ou EEG [3] ; puis l'apparition de l'imagerie par résonance magnétique ou IRM et son application fonctionnelle IRMf [4]). L'observation fonctionnelle, en action, a donné lieu à l'identification de régions cérébrales impliquées dans des fonctions mentales et périphériques spécifiques [5–7]. En effet, le système cérébral ne contrôle pas uniquement les fonctions motrices simples mais également de nombreuses fonctions primaires essentielles à la vie ainsi que l'ensemble des comportements et cognitions de l'être humain [8].

Ainsi, l'ensemble des troubles psychiatriques résulte directement de perturbations du fonctionnement cérébral ; et inversement, un bouleversement de l'organisation ou de la fonction cérébrale tant sur le plan anatomique que cellulaire ou moléculaire, comme c'est le cas par exemple dans les cancers cérébraux, induira nécessairement d'importantes répercussions fonctionnelles au niveau psychique et/ou somatique.

D'ailleurs, la neurooncologie moderne utilise désormais les outils et technologies issues des neurosciences afin de prendre en compte la vaste complexité du cerveau dans l'étude des interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement.

Si l'on aborde la thématique de l'adaptabilité et de l'évolution, un autre acteur incontournable s'impose alors sur la scène médicale, la pathologie cancéreuse. Si dévastateur qu'il puisse être pour l'homme, le cancer apparaît pourtant être, sur bien des plans, un modèle impressionnant d'évolution cellulaire : des cellules « immortelles », détournant la majorité des

systèmes physiologiques à leur avantage, et gagnant haut la main le défi de la sélection clonale et de l'adaptation aux contraintes environnantes contre leurs homologues saines.

Dès les débuts de l'oncologie, la communauté scientifique et médicale œuvre au décryptage des mécanismes d'adaptation mis en œuvre par le cancer pour survivre, se développer et, secondairement, résister aux thérapies. Une piste émergente prenant de plus en plus d'ampleur ces dernières années, à mi-chemin entre recherche fondamentale et recherche thérapeutique, s'intéresse au métabolisme de ces cellules cancéreuses. Ces dernières, loin de créer de nouvelles voies métaboliques propres, semblent finalement emprunter des voies physiologiques bien connues et caractérisées, et les adaptent pour soutenir leur progression.

A cheval entre les passionnantes, complexes et exigeantes thématiques des neurosciences et de l'oncologie, les travaux présentés dans ce manuscrit abordent la plasticité métabolique d'un cancer cérébral agressif, le glioblastome, et souhaitent essayer d'en décrypter une partie des mécanismes, en lien avec le métabolisme du lactate.

I- SYSTÈME NERVEUX CENTRAL ET TUMEURS CÉRÉBRALES

Le cerveau humain est un réseau de plus de 80 milliards de neurones interconnectés, formant des systèmes appelés circuits neuronaux, et d'au moins autant de cellules gliales assurant support et interconnexions avec les fibres nerveuses. Il représente l'un des systèmes les plus complexes du corps humain, tant sur le plan biologique que sur le plan fonctionnel puisqu'il est responsable de tous les caractères définissant « l'humanité » et est impliqué dans le fonctionnement de nombreuses fonctions vitales.

De par la colonisation de ce système si particulier qu'est le cerveau, les tumeurs du système nerveux central forment une catégorie particulière de cancer, souvent caractérisées par leur agressivité et leur hétérogénéité. La complexité liée à leur localisation fait émerger de nombreuses répercussions défavorables pour les patients, d'importantes difficultés dans le processus thérapeutique et reste, à ce jour, l'un des défis centraux de la recherche vers de nouveaux traitements.

A. Le système nerveux central

1. Organisation générale du système nerveux central

Le système nerveux est un organe complexe subdivisé en deux grandes entités : le système nerveux central (SNC) qui englobe l'encéphale et la moelle épinière, et le système nerveux périphérique (SNP) formé de tout le reste du système nerveux, soit les ganglions et nerfs périphériques.

Le SNC est lui-même séparé en 7 principales structures (*Fig. 1*) :

- La **moelle épinière** est la partie la plus caudale du SNC en charge de recevoir les informations sensorielles du corps et de contrôler le mouvement ;
- Le **bulbe rachidien** ou moelle allongée (*medulla oblongata*, myélocéphale) rassemble des centres en charge du contrôle de fonctions vitales autonomes telles que la respiration pulmonaire, la fréquence cardiaque... ;
- Le **pont** (métencéphale) envoie des informations motrices du cerveau vers le cervelet ;
- Le **cervelet**, postérieur au pont, est un centre moteur crucial. Il est le siège du contrôle de l'équilibre et de la coordination motrice mais participe également à des fonctions cognitives supérieures, comme par exemple la socialisation [9,10].
- Le **mésencéphale** est également impliqué dans la réponse sensori-motrice, et la coordination. Avec le pont et le bulbe rachidien, ils forment le tronc cérébral [11].

- Le **diencéphale** se place en position centrale dans le cerveau. Il est principalement formé de deux structures, le thalamus et l'hypothalamus, centres essentiels respectivement pour le relai sensori-moteur vers le cerveau et pour la régulation métabolique du corps via le système neuroendocrinien.
- Enfin, le **téleencéphale**, communément appelé cerveau ou encéphale, est la partie la plus rostrale du SNC. Il se compose de deux hémisphères symétriques reliés par un regroupement de fibres nerveuses myélinisées formant une structure appelée corps calleux. Chaque hémisphère cérébral se divise en 4 lobes distincts (frontal, pariétal, temporal et occipital) associés à des fonctions distinctes malgré d'importantes interconnexions.

La neuro-imagerie a permis de montrer que l'encéphale est le siège de la majorité des cognitions opérées par l'homme [7]. Globalement, ces fonctions cérébrales sont générées dans la substance grise de l'encéphale, formée par le cortex cérébral et les noyaux gris centraux que sont les ganglions de la base (*striatum*, *globus pallidus*, noyau sous-thalamique et substance noire compacte et réticulée) et le système limbique (amygdale, hippocampe et cortex parahippocampique) [12,13]. Ces informations nerveuses sont ensuite transmises entre structures ou vers la périphérie *via* un réseau de fibres nerveuses myélinisées appelé substance blanche [14].

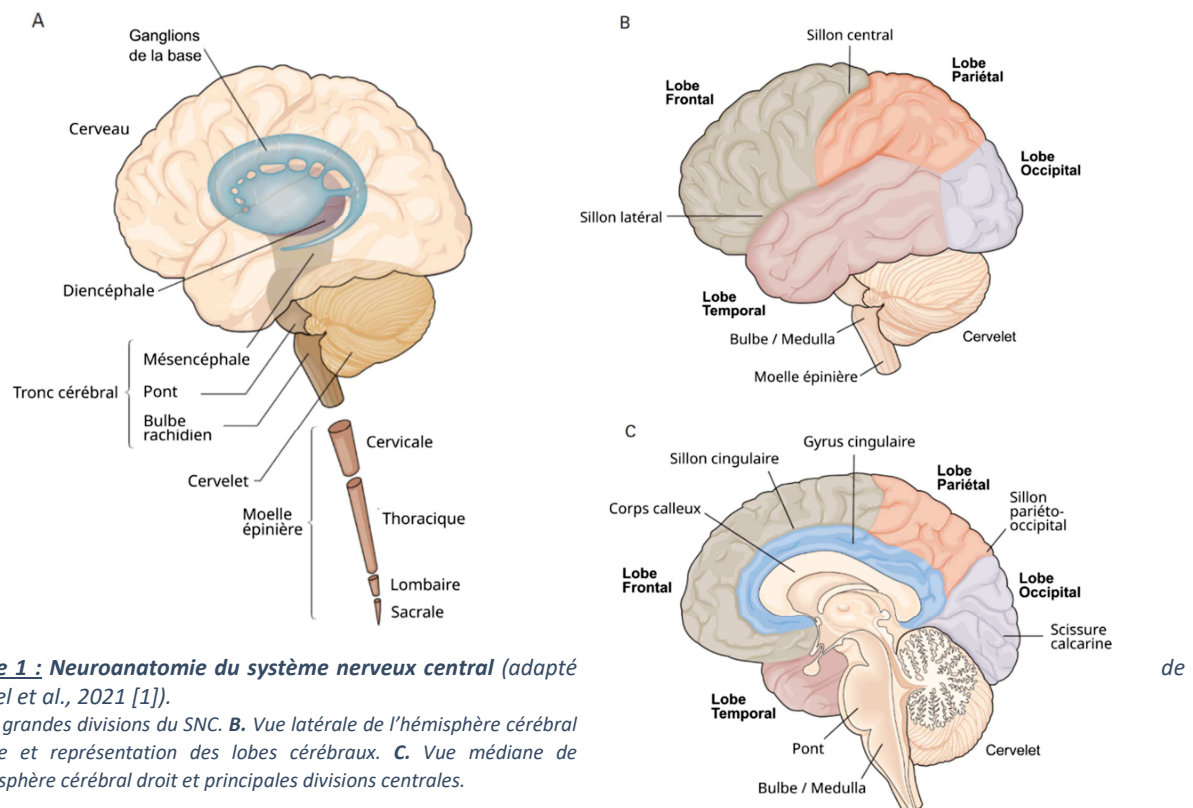


Figure 1 : Neuroanatomie du système nerveux central (adapté Kandel et al., 2021 [1]).

A. Les grandes divisions du SNC. B. Vue latérale de l'hémisphère cérébral gauche et représentation des lobes cérébraux. C. Vue médiane de l'hémisphère cérébral droit et principales divisions centrales.

2. Populations cellulaires cérébrales

La complexité du SNC réside également dans la cohabitation étroite entre de nombreux types cellulaires spécialisés. En effet, la connectivité intercellulaire mise en place au sein des réseaux cérébraux, appelée connectome, représente le mécanisme principal de transfert d'information dans le cerveau.

Deux grandes catégories de cellules se distinguent : les cellules nerveuses, ou neurones, et les cellules gliales, ou glie. Longtemps sous-estimée par rapport à la population neuronale, la glie a été montrée ces dernières années comme étant à la base de nombreuses fonctions et régulations essentielles au fonctionnement du cerveau et au maintien de son homéostasie.

2.1. Les neurones, messagers de l'information nerveuse

Les neurones sont les principaux acteurs de la transmission du signal dans le système nerveux. Leur morphologie particulière est directement adaptée à leur fonction et sera modulée selon leur localisation ou l'information qu'ils reçoivent ou transmettent. Le corps cellulaire, constituant la substance grise cérébrale, est le centre métabolique des neurones. Il contient le noyau ainsi que l'essentiel des organites et du cytoplasme. De ce corps cellulaire émanent deux types de prolongements cytoplasmiques, axone et dendrites.

L'axone, long prolongement tubulaire, est projeté à distance du corps cellulaire et conduit des potentiels d'actions, signaux électriques membranaires responsables de la transduction du signal, jusqu'à d'autres neurones pour moduler leur activité. L'ensemble des axones du SNC forme la substance blanche.

Les dendrites sont des prolongements cytoplasmiques du corps cellulaire, plus courts, plus nombreux et plus ramifiés par rapport à l'axone. Elles vont jouer un rôle crucial dans la réception de l'information nerveuse car l'axone du neurone présynaptique projette généralement sur des dendrites du neurone post-synaptique.

La partie terminale de l'axone entre en contact avec sa cible en formant une structure très spécialisée appelée synapse. Cette synapse est définie comme la zone de jonction dynamique entre un neurone présynaptique et une cellule post-synaptique. Les neurones communiquent entre eux via deux types de synapses, présentées en *Figure 2* : les synapses électriques, jonctions serrées (*GAP junctions*) où se rassemblent des clusters de canaux intercellulaires permettant échanges d'ions et de petites molécules, ou les synapses chimiques, simple apposition de la membrane des neurones présynaptique et post-synaptique [15,16]. Les synapses électriques permettent une transmission très rapide du signal, idéale pour la synchronisation de populations de neurones ayant une fonction conjointe, par exemple pour la régulation inhibitrice exercée par les interneurones [17,18]. Les synapses chimiques forment un microenvironnement semi-fermé (d'environ 20-40 nm) appelé fente synaptique, où sont

libérées par le neurone présynaptique des vésicules de neurotransmetteurs destinés à se fixer sur les récepteurs présents à la membrane post-synaptique entrainant ainsi un signal électrique ou chimique chez la cible post-synaptique [19].

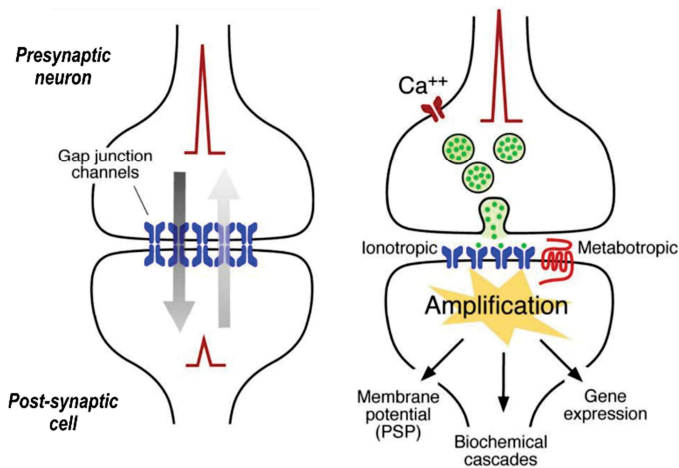


Figure 2 : Principales modalités de la transmission synaptique (extrait et adapté de Pereda, 2014 [15]).
 Gauche : La synapse électrique, transmission électrique rapide uni- ou bi-directionnelle médiée par des canaux ioniques intercellulaires.
 Droite : La synapse chimique, libération du matériel vésiculaire sous contrôle d'une dépolarisation présynaptique permettant l'activation de récepteurs post-synaptiques et l'amplification du signal nerveux.

Les récepteurs post-synaptiques sont de deux types : les récepteurs ionotropes sont des canaux ioniques et vont, une fois ouverts grâce au neurotransmetteur, médier la dépolarisation post-synaptique par des influx ou efflux ioniques ; les récepteurs métabotropes sont des récepteurs couplés aux protéines G et vont donc déclencher une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la modulation de la perméabilité membranaire, à des activations enzymatiques ou génétiques.

Les synapses sont finalement des structures très dynamiques, exprimant différents états de maturation, en constant remodelage et se distinguant par leurs nombreuses et diverses propriétés : selon le type de neurotransmetteur libéré pouvant induire un potentiel post-synaptique excitateur (glutamate, acétylcholine...) ou inhibiteur (GABA, glycine...), leur localisation, la propension à l'exocytose des vésicules synaptiques, la composition en récepteurs post-synaptiques... [20–22] Cette incroyable diversité de synapses, le « synaptome », participe grandement à la fonctionnalité et à la complexité du SNC [23].

2.2. La glie, un compartiment fonctionnel, de soutien et de régulation

La glie tire son nom du grec *glia*, signifiant « glue » et fut historiquement considérée, à tort, comme un simple tissu de soutien pour les neurones. Au contraire, si les cellules gliales n'ont pas la capacité de produire des potentiels d'actions au même titre que les neurones, ils participent à l'optimisation de la connectivité et conductivité du tissu nerveux [24,25].

De manière générale, la glie représente un ensemble hétérogène de populations cellulaires, de différentes origines et spécialisées dans différentes fonctions, assurant l'homéostasie et la protection du SNC, en conditions physiologiques mais aussi pathologiques.

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus représentées dans le cerveau [1]. Population très diverse, ils se distinguent entre sous-types par leur morphologie, leur profil moléculaire, leur localisation et distribution, et leurs fonctions [26].

Grâce à leur forme très étoilée, ils nouent d'étroits contacts avec différents compartiments cérébraux, et notamment les compartiments vasculaire et neuronal, leur assurant le titre de principal acteur du maintien de l'homéostasie métabolique au sein de l'unité neurovasculaire (UNV). L'UNV est un complexe multicellulaire (cellules endothéliales, neurones, glie, cellules musculaires lisses et péricytes) assurant la régulation des échanges métaboliques entre le sang et le SNC (*Fig. 3*) [27]. En effet, les prolongements cytoplasmiques des astrocytes, appelés pieds astrocytaires, recouvrent presque intégralement le réseau de capillaires du SNC [28]. Ceci permet aux astrocytes de capter dans la circulation sanguine de nombreux nutriments et substrats carbonés mais aussi ions, neurotransmetteurs et autres molécules indispensables au bon fonctionnement du SNC. Ils assurent ensuite le transport de ces molécules jusqu'aux neurones, avec qui ils forment d'étroits contacts. Notamment, il faut citer le modèle de navette lactate entre astrocytes et neurones (ANLS pour *Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle*), initialement décrit par Pellerin et Magistretti en 1994 [29,30], qui détaille la captation du glucose sanguin par les astrocytes, sa métabolisation en lactate *via* la glycolyse et la fermentation lactique puis le transport de ce lactate aux neurones pour approvisionner leur métabolisme oxydatif.

Au-delà du support nutritif, les astrocytes assurent également une régulation fonctionnelle essentielle de la communication cérébrale, par une action directe au niveau synaptique. Formant la « synapse tripartite » avec les structures pré- et post-synaptiques neuronales, les astrocytes se placent de manière à entourer la fente synaptique, et participent ainsi à la régulation de la libération de neurotransmetteurs dans la fente, de leur concentration et de leur durée d'action par une captation et un recyclage de ces molécules. Par leur implication et leurs échanges avec les neurones au niveau de cette structure, les astrocytes participent activement à la transmission du signal cérébral et à sa plasticité [31].

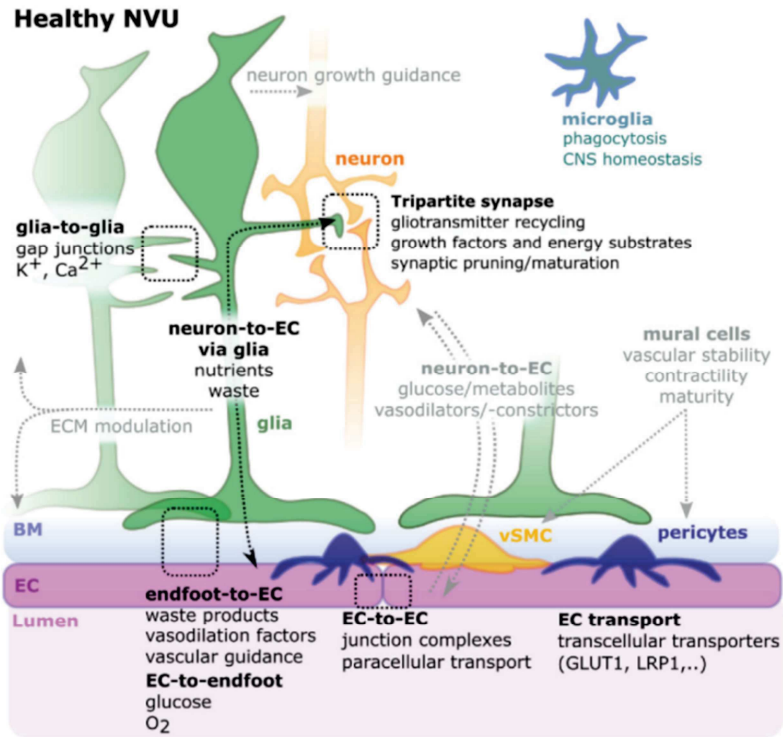


Figure 3 : L'unité neurovasculaire (NVU) et la synapse tripartite, extrait de Kugler et al., 2021 [27].

La NVU est un complexe hétérocellulaire qui rassemble cellules gliales (en vert), neurones (en orange), cellules musculaires lisses (en jaune), péricytes (bleu), microglie (gris) et vaisseaux sanguins (en violet). Cette organisation permet la formation de plusieurs structures fonctionnelles comme la barrière hémato-encéphalique (BHE), la synapse tripartite (neurone-neurone-astrocyte) ou encore différentes interactions intercellulaires directes (glie-glie, glie-cellules endothéliales...) ou indirectes (neurones-cellules endothéliales via l'intermédiaire des astrocytes, intervention de la microglie).

ECM : extra-cellular matrix ; BM : brain matter ; EC : endothelial cell ; vSMC : vascular smooth muscular cell ; CNS : central nervous system.

Les oligodendrocytes sont les acteurs clés de la conduction rapide du signal neuronal. Ils assurent la production d'une gaine de myéline, en enroulant leur membrane en couches successives autour de segments axonaux (Fig. 4). Les axones présentent donc successivement des segments entourés de myéline, et des segments non-myélinisés appelés nœuds de Ranvier (Fig. 4) ; c'est cette organisation spécifique qui permet d'accélérer (presque d'un facteur 50) la transduction du signal neuronal puisqu'il « saute » d'un nœud de Ranvier au suivant.

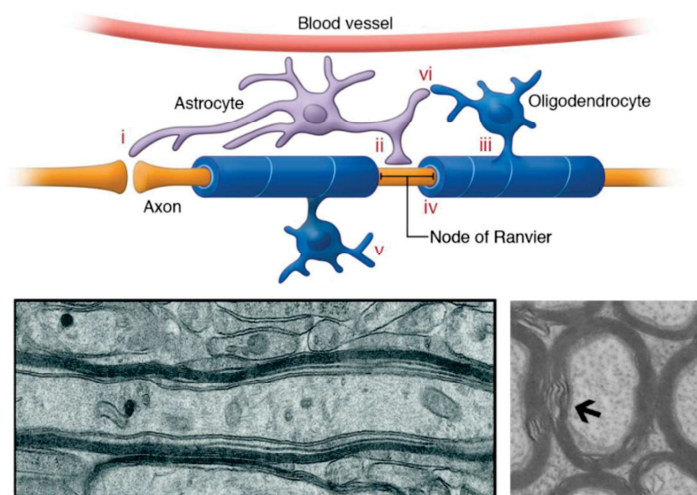


Figure 4 : Oligodendrocytes et myéline.

Panel sup. : Représentation schématique de l'organisation des oligodendrocytes autour des axones pour former la myéline (extrait de [32]).

Panel inf. : Images par microscopie électronique de coupes longitudinale (gauche) et transversale (droite) des gaines de myélines [33,34].

D'autres types cellulaires complètent la glie, on peut notamment citer un ensemble de progéniteurs, ou cellules immatures, pouvant avoir leur fonction propre ou être destinés à enrichir les populations neuronale, astrocytaire ou oligodendrocytaire. Parmi eux, les cellules multipotentes NG2 ou encore les OPCs (pour *Oligodendrocyte progenitor cells*) [35–37]. D'autre part, les plexus choroïdes et les cellules épendymaires, cellules matures et très spécialisées, sont en charge de la production, de la composition et de la dynamique du liquide cérébro-spinal (LCS) qui entoure le cerveau et circule dans le réseau ventriculaire cérébral [38,39].

2.3. Microglie et autres cellules immunitaires : une immunité cérébrale très spécifique

L'immunité cérébrale se distingue totalement de l'immunité périphérique, tant sur la composition cellulaire de ce compartiment que sur l'aspect fonctionnel qu'elle occupe.

La microglie représente environ 10% de la glie du SNC et constitue la population immunitaire majoritaire [40]. D'origine myéloïde contrairement aux autres principales cellules cérébrales, la microglie colonise le cerveau très précocement au cours de son développement et participe ainsi à l'élaboration des circuits neuronaux (remodelage et maturation des synapses, élimination des débris cellulaires) [41,42]. Plus tard, la microglie participe à la protection et l'homéostasie cérébrale par la phagocytose des déchets cellulaires et autres molécules indésirables, ainsi qu'à la régulation de l'activité neuronale et astrocytaire [43–45].

Dans un contexte pathologique, la microglie se transforme vers un état appelé « *disease associated microglia* » (DAM). Elle devient particulièrement inflammatoire (libération de TNF α , IL-6, IL1 β), sa morphologie change et sa motilité est drastiquement accrue favorisant le recrutement rapide sur les sites endommagés [46–48].

Les macrophages associés aux bordures (BAMs) occupent 10% des cellules myéloïdes résidentes du cerveau et regroupent les macrophages associés aux méninges, péri-vasculaires, et les macrophages associés aux plexus choroïdes [40]. Les deux premiers assurent des fonctions d'immunosurveillance tandis que les derniers sont en charge de la maintenance et du bon fonctionnement des plexus choroïdes (élimination des déchets et maintien de l'intégrité des capillaires sanguins) [49,50].

D'autres cellules à fonction immunitaire sont résidentes du cerveau mais beaucoup moins représentées. Pour les citer, cellules dendritiques, lymphocytes, polymorphonucléés ou cellules Natural Killer (NKs) comptent au total pour moins de 10% du compartiment immunitaire [40,47].

B. Les tumeurs du système nerveux central

1. Epidémiologie et facteurs de risque

Les tumeurs du SNC représentent environ 2% de la totalité des cancers d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Ces cancers rassemblent une multitude de tumeurs de nature très hétérogène, bénignes ou malignes, et d'origines diverses en fonction du type cellulaire ou de la structure cérébrale à partir desquels la tumeur se développe [51]. Les tumeurs cérébrales touchent toutes les tranches d'âge mais sont relativement plus fréquentes chez la personne âgée, avec un âge médian au diagnostic de 66-68 ans. Cependant, chez l'enfant, les tumeurs du SNC sont les cancers solides les plus fréquents (2^{ème} position après les leucémies, tous cancers confondus) et entraînant le plus fort taux de mortalité.

En effet, si les tumeurs du SNC font partie des cancers dits rares, avec des taux d'incidence annuelle s'élevant à 6.7 cas (chez l'homme) et 4.5 cas (chez la femme) pour 100 000 personnes [52], la localisation sensible du SNC est souvent source d'importantes répercussions pour la santé des patients, faisant ainsi de ces pathologies un important problème de santé. Pour cause, la voûte crânienne n'étant pas extensible, elle ne permet pas d'expansion volumique importante, et les tumeurs du SNC, même dans le cas de tumeurs bénignes, entraînent donc souvent des troubles liés à l'invasion tumorale, la destruction ou la compression de zones cérébrales fonctionnelles. Globalement, les tumeurs intracrâniennes sont plus fréquentes chez l'homme et entraînent une forte mortalité (4.3 pour 100 000 contre 2.7 pour 100 000 chez la femme) [52].

De plus, il faut distinguer les tumeurs primitives du SNC, c'est-à-dire issues de la transformation d'un type cellulaire résident du SNC ou initialement développées dans le SNC, des métastases cérébrales qui émanent d'un cancer situé initialement dans un autre organe (ces dernières étant 10 fois plus fréquentes). Cependant, la suite de ce manuscrit et l'intégralité de nos travaux se concentreront uniquement sur les tumeurs primitives du SNC.

En France, l'incidence et la mortalité liées aux tumeurs cérébrales ont connu une augmentation entre les années 1990 et 2018 [52], et sont relativement stables depuis. Cette hausse est en partie attribuée au développement des outils de diagnostic, permettant leur meilleure détection et classification, et en partie à la présence de facteurs de risques [51,53]. Au-delà du sexe évoqué ci-dessus, l'âge est l'un des principaux facteurs de risque et le vieillissement général de la population depuis les années 1990 a certainement participé à l'augmentation de l'incidence. D'autres facteurs de risques, détaillés dans une revue de la littérature établie par des chercheurs bordelais [54], ont également été identifiés, comme par exemple l'ethnie et certaines prédispositions génétiques ou expositions extérieures (pesticides, rayonnements ionisants...) [55,56]. Certains autres facteurs, comme l'exposition à des champs

électromagnétiques ont été largement étudiés et leur implication controversée, tandis que d'autres encore ont su montrer un effet protecteur par rapport au risque de développer une tumeur du SNC, c'est le cas des terrains allergiques ou de la prise d'un traitement hormonal de substitution [54,57].

2. Classification des tumeurs cérébrales

Les tumeurs du SNC présentent des caractéristiques cliniques, histologiques, neuroradiologiques et moléculaires différentes selon le type cellulaire ou le tissu atteint. Trois grandes catégories se distinguent : les tumeurs des méninges ou méningiomes, les neurinomes qui prennent naissance au niveau des nerfs crâniens ou spinaux, et les tumeurs neuro-épithéliales affectant les principales cellules du SNC, à savoir neurones et cellules gliales. Ces dernières sont les plus fréquentes et les seules développées dans ce manuscrit. Parmi elles, les gliomes représentent plus d'un tiers de la totalité des tumeurs du SNC et rassemblent notamment les astrocytomes, oligodendrogliomes et glioblastomes.

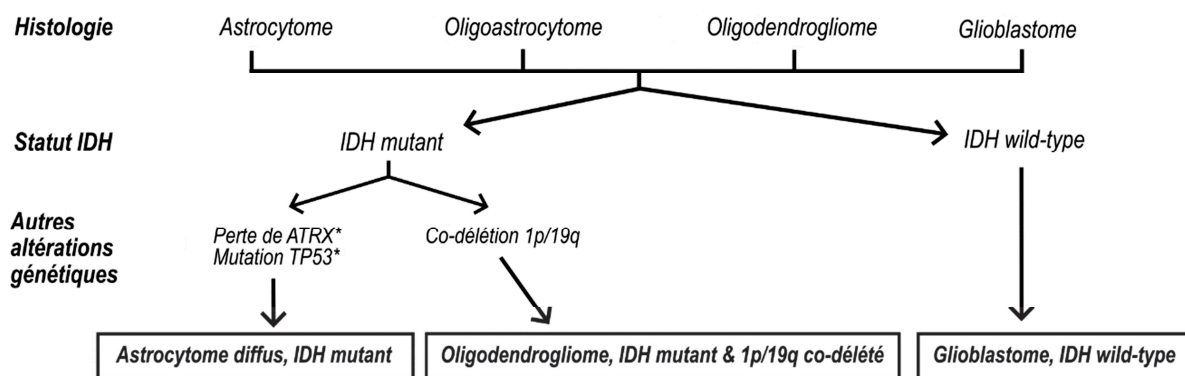
2.1. La génétique s'invite dans la classification

Dans un but d'aide au diagnostic et pour améliorer la détection épidémiologique, l'OMS a entrepris dès 1979 un grand travail de classification des tumeurs du SNC. Initialement, elles sont catégorisées en se basant uniquement sur leurs caractéristiques histologiques [58]. L'évolution des pratiques et technologies médico-scientifiques, notamment en termes d'immunohistochimie, d'imagerie et de génétique, a permis petit à petit d'ajouter des critères à cette classification et d'affiner les diagnostics [59,60]. Aujourd'hui, s'ajoute au diagnostic histologique tout un panel de mutations génétiques, désormais admises comme biomarqueurs diagnostiques et pronostiques des tumeurs cérébrales [60,61].

Notamment, dans la classification de 2016 [60], apparaissent quelques profils mutationnels marquants pour un meilleur diagnostic, pronostic et traitement :

- L'une des premières altérations génétiques identifiées dans un type spécifique de tumeurs du SNC est la co-délétion 1p/19q (perte du bras court du chromosome 1 et du bras long du chromosome 19) qui est spécifiquement retrouvée dans les oligodendrogliomes [62]. Elle est associée à un meilleur taux de survie sans rechute et une meilleure réponse thérapeutique, et représente donc un facteur de meilleur pronostic parmi les tumeurs du SNC [63].

- La mutation des gènes de l'isocitrate déshydrogénase 1 et 2 (*IDH1* et *IDH2*) est certainement l'altération génétique la plus étudiée dans les tumeurs cérébrales. Découverte et corrélée à des tumeurs de moyen ou bas grade, la mutation *IDH* a un grand intérêt diagnostique et semble donc être un facteur de meilleur pronostic [64,65], par opposition aux tumeurs *IDH-wild type* qui permettent de classer les tumeurs de plus haut grade [61]. Cependant, elle peut également être observée dans des tumeurs de haut grade développées secondairement à des tumeurs de bas grade (récurrence avec transformation vers un phénotype plus agressif) [64,66]. Cette mutation apparaît sur un gène codant pour un enzyme du cycle de Krebs et supprime l'étape de transformation de l'isocitrate en α -cétoglutarate, modifiant ainsi le métabolisme [67,68] et déstabilisant l'équilibre redox de la cellule vers un état pro-oxydatif [69–71]. Plusieurs travaux ont également étudié l'impact du D-2-hydroxyglutarate, métabolite produit par l'*IDH* mutée [69], sur les cellules cancéreuses, mettant en avant une diminution la différenciation cellulaire par inhibition d'histone déméthylases ainsi qu'une modulation de l'activité du facteur HIF (par action indirecte sur des prolyl-hydroxylases), soulignant donc l'implication de cette mutation dans le processus de tumorigenèse [72–74].



* = caractéristique mais pas obligatoire au diagnostic

Figure 5 : Altérations génétiques permettant la classification des principaux gliomes (adapté de Louis et al. [61]).

D'autres altérations génétiques ont été identifiées dans les tumeurs cérébrales comme étant liées au développement ou à l'aggravation de la pathologie. Si ces modifications géniques ne permettent pas de classer réellement un type par rapport à un autre, elles apportent souvent des informations pertinentes aux cliniciens pour le diagnostic, la gradation du type tumoral ou le traitement des patients atteints. Les plus marquantes sont rapidement décrites ci-après mais cette liste n'est pas exhaustive.

- Les mutations des gènes *TP53* et *ATRX*, isolées ou concomitantes, caractérisent les astrocytomes [65,75], bien qu'elles ne soient pas décisives pour le diagnostic. *TP53* est un gène suppresseur de tumeur et code pour la protéine p53 « gardienne du génome » impliquée dans de nombreux processus cellulaires, notamment l'entrée en apoptose ou en sénescence. *TP53* ou d'autres acteurs de sa voie de signalisation (*CDKN2A/B*, *MDM2/4*) sont également souvent mutés dans les cas de glioblastomes [76] et dans de nombreux cancers hors SNC. La protéine *ATRX* (*α-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*) est impliquée dans le remodelage de la chromatine et sa transcription, ainsi que dans la stabilisation de l'ADN au niveau des télomères [77].
- La mutation activatrice du promoteur du gène *TERT* (*Telomerase Reverse Transcriptase*) provoque une hausse de l'activité de la télomérase responsable de l'allongement 3' des brins d'ADN. Ceci entraîne donc un allongement protecteur des télomères dans les cellules cancéreuses, favorisant survie et prolifération cellulaire [78]. Les mutations *TERT* ne sont pas spécifiques d'un type de tumeur mais participent également au diagnostic puisqu'elles sont retrouvées chez 96% des oligodendrogliomes (présentant également une co-délétion 1p/19q) et environ 80% des glioblastomes [65,79,80].
- Des altérations de la voie RTK/RAS/PI3K sont retrouvées dans la majorité des tumeurs du SNC présentant un statut *IDH-wild type*, mais sont plus fréquentes dans les tumeurs de haut grade comme les glioblastomes (environ 80% des GB présentent au moins une altération dans cette voie, contre 20-25% des tumeurs de plus bas grade *IDH-wild type*) [65,76]. La voie de signalisation activée par les récepteurs à tyrosine kinases (RTKs) joue un rôle central dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaire [81]. Sa sur-activation (par l'intermédiaire de différents acteurs) a été largement associée à l'initiation et la maintenance du cancer [82–84]. Par conséquent, la modulation d'intermédiaires de la voie en contexte cancéreux a permis le développement de nombreuses immunothérapies anti-cancéreuses (inhibiteurs de tyrosine kinases, de Raf, MEK, Pi3k/AKT/mTOR...). L'effet de ces thérapies est parfois très encourageant, et parfois contrebalancé par les cellules cancéreuses qui exposent d'autres mutations (déjà présentes ou de novo) en amont ou en aval de la voie. Ainsi, le profil mutationnel de cette voie de signalisation semble être un potentiel biomarqueur de la réponse à la thérapie [84,85]. A noter dans les tumeurs cérébrales, la répression de *PTEN* et l'amplification du gène codant pour le récepteur *EGFR* (ou sa mutation entraînant son activation constitutive : variant *EGFRvIII*) sont très fréquentes dans les glioblastomes (*PTEN* muté chez environ 40% des GB, *EGFR* muté chez environ 60% des GB) [76,86].

- Le statut de méthylation du système de réparation de l'ADN MGMT (*O6-methylguanine-DNA methyltransferase*) est également un bon facteur pronostique de la réponse aux traitements. En effet, cet enzyme permet la réparation spécifique des dommages à l'ADN induits par les thérapies alkylantes (principales chimiothérapies) [87]. La méthylation du promoteur du gène codant pour l'enzyme MGMT induit une inactivation par *silencing* du gène et donc une perte de l'enzyme, et est corrélée à une meilleure réponse aux traitements alkylants [88]. Ce statut d'hyperméthylation est retrouvé dans plusieurs cancers primaires [89] mais sa fréquence est relativement conséquente, de l'ordre de 40-50%, dans les gliomes de haut grade (astrocytomes de grade 3-4 ou GB) [76,90].

2.2. Gradation des tumeurs cérébrales

L'OMS a également mis en place un système de gradation des tumeurs cérébrales, qui sont donc classées en 4 grades selon leur évolution et leur malignité : les tumeurs de bas grade (grades 1 et 2), considérées bénignes, sont d'évolution lente et peu infiltrantes, tandis que celles de haut grade (grade 3 et 4), dites malignes, présentent un caractère très prolifératif et infiltrent profondément le parenchyme cérébral. Parmi les gliomes de haut grade, notre sujet d'étude, plus amplement détaillé dans la partie suivante, le glioblastome (GB) est le gliome le plus fréquent et le plus agressif (grade 4) chez l'adulte.

A noter, une franche évolution entre la 4^{ème} et la 5^{ème} édition de la classification de l'OMS, a permis d'attribuer plusieurs grades à un même type tumoral, simplifiant grandement la classification dans sa 5^{ème} version [60,61].

Bien sûr, chaque classification présente ses limites et sera à adapter avec l'évolution des pratiques et techniques diagnostiques. En effet, si la biologie moléculaire a permis d'améliorer ce classement qui était avant uniquement basé sur l'évaluation du clinicien et de l'histologie, et donc très subjectif, elle ne permet pas toujours de conclure sur le type tumoral et une approche intégrative doit toujours être considérée. L'amélioration régulière de cette classification est essentielle puisqu'elle permet d'une part de guider le clinicien quant à la thérapie appropriée à mettre en place chez le patient, mais également d'enrichir la littérature et l'épidémiologie des tumeurs du SNC qui manquent parfois d'outils rigoureux pour détecter et séparer les différents types tumoraux.

Ci-après est présenté un tableau récapitulatif des différents sous-types tumoraux de la catégorie des « Gliomes, tumeurs glioneuronales et neuronales », représentant la grande majorité des tumeurs du SNC, avec les altérations géniques et le grade qui leur sont à ce jour associés.

SOUS-TYPE TUMORAL	ALTERATIONS GENIQUES ASSOCIEES	GRADE
Gliomes diffus de l'adulte Astrocytome, IDH-mutant Oligodendrogliome, IDH-mutant, et 1p/19q-codeletion Glioblastome, IDH-wildtype	<i>IDH1/2, ATRX, CDKN2A/B</i> <i>IDH1/2, 1p/19q, promoteur TERT, CIC, BUBP1, NOTCH1</i> <i>IDH-wild type, promoteur TERT, chr7/10, EGFR</i>	2,3,4 2,3 4
Gliomes pédiatriques diffus de bas grade Astrocytome diffus, avec mutation MYB ou MYBL1 Gliome angiocentrique Tumeur neuroépithéliale polymorphe de l'enfant (bas grade) Gliome diffus de bas grade, avec mutation voie des MAPK	<i>MYB, MYBL1</i> <i>MYB</i> <i>BRAF, FGFR</i> <i>FGFR1, BRAF</i>	1 1 1
Gliomes pédiatriques diffus de haut grade Gliome diffus de la ligne médiane, avec mutation H3 K27 Gliome diffus hémisphériques, avec mutation H3 G34 Gliome pédiatrique de haut grade, H3-wildtype et IDH-wildtype Gliome hémisphérique de l'enfant	<i>H3 K27, TP53, ACVR1, PDGFRA, EGFR, EZHIP</i> <i>H3 G34, TP53, ATRX</i> <i>IDH-wildtype, H3-wildtype, PDGFRA, MYCN, EGFR</i> <i>NTRK family, ALK, ROS, MET</i>	4 4
Gliomes circonscrits astrocytaires Astrocytome pilocytique Astrocytome de haut grade pilomyxoïde Xanthoastrocytoma pléiomorphe Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire Gliome choroïde Astroblastome, avec mutation MN1	<i>KIAA1549-BRAF, BRAF, NF1</i> <i>BRAF, NF1, ATRX, CDKN2A/B</i> <i>BRAF, CDKN2A/B</i> <i>TSC1/2</i> <i>PRKCA</i> <i>MN1</i>	1 2,3 1 2
Tumeurs glioneuronales et neuronales Gangliogliome Gangliogliome/astrocytome desmoplasique infantile Tumeur neuroépithéliale dysembryoplastique (DNET) Tumeur glioneuronale diffuse à composante oligodendrogliale-like et clusters nucléaires Tumeur glioneuronale papillaire Tumeur glioneuronale à rosettes Tumeur glioneuronale myxoïde Tumeur glioneuronale leptomeningée diffuse Gangliocytome Tumeur neuronale multinodulaire à vacuoles Gangliocytome dysplasique du cervelet (maladie de Lhermitte-Duclos) Neurocytome central Neurocytome extraventriculaire Liponeurocytome cérébelleux	<i>BRAF</i> <i>BRAF</i> <i>FGFR1</i> <i>Chromosome 14</i> <i>PRKCA</i> <i>FGFR1, PIK3CA, NF1</i> <i>PDGFRA</i> <i>KIAA1549-BRAF fusion, 1p</i> <i>Voie des MAPK</i> <i>PTEN</i> <i>FGFR, IDH-wild type</i>	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2
Tumeurs épendymaires Ependymome supratentorial Ependymome supratentorial, ZFTA fusion-positif Ependymome supratentorial, YAP1 fusion-positif Ependymome de la fosse postérieure, PFA ou PFB Ependymome spinal (amplification de MYCN ou non) Ependymome myxopapillaire Subependymome	<i>ZFTA, RELA, YAP1, MAML2</i> <i>H3 K27me3, EZHIP</i> <i>NF2, MYCN</i>	2,3 2,3 2,3 2,3 1,2,3 1

Tableau 1 : Classification des gliomes, tumeurs glioneuronales et neuronales d'après l'OMS (extrait et adapté de la 5^{ème} édition de la Classification des tumeurs du SNC de l'OMS, 2021 [61]).

II-LE GLIOBLASTOME

Le GB est la tumeur primitive du SNC la plus courante chez l'adulte : environ 15% de toutes les tumeurs cérébrales sont diagnostiquées comme GB, et plus de la moitié des tumeurs malignes [51,91]. En France, le GB présente un taux d'incidence moyen annuel de 3 cas pour 100 000 personnes, avec un ratio légèrement défavorable chez l'homme (rapport hommes/femmes de 1,6). Ce taux d'incidence est en constante augmentation depuis les années 1990, notamment chez le sujet âgé ; mais encore une fois, il est difficile de conclure sur la part de cette augmentation imputable à l'amélioration des pratiques diagnostiques et de détection [52].

Le GB est une tumeur de grade 4 de mauvais pronostic, et demeure à ce jour la tumeur cérébrale la plus agressive et létale, avec une médiane de survie de 14 mois malgré traitements et une survie nette standardisée à 5 ans de 7% [92]. L'âge médian au diagnostic est de 65 ans et le pronostic est d'autant plus défavorable que le diagnostic est tardif [52].

A. Origine et physiopathologie

1. Caractéristiques histopathologiques et progression du GB

Les GB récapitulent presque l'ensemble des caractéristiques attribuées au cancer décrites par Hanahan & Weinberg, à savoir une signalisation pro-proliférative soutenue, un échappement aux points de contrôles et aux mécanismes de mortalité cellulaire, la promotion de l'angiogenèse pour approvisionner la masse tumorale, l'invasion accrue de l'environnement péri-tumoral mais également une dérégulation métabolique et du microenvironnement immunitaire [93,94]. A noter comme exception, à la différence de nombreux autres cancers, les GB ne forment que très rarement (0.5% des cas de GB) des métastases hors du SNC [95]. Ceci peut possiblement s'expliquer par la présence de la BHE comme rempart à la dissémination systémique de cellules tumorales, ou bien par la forte agressivité de la tumeur primaire du GB qui, corrélée à des taux de survie à long terme relativement faibles, ne laissent que peu de place à une évolution en foyer secondaire.

Sur le plan phénotypique, les GB forment généralement des tumeurs massives (*Fig. 6*), très prolifératives et angiogéniques, avec une zone centrale hypoxique évoluant la plupart du temps vers la nécrose [96]. Généralement, une ou plusieurs couches de cellules d'aspect pseudo-palissadique entourent et caractérisent ces zones nécrotiques. L'examen cytologique révèle des masses hypercellulaires, avec des anomalies nucléaires, notamment des cellules

multinucléées, ainsi que des anomalies vasculaires liées à leur caractère angiogénique (hyperplasie endothéliale et prolifération microvasculaire).

Ces tumeurs présentent également d'importantes capacités invasives qui permettent la large dissémination de cellules tumorales dans le parenchyme cérébral, et stimulent fortement leur agressivité et leur fort taux de récurrence. En effet, une partie de ces cellules invasives migre à grande distance de la masse tumorale, échappe à la résection chirurgicale et résiste aux étapes d'irradiation et de chimiothérapie qui constituent la première ligne de traitement, représentant ainsi les principales responsables des récurrences tumorales (*Fig. 6*) [97,98].

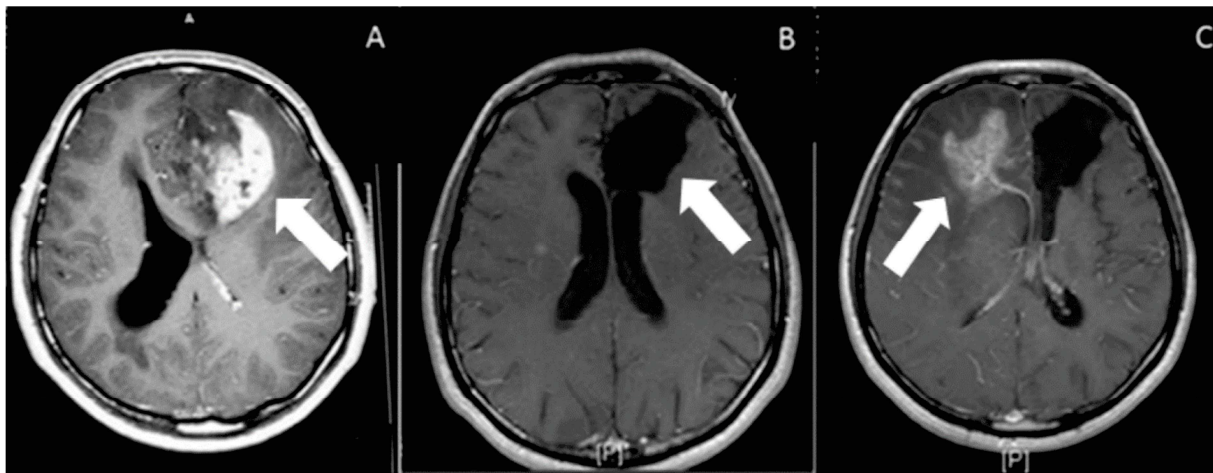


Figure 6 : IRM de GB dans le lobe frontal gauche avant et après résection, puis après récurrence (extrait de [99]). Clichés IRM pondérés T1 avec administration de produit de contraste (gadolinium). A. IRM pré-opératoire le jour de l'exérèse tumorale, la flèche indique la tumeur massive avec prise de contraste irrégulière. B. IRM post-opératoire 1 mois après chirurgie, la flèche indique la cavité de résection. C. IRM de contrôle 18 mois après chirurgie, la flèche montre une récurrence dans l'hémisphère controlatéral.

D'un point de vue histopathologique, les cellules de GB infiltrent principalement le parenchyme cérébral le long de structures physiologiques préexistantes. Des modèles de migration tumorale, décrits pour la première fois par Hans Scherer en 1938, ont été définis comme les « structures secondaires de Scherer » sous la forme de 4 types de progression histologique [100] : une invasion autour des corps cellulaires neuronaux appelée satellitose péri-neuronale, une invasion périvasculaire (satellitose périvasculaire), une dissémination le long de la couche interne des méninges appelée invasion subpiaie et une invasion le long des tracts neuronaux. Plus récemment, des études ont montré une préférence notable des cellules de GB pour une migration le long des prolongements astrocytaires et axones neuronaux myélinisés (*white matter track invasion*), ainsi que périvasculaire [101,102]. Ces cellules de GB peuvent envahir le tissu cérébral de manière individuelle en se détachant de la masse tumorale (invasion « *single-cell* ») ou de manière collective en formant des groupes de cellules cohésives (le plus souvent le long des vaisseaux sanguins), dégradant sur leur passage le microenvironnement et les structures environnantes telles de la BHE [103,104].

Un soutien moléculaire vient compléter le guidage physique des cellules de GB par ces structures cérébrales [101,102]. Notamment, les cellules de GB expriment ou sur-expriment différents récepteurs d'adhésion cellule-matrice ou cellule-cellule (récepteurs aux intégrines principalement) qui participent à l'attachement des cellules de GB à la matrice extracellulaire (MEC) et à la promotion de l'invasion [105]. Également, les GB sécrètent ou expriment à leur surface une large palette de protéases, dont différentes métalloprotéases (MMPs) et ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*), assurant le remodelage de la MEC et favorisant ainsi l'infiltration tumorale [106,107].

La prolifération accrue des cellules de GB est également soutenue par des dérégulations moléculaires. Certaines voies de signalisation (brièvement introduites dans la partie I-2 Classification des tumeurs cérébrales), impliquées dans la régulation de la prolifération, survie ou apoptose cellulaire, sont classiquement altérées dans le GB. Notamment, une amplification/activation des intermédiaires de la voie RTK/RAS/PI3K induit une sur-régulation de la signalisation médiée par les facteurs de croissance, tandis qu'une inactivation des gènes suppresseurs de tumeur tels que P53 ou RB1 lève des inhibitions sur le cycle cellulaire ou la survie cellulaire (*Fig. 7*) [76].

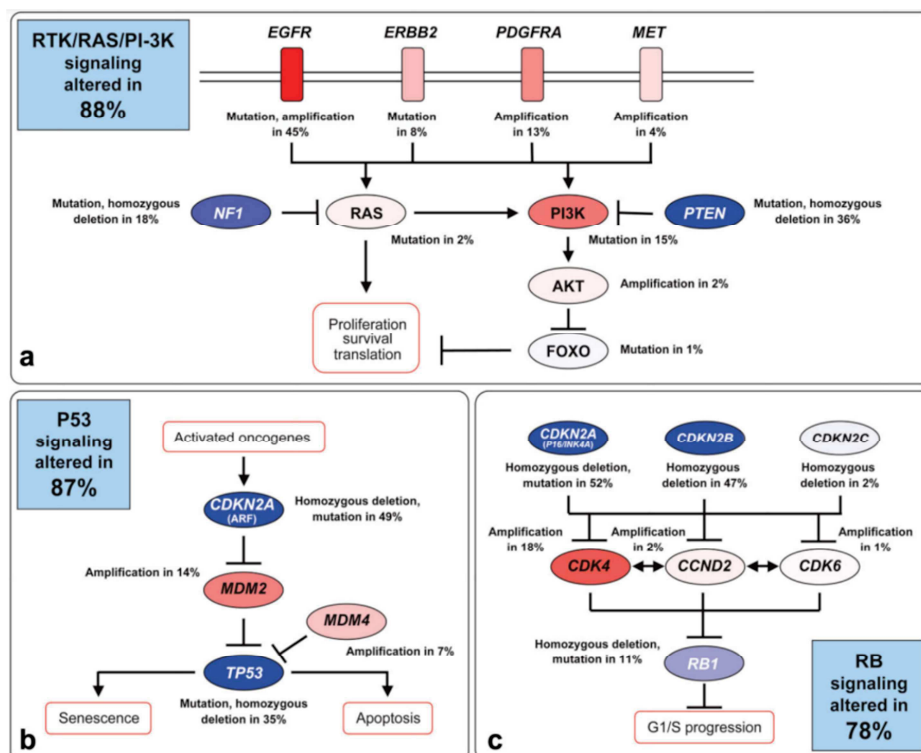


Figure 7 : Altérations génétiques soutenant la survie et la prolifération du GB : 3 voies de signalisations centrales (extrait des travaux de *The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network* [76]).

En rouge sont indiquées les mutations activatrices ou amplifications géniques et en bleu les mutations inhibitrices ou délétions des voies de signalisation dépendantes des protéines (a) RTK/RAS/PI3K, (b) p53 et (c) RB. Les pourcentages représentent la proportion de tumeurs GB affectées par la dérégulation au sein de la database analysée TCGA. Les encadrés bleus indiquent le pourcentage de GB présentant au moins une altération de la voie de signalisation correspondante.

La mutation du promoteur *TERT* est également caractéristique des GB et retrouvée chez 80% d'entre eux [79,80]. D'autre part, presque la moitié des GB présentent une hyperméthylation du promoteur *MGMT*, altération cette fois associée à un bon pronostic puisqu'elle favorise l'efficacité des traitements alkylants [76,88,90]. Déjà abordées précédemment dans ce manuscrit, ces dérégulations ne seront pas plus détaillées dans cette partie mais elles participent activement aux phénomènes de survie, de prolifération et de résistance/sensibilité aux traitements.

2. Origine des glioblastomes

A ce jour, les mécanismes précis à l'origine de la gliomagenèse sont toujours majoritairement inconnus et le sujet de nombreuses recherches. Les étonnantes hétérogénéité et plasticité des GB participent notamment à expliquer ce manque de réponses quant à l'origine des GB, et questionne de plus en plus la communauté scientifique [108].

Le profilage génétique et épigénétique des tumeurs a d'abord mené à de nouvelles découvertes sur l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale dans le GB. L'identification de différents programmes génétiques a permis de distinguer différents sous-types de GB, à savoir proneural, classique et mésenchymateux [109,110]. La caractérisation intra-tumorale multirégionale a également mis en avant la possible coexistence de ces différents profils génétiques dans différentes zones d'une même tumeur : une carte génétique évoluant en fonction des tumeurs, du temps et des thérapies [110–112].

Le stade de développement des cellules de GB marque une seconde strate d'hétérogénéité au sein de ces tumeurs. En effet, le GB abrite également différents compartiments cellulaires [113] : un compartiment différencié majoritaire duquel provient la majorité des études génétiques, moléculaires et des connaissances sur la maladie [76,110,111], et un compartiment non différencié de cellules aux propriétés type souche, moins bien caractérisé mais dont l'importance dans la genèse et le développement du GB semble cruciale [114–116]. En effet, ces cellules type souche de GB (CSGs) montrent des propriétés d'auto-renouvellement et de formation de nouvelle tumeur similaire à la tumeur initiale (avec un degré de variabilité) [114,115,117]. Ces CSGs, également appelées cellules initiatrices de tumeurs, sont ainsi les principales candidates pour expliquer l'origine des GB, et ont également montré un rôle central dans la résistance aux traitements et donc dans la récurrence tumorale [97,98]. Sur le plan transcriptomique, les CSGs se rapprochent fortement du profil de cellules du cerveau sain, les cellules souches neurales (CSNs), exprimant des marqueurs tels que CD133, PDGFRA, OLIG2 ou NESTIN [113,115,118]. Des preuves de plus en plus nombreuses suggèrent même que ces CSGs proviennent de la transformation de CSNs et de leurs

progéniteurs [119]. Plus probable ancêtre commun à toutes les cellules de GB, cette population de CSGs multipotentes apparait comme une cible encourageante pour traiter les GB, et se place déjà comme un modèle d'étude pertinent pour décrypter les mécanismes soutenant la progression du GB [114].

3. Classification

Pour rappel, les glioblastomes sont classés par l'OMS comme gliomes de stade 4 et sont désormais caractérisés par une forme d'IDH non mutée [61]. La forte hétérogénéité de ces tumeurs a mené les chercheurs à creuser les caractéristiques biologiques et moléculaires des GB afin de définir des sous-types et d'identifier des anomalies associées, permettant éventuellement d'orienter le pronostic, le traitement ou la recherche de cibles thérapeutiques.

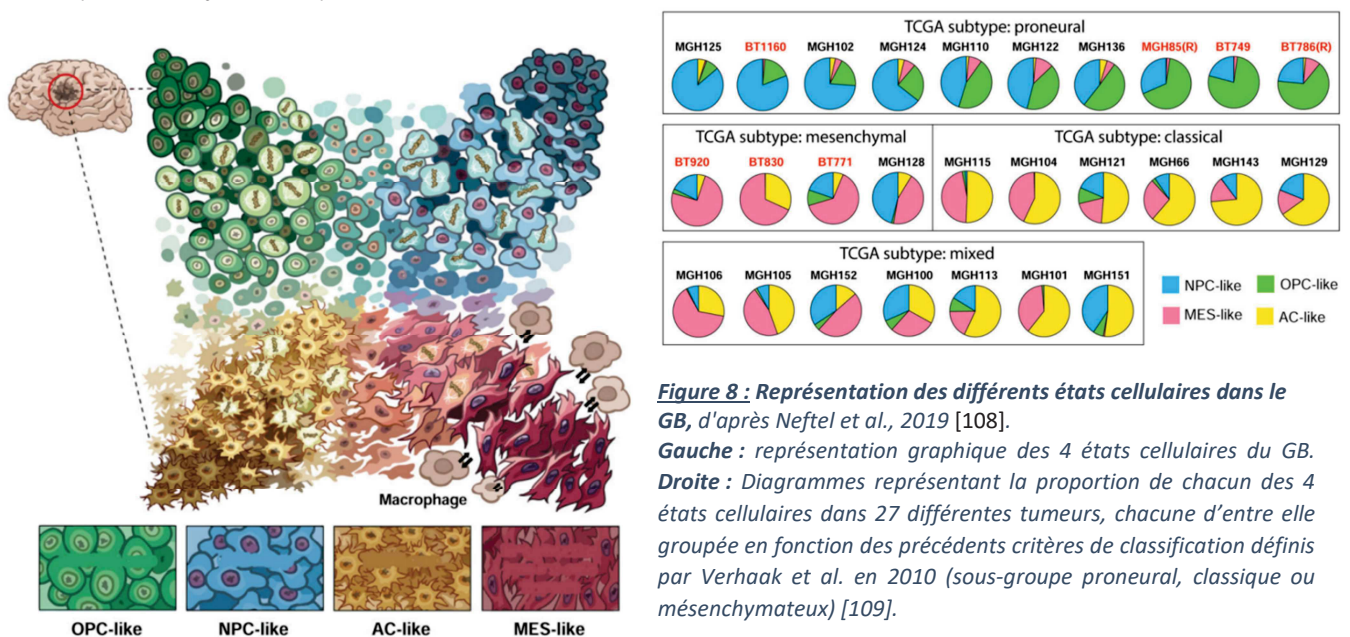
L'essor de la transcriptomique a permis la mise en place des premières classifications dans le GB. Verhaak *et al.*, ainsi que Wang *et al.*, décrivent puis affinent les premiers sous-types de GB [109,110]. Les sous-types proneural, neural (abandonné par la suite), classique ou mésenchymateux sont identifiés à partir d'une méta-analyse de la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas [76]) et associés à différentes signatures géniques [109].

- Le sous-type Proneural est corrélé avec une population plus jeune que les autres sous-types et avec un pronostic légèrement meilleur (survie allongée) [120]. Il est associé à une amplification du récepteur PDGFRA, ainsi qu'à des mutations du gène *TP53* et *IDH1* [109], anomalies géniques communément retrouvées dans les GB secondaires [64,121]. Ces caractéristiques suggèrent une origine spécifique de ce sous-type proneural, fruit de l'aggravation d'une tumeur de grade inférieur ou de la transformation d'une cellule de type souche (pouvant aussi évoluer en tumeur de bas grade partageant les mêmes caractéristiques).
- Le sous-type Classique est associé à une forte amplification du gène *EGFR* (97% des tumeurs de ce groupe), par directe amplification ou par mutation vers un variant EGFRvIII codant pour une protéine constitutivement activée [109]. La mutation du gène *CDKN2A* est également corrélée au sous-type classique [109], affectant les voies de signalisation p53 et RB1 impliquées dans le cycle cellulaire ou l'apoptose [76]. Également, des marqueurs de précurseurs ou cellules souches neurales sont fréquemment surexprimés dans ce groupe (*NES*, Notch, Sonic Hedgehog) [109].
- Le sous-type Mésenchymateux est quant à lui caractérisé par une fréquente délétion ou mutation du gène *NF1* [109], impliqué dans la voie pro-proliférative Ras. Il exprime

également des marqueurs mésenchymateux (*MET*, *YKL40*), ou liés à une transition épithélio-mésenchymateuse (CD44), ainsi qu'une activation des voies $TNF\alpha/NF\kappa B$ associées à une importante nécrose et infiltration immunitaire (macrophages/microglies notamment) [109,110]. Ce sous-type est désormais considéré comme le plus agressif et est celui associé au plus mauvais pronostic [122]. De plus, un basculement vers un sous-type mésenchymateux est fréquemment observé lors de repousses tumorales [120] et a été impliqué dans la résistance aux traitements [98,110].

Cette stratification en sous-types tumoraux rencontre cependant de nombreux blocages. En effet, des travaux ont par la suite mis en avant une hétérogénéité intra-tumorale telle que des marqueurs de plusieurs sous-types de GB se retrouvent au sein des mêmes tumeurs ou zones tumorales, et cohabitent dans l'architecture tumorale [111,112]. Finalement, cette classification transcriptomique correspondrait alors plutôt à des états cellulaires plus qu'à des types tumoraux de GB. D'autre part, si certains sous-groupes sont associés à un meilleur ou moins bon pronostic, cette affirmation n'est pas une vérité absolue et cette classification transcriptomique du GB montre ses limites quant à la prédiction du pronostic ou de l'efficacité thérapeutique.

En 2019, Neftel et ses collègues ont ainsi décrit 4 différents états cellulaires permettant d'illustrer la diversité génétique et épigénétique du GB (*Fig. 8*) [108]. Ces 4 profils s'apparentent à ceux de cellules neurales physiologiques et sont donc nommés en conséquence [108] : NPC-like (neural progenitor-like) apparentés au profil des progéniteurs neuronaux, OPC-like (oligodendrocyte-progenitor-like) à celui des progéniteurs des oligodendrocytes, AC-like (astrocyte-like) se rapprochant plutôt des astrocytes, ou MES-like (mesenchymal-like).



Les échantillons tumoraux analysés ont montré la présence de cellules dans de multiples états, et la fréquence relative de ces états cellulaires est variable en fonction des tumeurs, influencée par des facteurs génétiques et épigénétiques mais aussi par le microenvironnement de la tumeur [108,110]. De plus, ces états cellulaires sont régis par une certaine plasticité, avec une possible dynamique de prolifération d'un état au profit des autres ou de transition d'un état vers un autre [108]. Cependant, certaines altérations génétiques semblent dicter la transition vers un état en particulier : ainsi les gènes *CDK4*, *PDGFRA*, *EGFR* et *NF1* ont été corrélés respectivement avec les profils NPC-like, OPC-like, AC-like ou MES-like [108].

Cette classification de profils cellulaires est aujourd'hui encore d'actualité pour distinguer différents phénotypes de GB. Si elle n'est pour l'instant que peu utilisée pour la clinique, elle est d'un remarquable intérêt pour la recherche, permettant de « trier » les tumeurs ou les sous-compartiments cellulaires et réfléchir au mieux aux cibles thérapeutiques pour chacun d'entre eux, vers une approche de thérapie ciblée et adaptée au cas par cas.

Cette classification est bien sûr évolutive et a récemment été implémentée d'un aspect fonctionnel. En 2021, Garofano et ses collègues lient dans leurs travaux les profils transcriptomiques précédemment établis avec des activités biologiques de la tumeur [123]. Leurs analyses aboutissent ainsi à la caractérisation de nouveaux états cellulaires du GB, donc d'une nouvelle classification, prenant en compte l'activité métabolique et les caractéristiques développementales en plus du seul profil transcriptomique. Cette nouvelle classification apparaît particulièrement actuelle et nécessaire au vu des preuves grandissantes de l'implication des cellules souches de GB, ou encore des dérégulations métaboliques, dans le développement des GB [124–126].

4. Hétérogénéité et plasticité des GB

Comme déjà évoqué au fil de ce manuscrit, le GB est une tumeur très hétérogène. Le GB contient des cellules différentes au niveau génétique et moléculaire en fonction des patients mais également au sein même d'une tumeur. Au niveau intra-tumoral, cette hétérogénéité s'illustre en termes architectural comme cellulaire, reposant sur la cohabitation de populations cellulaires différentes dans leur nature, dans leur stade de différenciation et dans leurs interactions avec le microenvironnement. Elle est conditionnée par des facteurs intrinsèques aux cellules cancéreuses (génétiques notamment) mais aussi par des facteurs extrinsèques, parmi lesquels le microenvironnement joue un rôle déterminant (*Fig.9*). Cette hétérogénéité est de plus appuyée par la forte plasticité que montrent certains compartiments

cellulaires du GB, permettant de créer une tumeur « mouvante », qui évolue en fonction de ses besoins ou des contraintes environnantes (par exemple thérapeutiques). Identifiés comme essentiels au développement des tumeurs et à leur résistance aux traitements, ces mécanismes font l'objet de nombreuses recherches.

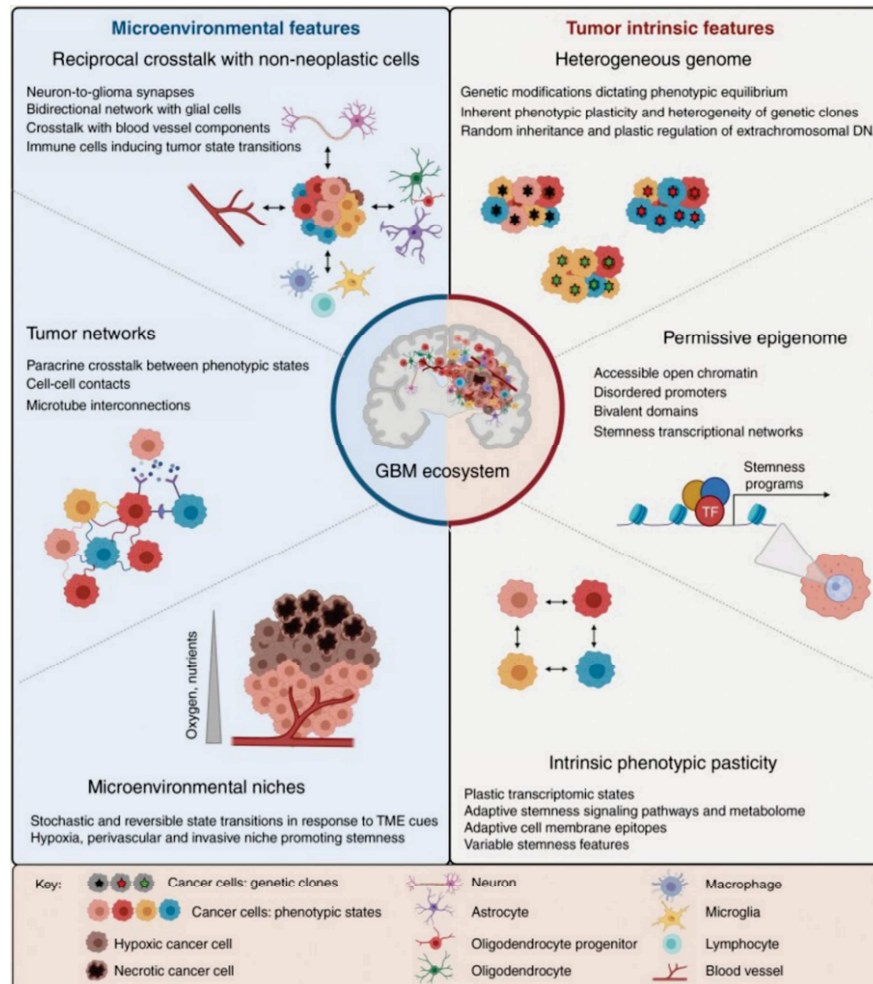


Figure 9 : Facteurs influençant l'hétérogénéité et la plasticité des glioblastomes (d'après Yabo et al., 2022 [127]).

1.1. Hétérogénéité intra-tumorale

Dans le GB, l'environnement cellulaire est complexe et hétérogène, notamment par la multitude de populations cellulaires présentes sur le site tumoral (Fig. 10).

Ce dernier implique d'une part le parenchyme cérébral envahi par le GB, à savoir les neurones, astrocytes et oligodendrocytes résidents du SNC ainsi que leurs progéniteurs (cellules souches neurales). Ce compartiment physiologique compte également les composants de l'UNV comme les cellules endothéliales et les péricytes qui forment les capillaires sanguins cérébraux, ainsi que les cellules du compartiment immunitaire cérébral (cellules dendritiques, macrophages et microglies, lymphocytes T infiltrants et cellules NK).

L'environnement tumoral est bien sûr aussi composé des cellules de GB, qui elles-mêmes forment différentes populations cellulaires se distinguant en fonction de leur morphologie, leurs caractéristiques moléculaires et génétiques mais aussi en fonction de leur état différencié ou non.

Comme c'est le cas dans de nombreux cancers, le GB montre une importante instabilité génomique, à l'origine de son hétérogénéité génétique et moléculaire. En effet, de nombreuses dérégulations génétiques (mutations ponctuelles, délétions, amplifications, translocations...) [111,128] ou épigénétiques (méthylations de l'ADN, remodelage de la chromatine, modifications des histones) [129], ont été identifiées dans le GB. Cette diversité génique résulte en une variété de régulations et d'expression protéiques soutenant différentes fonctions associées à la progression du GB. Les principales dérégulations géniques du GB sont développées précédemment dans ce manuscrit.

D'autre part, l'hétérogénéité intra-tumorale du GB s'illustre aussi sur le plan spatial. Plusieurs zones anatomiques se distinguent dans la tumeur : notamment le centre de la masse tumorale, des zones angiogéniques disséminées dans cette tumeur, ainsi que la bordure invasive (invasion collective ou *single-cell*). Ces différentes parties de la tumeur montrent des phénotypes morphologiques, métaboliques et moléculaires très différents, adaptés à leur fonction et à leur environnement [130].

La répartition différentielle des populations cellulaires de la tumeur, notamment des CSGs, ainsi que leurs interactions avec l'environnement cellulaire ou matriciel local, caractérisent des zones très spécialisées, appelées niches tumorales. Se distinguent notamment trois compartiments micro-anatomiques spécifiques : la niche périvasculaire, la niche hypoxique et la niche invasive [131,132].

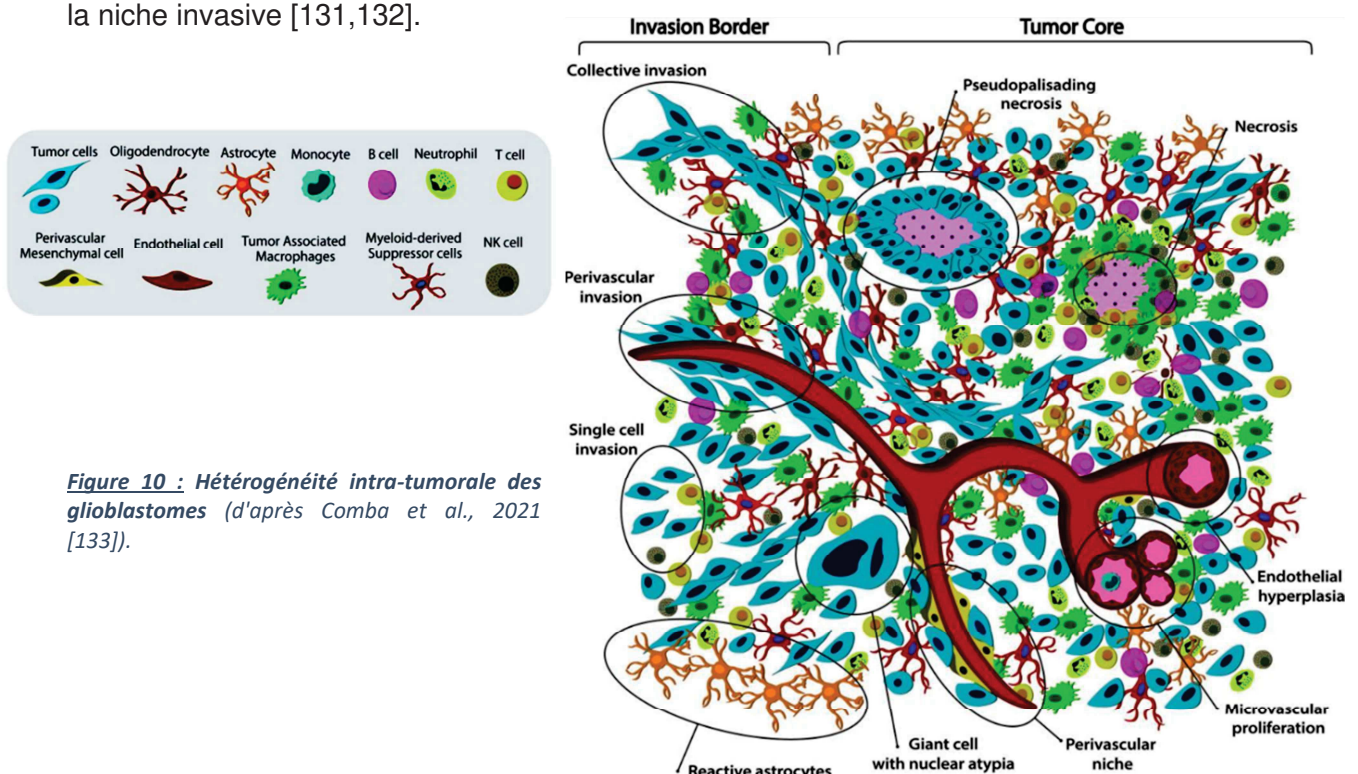


Figure 10 : Hétérogénéité intra-tumorale des glioblastomes (d'après Comba et al., 2021 [133]).

Les niches périvasculaires et hypoxiques sont logées dans la masse tumorale. Elles se distinguent l'une de l'autre par le niveau d'oxygène résident et la fonctionnalité du système vasculaire environnant.

Comme son nom l'indique, la niche périvasculaire est richement vascularisée et le siège d'une importante stimulation angiogénique. Caractéristique du cancer, cette angiogenèse anormale est également très présente dans le GB, et se traduit par la mise en place d'un réseau vasculaire désorganisé et relativement perméable, du fait d'une hyperplasie des vaisseaux et d'une intense prolifération microvasculaire. Ceci entraîne notamment une disruption locale de la BHE qui permet l'augmentation de la pression interstitielle et la mise en place de l'œdème cérébral dans le GB [131], ainsi que l'infiltration de cellules immunitaires à fonctions immuno-suppressives (recrutées par l'intermédiaire de cytokines sécrétées par la tumeur), participant secondairement à la progression du GB [134].

Cette angiogenèse est principalement liée à une activation de la voie du VEGF [135], largement surproduit par les cellules tumorales (ainsi que d'autres facteurs de croissance tels que FGF ou PDGF). De manière intéressante, une réciproque stimulation est observée entre le compartiment vasculaire et les CSG de la niche périvasculaire : les cellules endothéliales sécrètent des facteurs promouvant l'état souche des cellules de GB, entretenant ainsi une fraction élevée de cellules type souche dans cette niche tumorale [136] ; et parallèlement, les cellules type souche sont capables de produire d'importantes quantités de VEGF, stimulant en retour l'angiogenèse de manière excessive et anormale [98].

La niche hypoxique, quant à elle, présente au contraire un système vasculaire dysfonctionnel, du fait d'une croissance tumorale trop rapide, responsable d'un approvisionnement local en oxygène insuffisant [137]. Ceci conditionne la mise en place d'une forte influence hypoxique dans cette partie de la tumeur et même le développement de zones de nécrose tissulaire. Si les niveaux d'oxygène dans le cerveau fluctuent physiologiquement entre 2 et 10% d'O₂, ils peuvent chuter jusqu'à 0.1% dans les tissus tumoraux [138].

L'hypoxie locale joue un rôle crucial dans l'hétérogénéité et la plasticité du GB. En effet, elle active l'expression des facteurs HIF (*Hypoxia Induced Factor*), notamment HIF1 α et HIF2 α , des régulateurs transcriptionnels centraux permettant la survie des cellules de GB dans cet environnement hypoxique. Outre la survie, les facteurs HIF sont également impliqués dans la progression (invasion et prolifération) du GB, régulent son métabolisme et l'état de différenciation des cellules tumorales [139–141]. Notamment, ils favorisent l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement et la dédifférenciation, favorisant ainsi un enrichissement local en CSG [142,143].

Pour finir, la niche invasive se distingue des deux précédentes puisqu'elle concerne les cellules s'éloignant de la masse tumorale, envahissant le parenchyme cérébral, notamment par co-

option le long des vaisseaux sanguins qui cette fois sont plutôt fonctionnels [100]. Sur leur route, les cellules de GB de cette niche détruisent la structure particulière de l'UNV cérébrale en se glissant entre les pieds astrocytaires et les vaisseaux, rompant ainsi leurs contacts étroits et induisant l'activation des astrocytes [103]. Les cellules du compartiment invasif interagissent également largement avec la MEC, qu'elles détruisent au gré de leur progression grâce à la sécrétion de métalloprotéases (MMPs et ADAMs) [106,144].

Pour finir, l'intérêt de cette niche est crucial puisque les CSG de celle-ci, fortement motiles, sont décrites comme les principales responsables des récurrences du GB [145].

Bien sûr, les différentes zones et niches tumorales interagissent entre elles et s'auto-influencent, notamment par le biais de facteurs sécrétés (facteurs de croissance tels que VEGF, FGF, EGF..., ou autres facteurs du type TGF- β) qui stimulent invasion ou prolifération du GB.

Si cette hétérogénéité intra-tumorale est désormais largement observée à différents niveaux d'étude dans le GB (hétérogénéité moléculaire, cellulaire, anatomique), son origine est encore largement questionnée dans la communauté scientifique. Différents modèles et théories ont notamment été proposés mais elle repose probablement sur une conjonction de tous ceux-là. Ainsi, il est probable que plusieurs phénomènes s'entremêlent et participent à l'émergence de cette hétérogénéité comme la coexistence de cellules à haut potentiel tumorigénique (notamment les CSG), l'acquisition de mutations ou phénotypes conférant un avantage sélectif dans un environnement spécifique (sélection clonale), l'établissement d'interactions spécifiques avec le microenvironnement ainsi que l'adaptabilité/la plasticité des cellules tumorales de GB.

1.2. Plasticité cellulaire dans le GB

Tout comme le large panel de différences observées lorsque l'on questionne l'hétérogénéité des cellules de GB, leur plasticité s'illustre également à différents niveaux. Ajoutant encore un degré de complexité à cette hétérogénéité intra-tumorale, la plasticité des cellules de GB représente aujourd'hui un axe de recherche d'intérêt dans le GB puisqu'elle participe à l'initiation, la progression et la rechute du GB.

Dans ces mécanismes de plasticité, les CSG sont documentées comme étant d'une particulière importance. Précédemment définies comme une population cellulaire figée, placée du fait de sa multipotence au sommet de la hiérarchie cellulaire et donnant naissance à la diversité de populations présentes dans la tumeur, cette vision semble finalement plutôt étriquée. Les CSG semblent plutôt former un ensemble flexible qui coopère avec d'autres états cellulaires et s'adapte, évolue, par rapport à des facteurs intrinsèques ou extrinsèques comme

le microenvironnement ou la thérapie [127,146,147]. Par exemple, à la différence des cellules souches neurales, la différenciation des CSG n'est pas définitive et peut être réinversée [148,149]. Des CSG forcées à se différencier *in vitro* (par ajout de sérum dans le milieu de culture) puis replacées dans leurs conditions initiales ont montré des changements alternatifs de phénotypes, perdant des marqueurs souches tels que CD133 lors de l'étape de différenciation puis restaurant un phénotype CSG après retour dans les conditions favorables [148]. Ainsi, CSG et cellules différenciées du GB représentent finalement des simples états cellulaires différents et exhibent des capacités de flexibilité et d'adaptation en réponse à des stimuli ou suite à la modulation de leur environnement.

Cette théorie de plasticité des cellules de GB est tout à fait appuyée par la diversité de phénotypes observée dans le GB. Les différentes classifications du GB basées sur leurs signatures transcriptomiques montrent d'ailleurs des signatures intermédiaires entre les sous-types majoritaires identifiés, suggérant une mouvance des phénotypes moléculaires dans le GB [108,111]. L'impact du microenvironnement dans cette plasticité est de plus soutenu par la mise en place des niches tout à fait spécifiques, présentées dans la partie précédente, dont les adaptations sont régies par les caractéristiques de leur environnement (hypoxie), ou par leurs interactions avec les cellules environnantes.

1.3. Influence et échanges avec le microenvironnement

Au regard de l'importante influence environnementale sur l'évolution du GB, une attention particulière est portée depuis quelques années sur l'étude des interactions du GB avec son microenvironnement, et notamment avec les types cellulaires qui l'entourent (cellules neuronales, gliales, vasculaires ou immunitaires) [47,150,151]. Ici sont abordés quelques caractéristiques remarquables sous-jacentes aux échanges entre le GB et les principaux types cellulaires cérébraux, à savoir neurones, astrocytes et oligodendrocytes.

GB et neurones

Dès 2015, Osswald *et al.* ont montré qu'une large population de cellules de GB peut s'organiser sous forme de réseaux, interconnectés par le biais de longs prolongements appelés microtubes, favorisant la progression du GB et la résistance aux traitements [152,153]. Ces réseaux intercellulaires intra-tumoraux peuvent être activés par un signal neuronal, transmis aux cellules de GB via l'établissement de synapses glutamatergiques neurone-GB sur les microtubes tumoraux [154,155] ou par l'intermédiaire de sécrétions neuronales [156]. L'activation des cellules de GB par l'activité neuronale, électrique ou sécrétoire, aboutit secondairement à la promotion de la prolifération et de l'invasion tumorale [154–156].

Étonnamment, c'est une autre population cellulaire du GB qui par opposition ne forme pas de réseaux intercellulaires dans la tumeur, qui a été identifiée comme probablement à l'initiative de l'invasion tumorale du cerveau [157]. Cette sous-population GB initialement non-connectée reçoit également des influx neuronaux via une synapse glutamatergique, qui activent une signalisation calcique et corrént à la formation *de novo* de microtubes et donc l'établissement d'un réseau cellulaire intra-tumoral [157]. Parallèlement, une évolution des phénotypes cellulaires est observée : la population non-connectée enrichie en phénotype neuronal et NPC-like évolue suite à la stimulation neuronale vers un réseau cellulaire enrichi en phénotype MES-like [157].

Ainsi, le GB détourne des mécanismes et activités neuronales à son avantage, pour promouvoir sa colonisation du parenchyme cérébral [151,157] et développer/spécialiser son organisation tumorale, favorisant ainsi sa résistance aux traitements [152,153].

GB et astrocytes

En cas de trauma ou de pathologie cérébrale, en l'occurrence dans le GB, les astrocytes montrent un changement drastique de leur métabolisme et fonction, et deviennent « réactifs ». Cette transformation est associée à de nombreux changements génétiques, moléculaires, morphologiques et altère également les fonctions de signalisation des astrocytes. Délogés par le GB de leurs contacts avec les capillaires sanguins, les astrocytes se multiplient et augmentent leur motilité [103]. L'ensemble de ces modifications sont rassemblées sous le terme d'astrogliose réactive [158].

Ces astrocytes réactifs, étudiés dans d'autres pathologies, peuvent revêtir deux rôles diamétralement opposés : aider à la réparation tissulaire vers la guérison, ou au contraire, amplifier la neurotoxicité locale comme c'est par exemple le cas dans les pathologies neurodégénératives telles qu'Alzheimer [159–161].

Cependant, si l'implication des astrocytes réactifs dans la pathogénicité du glioblastome est encore relativement peu connue, quelques pistes récentes émergent. Notamment, la déplétion de ces astrocytes réactifs a été corrélée à une régression du GB et un allongement de la survie dans des modèles murins [162]. Cette même étude a révélé que les astrocytes initient des programmes transcriptionnels qui façonnent les compartiments immunitaires et métaboliques dans le microenvironnement du gliome. En effet, par l'expression de cytokines et facteurs de croissance attractants, ils activent le recrutement de macrophages associés à la tumeur et favorisent leur phénotype pro-tumoral [162]. Également, les cellules de GB semblent intégrer le cholestérol produit dans ces astrocytes réactifs et excrété via le transporteur ABCA1, et le blocage de ce transporteur induit en conséquence un arrêt de la progression du GB [162].

Watson et ses collègues ont également identifié des régulations métaboliques du GB par les astrocytes, par l'intermédiaire de transferts de mitochondries des astrocytes vers les cellules de GB via la formation de connections intercellulaires [163]. Ce transfert mitochondrial a été associé à une stimulation des capacités d'auto-renouvellement et de la tumorigénicité du GB [163].

GB et oligodendrocytes

De manière caractéristique, les GB envahissent le parenchyme cérébral le long des tracts axonaux myélinisés [164,165] et cette propagation est l'une des causes justifiant du mauvais pronostic du GB, mais le lien entre GB et oligodendrocytes est encore peu connu. D'intéressants travaux ont montré que des CSG de la frontière invasive du GB s'attachaient préférentiellement à ces tracts myélinisés, corrélant localement à une destruction de la structure myélinisée [164]. Parallèlement, une densité étonnante de cellules de la lignée oligodendrocytaire a été observée à la bordure tumorale du GB, et ceux-ci semblent induire *in vitro* la promotion du caractère souche et de la chimiorésistance des cellules de GB [166]. L'ensemble de ces travaux suggèrent ainsi l'implication des oligodendrocytes et leurs structures particulières de myéline dans la progression du GB.

B. Prise en charge thérapeutique

1. Diagnostic et symptomatologie du glioblastome

Le diagnostic et le traitement des glioblastomes doivent généralement être réalisés/initiés en urgence. En effet, les signes cliniques du GB sont principalement liés à l'œdème ou à la compression de zones cérébrales fonctionnelles par la tumeur, et sont donc généralement détectés à un stade de développement tumoral relativement avancé. De plus, les GB sont d'évolution rapide, le tableau clinique peut donc se dégrader tout aussi rapidement et les déficits neurologiques engendrés ne sont parfois pas (ou pas complètement) réversibles.

1.1. Signes cliniques

Les signes cliniques caractéristiques du GB sont relativement vagues et non spécifiques (communs à presque l'ensemble des tumeurs du SNC). Ils doivent cependant inciter à une recherche plus approfondie, à commencer par une imagerie cérébrale par IRM, sans attendre de dégradation clinique. Parmi eux, les plus fréquents sont les suivants [167,168]:

- Céphalées : d'apparition récente, elles sont variables selon la localisation, la taille et la vitesse de croissance de la tumeur. Elles augmentent en fréquence et en sévérité avec le temps, et peuvent s'accompagner de nausées et vomissements (du type migraines).
- Déficiences neurologiques focaux : ils diffèrent également selon la localisation et la taille de la tumeur et se développent graduellement avec l'évolution tumorale. Fréquemment, les patients atteints de GB (ou leurs proches) relatent des pertes de mémoire, des troubles du langage, de la vision ou de la cognition, fatigues (générale, cérébrale, oculaire...), confusions, paresthésies ou encore des changements de personnalité. Ils peuvent apparaître très tôt avant le diagnostic, il est donc important d'investiguer jusqu'à plusieurs semaines/mois au préalable en questionnant le patient et son entourage (personnel comme médical).
- Crises d'épilepsie : environ 20% des patients GB présentent des crises d'épilepsie inaugurales, et environ 20% de plus en développent plus tardivement.
- Hypertension intracrânienne : elle est fréquente à partir d'un stade avancé de développement de la tumeur. Elle est notamment détectable par examen optique car l'augmentation de la tension intracrânienne entraîne un gonflement des nerfs optiques et des papilles oculaires (papilloedème).

La détection des symptômes se fait par évaluation clinique et analyse de l'historique du patient. Elle peut être accompagnée de tests évaluant le niveau d'autonomie du patient (indice de

Performance Status de l’OMS, PS, ou de Karnofsky, KPS), son déficit cognitif (tests MMSE pour *Mini-Mental state examination*, MoCA pour *Montreal cognitive assessment*) ou neuromusculaire (échelle MRC pour *Medical reserch coucil*). Cependant, le diagnostic doit absolument, et au plus vite, être complété par une imagerie cérébrale.

1.2. Imagerie cérébrale

Sauf contre-indications, l’IRM est l’examen de référence pour le diagnostic de GB. L’IRM est réalisé sans et avec injection de produit de contraste (gadolinium) et comporte des séquences T1 avant et après injection du gadolinium ainsi que des séquences T2 ou FLAIR (*Fluid attenuated inversion recovery*) dans les 3 plans de l’espace, pour délimiter au mieux les zones tumorales (*Fig. 11*).

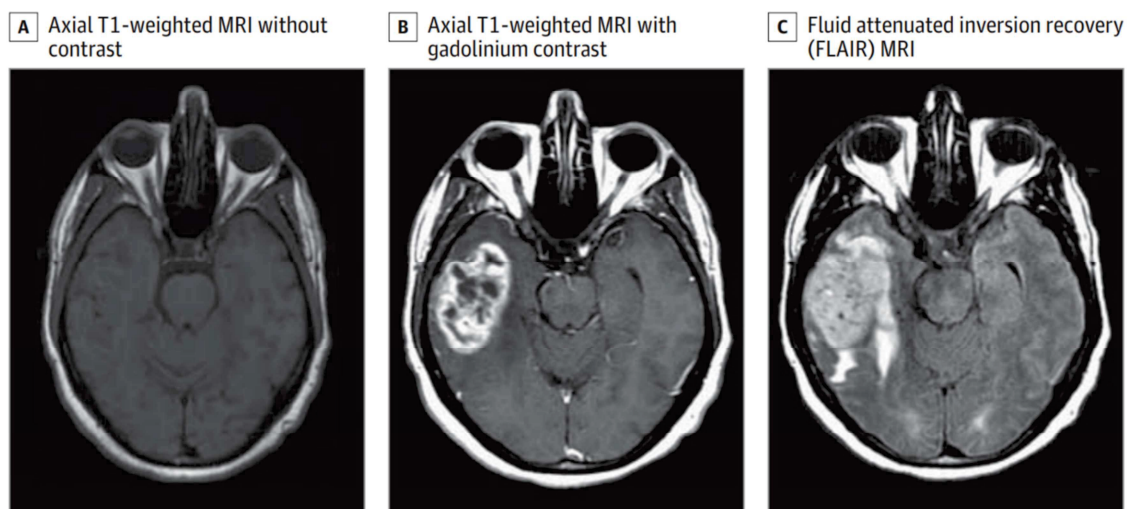


Figure 11 : IRM cérébral d’un patient atteint de glioblastome dans le lobe temporal droit (extrait de Omuro & DeAngelis, 2013 [168]).

A : IRM d’une coupe axiale de cerveau pondéré en T1 sans produit de contraste faisant apparaître l’eau et la substance grise hypointense (gris-noir) et la substance blanche hyperintense (blanc-gris clair). **B :** IRM pondéré en T1 avec injection de produit de contraste (gadolinium), faisant apparaître la masse tumorale (bordure hyperintense, nécrose centrale hypointense). **C :** FLAIR IRM permettant d’imager les lésions péri-tumorales notamment liées à l’œdème.

L’imagerie cérébrale est essentielle au diagnostic de GB mais est également un outil de suivi tout au long du processus thérapeutique, et notamment après un geste chirurgical ou avant une séquence radiothérapeutique. Il permet d’évaluer le volume du résidu tumoral, reconnu comme facteur pronostique (le plus faible est le volume résiduel de tumeur, meilleur est le pronostic), et son éventuelle progression [169,170].

1.3. Analyse de biopsie : histopathologie et recherche d’altérations géniques

Même lorsqu’une résection chirurgicale de la tumeur est impossible, la réalisation d’une biopsie de la tumeur est recommandée, permettant de confirmer le diagnostic grâce à l’examen

anatomopathologique et moléculaire du GB. Compte tenu d'une forte hétérogénéité dans les GB, les prélèvements doivent être multiples et répartis sur l'ensemble de la tumeur.

L'analyse histologique est couplée à un profilage moléculaire qui permet, depuis la nouvelle classification de l'OMS de 2021, de valider ou invalider le diagnostic de GB en fonction du statut mutationnel de l'IDH (une tumeur IDH mutée n'est désormais plus classée comme GB) [61]. Seront également réalisées en priorité : l'analyse du statut de méthylation du promoteur du gène *MGMT* et la recherche des mutations des gènes *ATRX*, *EGFR*, *BRAF* et du promoteur de *TERT*. Ces recherches permettront d'une part de préciser le diagnostic de GB, et d'autre part de guider le processus thérapeutique par l'inclusion ou non du patient dans différents essais cliniques (plus amplement détaillés dans la partie C – Explorations et challenges thérapeutiques dans le GB).

Les biopsies de tumeur peuvent également être prélevées et utilisées à des fins de recherche. Dans ce cas, le prélèvement de matériel biologique repose sur le préalable consentement éclairé du patient.

2. Prise en charge et traitements

La prise en charge thérapeutique des patients atteints de GB est soumise à l'évaluation et la délibération de plusieurs cliniciens de spécialités différentes (au minimum 3 spécialistes dont au moins un neurochirurgien, un neuro-oncologue, un oncologue-radiothérapeute) en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) de neuro-oncologie. La stratégie thérapeutique sera adaptée au cas par cas selon le patient et la tumeur qu'il présente.

2.1. Standard thérapeutique et suivi de progression des GB

Le standard de traitement chez les patients GB est appelé protocole Stupp et se compose d'une séquence en trois temps (Fig. 12) [171,172] :

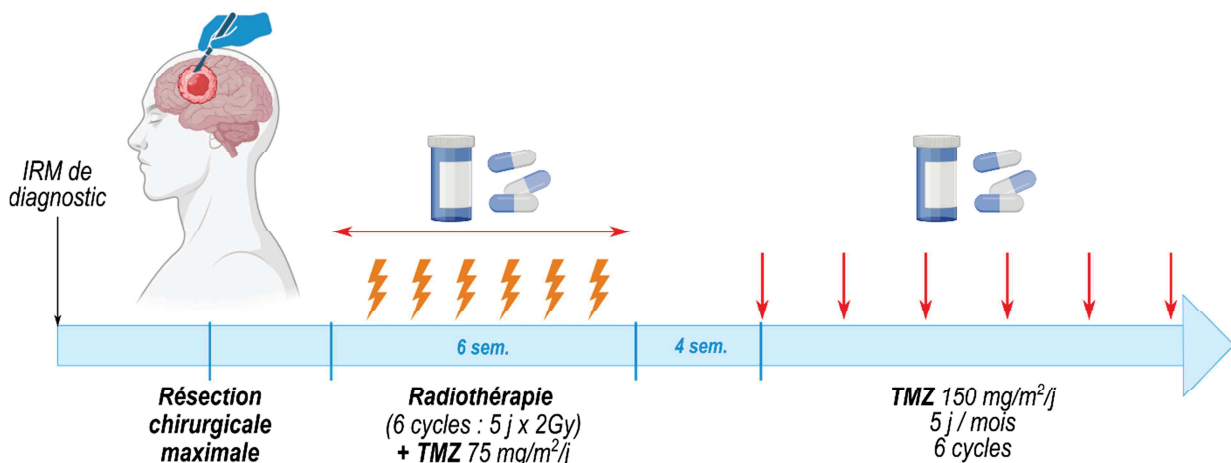


Figure 12 : Schéma thérapeutique du protocole STUPP.

- Résection chirurgicale maximale de la tumeur

Si la résection tumorale apporte un bénéfice sur la survie des patients GB [171], il est également essentiel de préserver au maximum le tissu cérébral sain environnant et de limiter autant que possible l'impact fonctionnel de la chirurgie sur la vie du patient. La décision d'opérer est prise en examinant attentivement les paramètres du patient, son âge, son état général et clinique, ses antécédents et comorbidités, mais également les paramètres de la tumeur (données anatomiques et fonctionnelles disponibles, sous-type tumoral, localisation).

Cela dit, lorsqu'elle est possible, la résection doit nécessairement être la plus large possible afin d'améliorer le pronostic du patient [169]. Depuis la mise en place du protocole Stupp en 2005, de nombreuses études ont analysé le lien entre l'étendue de la résection et la survie des patients. La définition de zones et de seuils de résection associés à un meilleur pronostic permet notamment de guider les neurochirurgiens [173,174]. De plus, la résection supra-maximale, c'est-à-dire la résection de la tumeur au-delà des limites de la prise de contraste sur IRM (zones histologiques anormales détectées par IRM FLAIR) est de plus en plus questionnée et semble offrir une potentielle voie vers l'amélioration des pratiques et de la survie des patients, sans augmenter leurs comorbidités [175].

Des nouveautés techniques ont aussi permis aux neurochirurgiens d'optimiser l'exérèse chirurgicale en limitant les potentiels dommages engendrés. Parmi celles-ci, on peut citer quelques outils techniques tels que des microscopes opératoires, les IRM pré- ou per-opératoires, la neuronavigation, ainsi que des méthodes innovantes telles que la résection fluoroguidée (thérapie photo-dynamique avec du 5-ALA, pour acide 5-aminolevulinique) ou la chirurgie éveillée. Ces dernières se développent de plus en plus en France : la résection fluoroguidée permet d'améliorer la qualité de la résection tumorale et la survie des patients [176,177], la chirurgie éveillée est plutôt employée pour les cas de tumeurs implantées en zone fonctionnelle pour réduire au maximum les risques de déficits neurologiques post-opératoires [178].

Une IRM post-opératoire est toujours réalisée pour apprécier précisément l'étendue de la résection.

- Concomitante association de radiothérapie et chimiothérapie

Une association de radiothérapie avec chimiothérapie concomitante a montré un bénéfice pour les patients par rapport à une radiothérapie classique [171]. Cette séquence est débutée quelques semaines après la résection chirurgicale, en fonction de la guérison post-opératoire. La dose délivrée est au total de 60 Gy, fractionnés en 30 doses de 2 Gy par jour, 5 jours par

semaine, donc pour une durée totale de 6 semaines. Cette dose peut être adaptée en fonction de l'âge ou de l'état clinique du patient. Une IRM de contrôle sera réalisée post-radiothérapie.

En parallèle, la chimiothérapie repose sur l'administration d'un agent alkylant, le témozolomide (TMZ, Temodal) à la dose de 75 mg/m²/jour, à compter du premier jour de radiothérapie et tout au long des 6 semaines. Administré oralement sous forme de pro-drogue, le TMZ subit une conversion chimique rapide à pH physiologique de l'estomac pour générer sa forme active, le monométhyl triazénoïmidazole carboxamide. Cette molécule active va secondairement induire une alkylation des résidus guanine de l'ADN en position O6 et en position N7. Les bases guanidiques alors méthylées (floquées d'un groupement –CH₃) ne peuvent plus reconnaître leur base complémentaire thymine entraînant un blocage de la réplication et la transcription de l'ADN qui aboutit à la mort cellulaire.

Ces mésappariements sont reconnus par des systèmes physiologiques de réparation de l'ADN comme l'enzyme MGMT ou le système MMR (*Mismatch Repair*), qui vont respectivement corriger le mésappariement ou entraîner des cassures double-brins létales pour la cellule, et donc participer à la résistance ou à la sensibilité au TMZ. Cependant, le système MGMT est souvent altéré dans le GB (d'où l'importance d'inclure le dépistage du statut MGMT dans le diagnostic moléculaire), aboutissant à terme à une plus grande sensibilité au TMZ [90,179].

- Chimiothérapie adjuvante au TMZ

Une fois la radiochimiothérapie terminée, une pause de traitements de 4 semaines est généralement instaurée, suivie d'une chimiothérapie adjuvante au TMZ [171]. Cette chimiothérapie est administrée en cycles de 5 jours tous les 28 jours à une dose de départ de 150 mg/m²/jour pour le premier cycle, puis 200 mg/m²/jour pour les cycles suivants, sur un total de 6 cycles.

En raison d'une forte toxicité hépatique et myéloïde du TMZ chez les patients, un contrôle étroit de la fonction hépatique, de la formule sanguine et d'éventuelles infections opportunistes doit être mis en place et peut conditionner l'arrêt du traitement ou la mise en place de traitements prophylactiques complémentaires.

A noter, depuis sa validation par la Haute Autorité de Santé en 2021 et suite à des études encourageantes [180], un traitement par générateur de champ électrique antimitotique (TTFs pour *Tumor Treating Fields*) est mis en place en association avec le TMZ pour le traitement d'entretien. Ce dispositif médical de TTFs, détaillé dans la suite de ce manuscrit en partie C – 3.4, vient compléter le protocole STUPP pour le traitement du GB nouvellement diagnostiqué et se place en tête des avancées thérapeutiques les plus significatives en matière d'innovation pour la prise en charge du GB [180].

2.2. Traitements symptomatiques

En plus du protocole Stupp destiné à traiter directement le GB, les patients se voient souvent prescrire un traitement complémentaire pour pallier les symptômes et conséquences cliniques du GB [167,168].

Les corticostéroïdes, comme la dexaméthasone, sont fréquemment prescrits pour réduire l'œdème (et donc la compression) péri-tumoral, permettant ainsi d'apaiser les céphalées, nausées, vomissements, l'inflammation et de limiter la pression intracrânienne.

Des antiépileptiques (le plus souvent levetiracetam ou acide valproïque) peuvent également être indiqués chez les patients présentant des crises d'épilepsie. Ils sont parfois prescrits en prévention pré- ou post-opératoire pour limiter le risque de survenue de crises après résection tumorale, même si cette indication n'est plus recommandée [181,182].

Également, des antalgiques de différents paliers sont couramment utilisés pour réduire les douleurs et des diurétiques pour favoriser le drainage liquidien et réduire l'œdème cérébral.

Des soins de support non médicamenteux peuvent également être indiqués en fonction de l'état clinique du patient et de ses symptômes (kinésithérapie, orthophonie, rééducation...).

2.3. Traitement des récurrences

Malgré une élaboration de ce plan thérapeutique il y a presque 20 ans [171] et faute de meilleure alternative disponible depuis, le protocole Stupp est toujours d'actualité. Bien qu'il permette d'allonger le temps de survie totale des patients, il ne permet pas une rémission complète et la majorité d'entre eux présentent rapidement des récurrences malgré les traitements. En quelques chiffres, à 5 ans post-diagnostic, 6 à 14% des patients GB survivent et 2 à 7% d'entre eux seulement n'ont pas montré de signes de progression [172]. De plus, dans 80% des cas, ces récurrences émergent dans la même zone que la tumeur initiale [183,184].

Cet important taux de rechutes conditionne la mise en place d'un suivi régulier et ininterrompu, clinique et par IRM tous les 2 à 4 mois (une IRM réalisée post-radiothérapie sert de comparatif). Dans 30 à 40% des cas des GB nouvellement diagnostiqués, la réalisation d'une IRM dans les mois qui suivent la radiochimiothérapie montre une augmentation de la prise de contraste associée à la tumeur [185]. Ce phénomène est appelé « pseudo-progression » et n'est pas forcément corrélé à une « réelle » progression tumorale *a posteriori*. Afin d'aider les cliniciens à conclure sur l'effectivité du traitement et/ou la progression de la pathologie, un groupe de travail en neuro-oncologie (RANO, *Response Assessment in Neuro-Oncology Working Group*) a établi une liste de critères de réponse pour les gliomes de haut grade [186,187] (*Annexe I*). Il est donc décidé, en raison de la forte incidence de pseudo-progression

dans cette période précoce, que la confirmation ou non de la progression du GB serait évaluée par IRM au moins 12 semaines post-radiothérapie. Les critères RANO sont également déterminants pour l'analyse standardisée des résultats d'essais cliniques de nouvelles thérapies.

Les rechutes sont souvent rapides (médiane de 7 à 10 mois post-thérapie), agressives et plus résistantes aux traitements que la tumeur initiale, portant la médiane de survie après progression entre 6 mois et environ 2 ans maximum [168,172,183]. Malgré tout, il n'existe aucun standard thérapeutique ni consensus pour le traitement des récurrences du GB. Ce traitement secondaire sera donc systématiquement décidé après concertation multidisciplinaire en RCP. Plusieurs alternatives sont discutées en fonction des facteurs pronostiques (âge, comorbidités) et de l'état clinique du patient (indice KPS/PS, taille et localisation de la progression...). Une reprise chirurgicale et/ou de la radiothérapie peut être envisagée [170], et dans 50 à 70% des cas une nouvelle chimiothérapie est mise en place [171,172]. Plusieurs agents antinéoplasiques ont déjà été introduits dans ce contexte de rechute, avec des effets toutefois mitigés et variables entre les patients : la réintroduction du TMZ, le bevacizumab (détaillé dans la partie suivante), ou encore les agents nitrosourés tels que la carmustine (placé localement sous forme d'implant dans la cavité de résection, en cas de première ou seconde chirurgie) ou la lomustine (meilleurs résultats actuels pour les récurrences) [188–190].

C. Explorations et challenges thérapeutiques dans le GB

Malgré le lourd protocole thérapeutique mis en place, le pronostic du GB reste défavorable et le bénéfice du protocole Stupp relativement modéré (médiane de survie de 15 mois, contre 12 mois pour les patients ne bénéficiant que d'une radiothérapie) [172]. Dans ce contexte, la recherche de nouveaux traitements reste nécessaire et urgente.

Cependant, cette recherche de nouvelles thérapies se heurte à plusieurs obstacles, notamment du fait de la localisation cérébrale du GB qui implique un critère de ciblage précis pour épargner le tissu nerveux environnant et impose une barrière solide, quasi imperméable, la barrière hémato-encéphalique. Diverses approches expérimentales, quelque peu détaillées dans cette partie, ont été développées et sont en cours d'évaluation par des essais cliniques. D'autre part, l'hétérogénéité et la plasticité cellulaire et moléculaire du GB sont également un défi de taille à surmonter pour la thérapie : l'établissement de co-thérapies pourrait être la clef pour cibler conjointement différents aspects du GB, éliminer le maximum de la population tumorale et éviter les résistances.

1. Une localisation sensible

Le SNC est le système le plus complexe du corps humain, tant sur le plan architectural qu'au niveau fonctionnel. Il assure de nombreuses et diverses fonctions, du mouvement au comportement, qui sont, dans la plus grande majorité d'entre elles indispensables à la survie ou au bon fonctionnement du corps humain. Il est donc aisé d'envisager les répercussions importantes que peuvent avoir des pathologies cérébrales sur la vie des patients, mais il faut également envisager les importantes difficultés qu'implique un système aussi complexe pour la prise en charge et le traitement de ces pathologies cérébrales.

Le nombre de cellules rassemblées dans l'environnement restreint et compact du cerveau est impressionnant, dépassant les 200 milliards [24,191]. Au-delà du nombre de cellules, il faut surtout imaginer des ensembles de réseaux interconnectés, puisque chaque cellule du SNC forme de nombreuses connexions avec ses voisines. Un neurone, par exemple, établit en moyenne une centaine de connexions synaptiques, reçoit au moins autant de connexions au niveau de ses dendrites et corps cellulaire, et interagit de plus avec des cellules gliales par l'intermédiaire de connexions non-synaptiques.

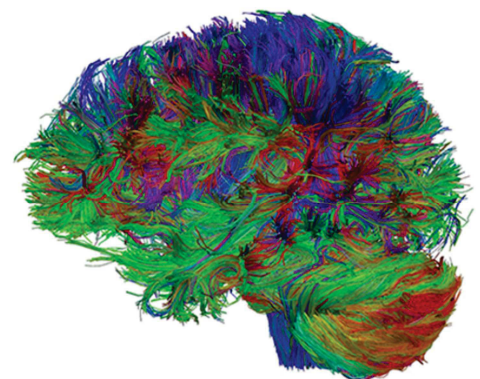


Figure 13 : Tractogramme du cerveau humain, d'après [52]. Réseaux axonaux de la matière blanche reconstitués par tractographie à partir d'un IRM de diffusion. Data extraite de The Human Connectome Project [53,54].

Si l'on connaît aujourd'hui, avec plus ou moins de précision, la relation entre structure et fonction de tous les organes, l'exception à cette règle reste certainement le système nerveux. Depuis plus de 10 ans, la communauté neuroscientifique tente de déterminer avec précision l'organisation de ces connexions intercellulaires pour les lier à différentes fonctions cérébrales, et enfin décrypter le connectome humain [192–194]. En effet, malgré une composition cellulaire relativement simple (neurones et cellules gliales), les fonctions et morphologies de chaque type cellulaire sont extrêmement variées et complexes, apportant une énorme diversité cellulaire [195].

Dans ce contexte, le GB vient totalement altérer l'organisation anatomique et fonctionnelle du SNC. Certaines adaptations de ce dernier sont à l'origine des troubles neurologiques observés dans le GB, comme par exemple l'œdème ou les altérations de la connectivité cérébrale générant des troubles cognitifs.

La plasticité cérébrale permet cela dit une certaine marge d'adaptation, grâce à laquelle les cellules cérébrales sont capables de moduler leur structure, leur fonction et leurs connexions. Ces modulations sont directement liées à la fonctionnalité, la localisation et l'environnement de la cellule [196]. Cependant, la neurogenèse adulte étant très réduite et localisée [197], la plasticité cérébrale s'exerce principalement par une dynamique axonale, dendritique ou une plasticité des structures synaptiques [198,199], et ne permet pas de compenser les dégâts induits par le GB lui-même ou par ses thérapies agressives.

Ainsi, le protocole thérapeutique établi chez les patients atteints de GB est en fait nécessairement réévalué au cas par cas en fonction de l'étendue des dommages constatés dans le SNC, de ceux surajoutés par une chirurgie cérébrale ainsi qu'une radio-chimiothérapie et du rapport bénéfice/risque représenté pour le patient.

2. Le SNC : un système bien protégé

Bien qu'il ne représente que 2% du poids du corps, le cerveau consomme environ 20% du glucose et de l'oxygène du corps [200], et nécessite donc un afflux sanguin important et rapide pour approvisionner efficacement les zones cérébrales actives. Richement vascularisé pour pallier aux risques de manque d'oxygénation ou d'hypoglycémie très toxiques pour les cellules cérébrales, le SNC contrôle cependant de manière très fine tout ce qui provient de l'apport sanguin. L'unité neurovasculaire, introduite précédemment, est la structure qui régule ces échanges entre la circulation sanguine et les cellules cérébrales.

Au sein de cette UNV, les cellules endothéliales s'organisent en monocouche tubulaire formant ainsi une barrière protectrice, appelée la barrière hémato-encéphalique (BHE, ou BBB pour *blood-brain barrier*) [201]. Cette protection est assurée grâce à un complexe de jonctions

étroites et adhérentes entre les cellules endothéliales assurant une faible perméabilité paracellulaire, filtrant ainsi le passage de molécules et d'éventuels déchets entre le sang et le SNC [202,203]. Ainsi, la BHE est une structure essentielle du SNC permettant de limiter l'entrée de pathogènes, de substances neurotoxiques ou simplement de cellules sanguines dans le cerveau, pouvant être à l'origine d'une inflammation et perturber son fonctionnement [202].

Extrêmement régulée, elle est entourée de péricytes avec qui elle forme d'étroits contacts et partage une membrane basale. Ces péricytes participent aux échanges métaboliques et ioniques avec les cellules endothéliales mais ont aussi un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la BHE, en participant à la vasorégulation des capillaires sanguins et à la phagocytose des métabolites toxiques [204,205].

Les pieds astrocytaires viennent également recouvrir la BHE pour former la « *glia limitans* ». Ils participent à sa mise en place et à sa régulation dynamique par l'intermédiaire de facteurs sécrétés [206–208] mais leur présence rapprochée des capillaires est plus certainement liée à leur fonction nourricière du SNC.

Ainsi, malgré un réseau vasculaire développé et actif, l'accès au SNC reste très difficile et représente l'un des grands défis dans le traitement des tumeurs cérébrales comme le GB. En effet, pour atteindre l'ensemble des zones tumorales et produire un effet thérapeutique, l'utilisation de composés capables de traverser efficacement la BHE est préférable, et cette condition réduit drastiquement la liste des candidats possibles.

Cependant, il faut considérer que dans la majorité des cancers, un remodelage localisé de l'architecture vasculaire est observé, notamment pour soutenir la demande nutritionnelle de ces cellules prolifératives [209]. Les tumeurs cérébrales, ne faisant pas exception, montrent presque toujours des capacités de co-option, de stimulation de l'angiogenèse mais également une disruption de la BHE [103,210–212]. Cette altération de la BHE peut ainsi entraîner l'augmentation de la perméabilité cérébrale à différentes molécules, comme cela a été montré par la diffusion intense d'agents de contraste dans les masses tumorales de GB (et plus généralement dans tous les gliomes) [213], et donc représenter une porte d'entrée intra-tumorale pour des agents thérapeutiques à faible biodisponibilité cérébrale (c'est le cas par exemple du Bevacizumab, détail ci-après).

Néanmoins, les techniques IRM permettant d'apprécier la perméabilité de la BHE semblent montrer une forte hétérogénéité spatiale quant à l'altération de la BHE dans le GB, mettant en évidence des ruptures localisées de la BHE mais également des zones intègres. Ainsi, un traitement basé uniquement sur une perméabilité de la BHE semblerait insuffisant et ne permettrait pas de cibler l'ensemble des zones tumorales [214,215].

Dans ce contexte, des stratégies thérapeutiques sont développées pour optimiser la biodisponibilité cérébrale de thérapies ciblées [216,217]. Parmi celles-ci, des approches invasives comme les injections intracérébrales ou l'implantation de dispositifs (gels, implants...) directement dans la cavité formée après résection tumorale [218,219]. D'autres techniques non-invasives sont également à l'étude : des approches moléculaires *via* le ciblage de récepteurs déjà présents sur la BHE (traitement couplé à un peptide reconnaissant le récepteur) [220] ou le blocage des systèmes d'efflux liés aux transporteurs ABC (responsables du transport des xénobiotiques notamment) [221,222] ; des approches de thérapie génique médiées par des virus [223] ; ou bien des approches physiques destinées à augmenter la perméabilité de la BHE par des ultrasons, par des radiations ou par encapsulation de molécules chimiothérapeutiques dans des nanoparticules lipophiles [224–226].

A ce jour, malgré d'intéressants développements scientifiques et pharmacologiques, ces stratégies thérapeutiques n'ont pas encore donné lieu à un important bénéfice thérapeutique (peu d'effet anti-cancer ou importants effets toxiques indésirables), ou bien n'ont pas encore franchi l'étape de la clinique. L'hétérogénéité de structure de la BHE dans le GB, parfois protectrice et d'autres fois obstacle pour la thérapie, reste un paramètre essentiel à considérer pour le développement thérapeutique et clinique.

3. Exploiter les spécificités du GB : avancées thérapeutiques et essais cliniques actuels

En considérant les dérégulations connues dans le GB, plusieurs molécules semblent appropriées dans le traitement du GB. Certaines ont même déjà montré leur efficacité dans différents autres cancers. Cette partie présente quelques-unes des principales pistes thérapeutiques développées ces dernières années mais, au vu du nombre très important d'essais développés dans le GB, ne souhaite pas être exhaustive.

3.1. Inhiber l'angiogenèse tumorale

Certains traitements en cours d'évaluation tirent donc avantage de l'augmentation de perméabilité de la BHE dans le GB afin de diffuser dans le parenchyme cérébral. C'est le cas par exemple du bevacizumab (ou Avastin), l'un des traitements complémentaires au Stupp les plus prescrits dans le GB. Le bevacizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), un facteur pro-angiogénique favorisant la croissance de néo-vaisseaux surexprimé dans le GB.

Sur la base de plusieurs essais cliniques de phase III montrant une amélioration de la survie sans progression des patients [227], seul ou en association avec lomustine [188] ou irinotécan [227], le bevacizumab est approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) depuis 2009

pour le traitement des GB récidivants. Cependant, les instances européennes n'ont pas directement suivi la FDA et les effets du bevacizumab sont encore à l'épreuve dans de nombreux essais cliniques : en co-thérapie de première ligne avec le protocole Stupp contre les GB nouvellement diagnostiqués, ou pour le traitement des récurrences, le bénéfice du bevacizumab reste discuté et ne permet pas d'augmenter la survie globale [228,229].

3.2. Dérégulations génétiques et thérapies ciblées

La majorité des traitements actuellement en essais cliniques dans le GB ciblent la voie RTK/RAS/PI3K, dérégulée dans plus de 80% des GB. Les inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK) de 1^{ère}, 2^{ème} ou 3^{ème} génération (erlotinib, gefitinib, afatinib, dacomitinib, dasatinib...) ont montré une efficacité notable dans certains cancers [230]. Les premiers résultats dans le GB montrent pourtant très peu de bénéfices pour les patients (légère augmentation de la survie sans progression, mais pas de la survie totale) [231–234]. Pour l'instant, ce résultat concerne aussi bien les inhibiteurs dirigés spécifiquement contre un récepteur, EGFR, PDGFR ou HER2 notamment, que les inhibiteurs multikinases ciblant plusieurs récepteurs à la fois mais de nombreux essais cliniques sur des inhibiteurs multikinases sont encore en cours [235].

De la même manière, les anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs EGFR, comme le cetuximab, panitumumab ou nimotuzumab, n'ont pas montré d'amélioration du pronostic des patients GB, utilisés seuls ou en combinaison avec des traitements standards [236,237].

D'autres molécules ont été développées pour cibler cette grande voie de signalisation impliquée la régulation de la prolifération et la survie cellulaire. Plusieurs d'entre elles sont en place comme traitement de certains cancers, ou montrent des résultats encourageants dans les études *in vitro* ou *in vivo*, mais pourtant la quasi-totalité échoue à montrer un bénéfice dans le traitement du GB. C'est le cas des inhibiteurs de mTOR [238–240], de PI3K [241,242], AKT [243], mais également des inhibiteurs de la voie des MAPK comme le sorafenib (inhibiteur multikinase) [244]. Les inhibiteurs de BRAF et MEK (dabrafenib + trametinib), actuellement indiqués dans le traitement des mélanomes ou des cancers bronchiques, sont également en évaluation dans les GB nouvellement diagnostiqués (essai de phase II).

D'autres approches thérapeutiques s'intéressent plutôt aux dérégulations régissant l'importante motilité du GB, et donc par conséquent aux interactions entre les cellules de GB et leur microenvironnement. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires centraux pour l'attachement cellulaire à la MEC [245]. Ainsi, elles sont directement impliquées dans les mécanismes adhésion, migration et prolifération cellulaires des cellules cancéreuses [245]. Dans le GB, il a été démontré que la surexpression de certaines intégrines (notamment $\alpha\beta3$ et

$\alpha\beta5$) à la surface des cellules tumorales est promue par le facteur de croissance transformant TGF β , le tout favorisant la migration des cellules de GB [246]. D'autre part, la surexpression de certaines sous-unités des intégrines a été spécifiquement identifiée dans les GSCs, corrélée à l'expression de marqueurs souche tels que SOX2 ou encore Olig2, CD133 [247–249]. Ces intégrines représentent ainsi des cibles de choix pour éliminer ces GSCs, notamment impliquées dans les résistances thérapeutiques actuelles [250].

A ce jour, l'inhibition de la voie $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ par traitement au cilengitide n'a pas montré d'amélioration du pronostic des patients GB [251,252]. Cependant d'autres intégrines émergent comme possibles cibles thérapeutiques, seules ou en co-traitements pour favoriser une sensibilisation aux thérapies standards [248,249], une activation immunitaire [253] ou un ciblage par des virus oncolytiques [247].

3.3. Ciblage de populations spécifiques

Alternativement aux thérapies ciblées qui visent un dysfonctionnement des cellules de GB, les immunothérapies visent le système immunitaire (SI) du patient, et souhaitent activer ou restaurer la réponse immunitaire anti-tumorale. En d'autres termes, le but serait de transformer le GB de tumeur « froide », c'est-à-dire sans infiltration immunitaire, en tumeur « chaude » avec infiltration immunitaire anti-tumorale active, pour lesquelles les immunothérapies elles-mêmes sont plus efficaces.

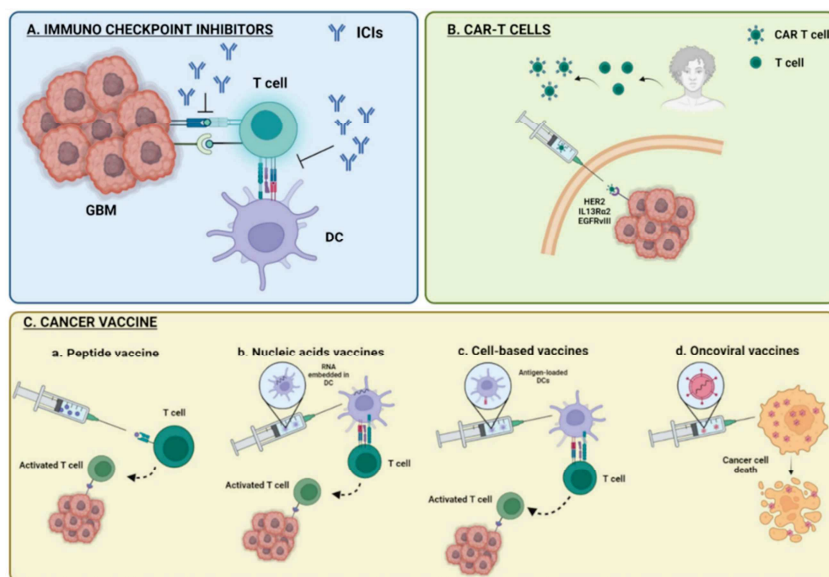


Figure 14 : Stratégies immunothérapeutiques en cours d'évaluation dans le GB (extrait de Segura-Collar et al., 2023 [254]).

A. Immunothérapie basée sur l'inhibition des checkpoints immunitaires (ICIs) : inhibition de l'immunosuppression induite par la tumeur. **B.** Approche immunothérapeutique via les cellules CAR-T : lymphocytes T de l'hôte modifiés et activés *in vitro* contre des antigènes tumoraux avant d'être réinjectés par transplantation autologue. **C.** Différentes approches de vaccination anticancéreuse permettant la stimulation du SI contre différents antigènes tumoraux.

Les inhibiteurs de checkpoint immunitaires (ICI) font partie des immunothérapies ayant réellement révolutionné les traitements anti-cancéreux ces dernières années [255]. Ils agissent en bloquant le mécanisme d'inhibition du SI par la tumeur. Plus précisément, les ICI inhibent l'interaction entre des protéines appelées « checkpoint immunitaires », telles que CTLA-4 et PD-1, et leurs récepteurs présents à la surface des lymphocytes. En temps normal, ces

interactions sont régulatrices de la réponse immunitaire, mais en contexte cancéreux, ce mécanisme est détourné par la tumeur à son profit : les cellules cancéreuses expriment ces molécules checkpoint et vont ainsi supprimer la réponse immunitaire à leur rencontre. Les ICI permettent donc de bloquer ce mécanisme d'échappement immunitaire.

Parmi les ICI, l'ipilimumab est un anticorps monoclonal se fixant sur l'antigène 4 des lymphocytes T (LT) cytotoxiques (CTLA-4) qui régule directement leur activité. Le blocage par ipilimumab supprime cette régulation, augmente le recrutement de LT cytotoxiques autour de la tumeur et leur activité. Cependant, l'efficacité de cette molécule est encore en cours d'évaluation dans le GB [256].

D'autre part, le nivolumab cible le récepteur PD-1 (programmed death-1) situé sur les LT et bloque son interaction avec son ligand PD-L1, lui-même présent sur les cellules présentatrices d'antigène ou sur les cellules tumorales. Testé dans le cadre du traitement du GB lors d'essais cliniques de phase III suite à des premiers résultats encourageants, le nivolumab n'a finalement pas permis d'augmenter la survie des patients GB nouvellement diagnostiqués [257,258], ni d'apporter un meilleur bénéfice que le bevacizumab dans les GB récurrents [259]. L'association de ces deux ICI n'a pas non plus montré de bénéfices dans le traitement du GB, voire même entraîné une plus forte toxicité immunitaire [260].

D'autres approches immunitaires commencent à faire leurs preuves dans le traitement du cancer, comme l'utilisation de cellules CAR-T ou la vaccination anticancéreuse.

Les cellules CAR-T sont des lymphocytes T prélevés chez le patient puis modifiés *in vitro* par ajout d'une molécule CAR (*Chimeric Antigen Receptor*) responsable d'une activation des LT suite à l'exposition à des antigènes tumoraux [261]. Une fois activés et multipliés par expansion clonale, ces LT modifiés appelés cellules CAR-T sont réintroduits chez le patient afin de générer une réponse immunitaire anti-tumorale [262]. Cette nouvelle technologie appliquée au traitement du GB a donné lieu à 3 essais cliniques évaluant l'efficacité de cellules CAR-T générées contre 3 différents antigènes tumoraux [263] : le variant VIII du récepteur EGFR (EGFRvIII), le récepteur humain à l'EGF HER2 (ou ERBB2) et le récepteur à l'interleukine-13 (IL-13R α 2) [264–266]. Ces premiers essais cliniques ont validé la sécurité de ces thérapies chez le patient (ayant par ailleurs montré de sérieux effets indésirables immunitaires dans d'autres cancers [261]), cependant leur efficacité reste mitigée : quelques cas présentent des signes encourageants de GB stabilisé ou de survie prolongée mais d'autres cas ne montrent aucune efficacité [264–267]. De plus, les tumeurs secondaires qui repoussent après thérapie cellulaire CAR-T ont souvent perdu l'antigène d'intérêt ciblé par les CAR-T [265]. Cette adaptation met en lumière une résistance de la tumeur certainement liée à une expression hétérogène de l'antigène d'intérêt dans la tumeur ou à une pression de sélection entraînant sa perte. Dans ce contexte, des cotraitements avec d'autres immunothérapies (par exemple les

ICI) semblent une piste intéressante pour amplifier/prolonger la réponse immunitaire des CAR-T et favoriser la présentation d'épitopes tumoraux au SI [268].

Les vaccins anti-cancéreux ont pour but, quant à eux, d'activer le SI du patient de manière physiologique contre des antigènes tumoraux, et permettre d'enclencher une mémoire immunitaire à long-terme qui pourrait prévenir les rechutes [254]. Les antigènes tumoraux présentés au SI sont divers : il peut s'agir de peptides, d'acides nucléiques ou de cellules elles-mêmes primées avec des antigènes [269]. Pour l'instant, les vaccins peptidiques comme le Rindopepimut (peptide spécifique de EGFRvIII) n'ont pas montré d'augmentation de la survie des patients. Des approches multipeptidiques sont développées et en cours d'évaluation [270]. Le problème de ces thérapies réside dans la variabilité mutationnelle des antigènes ciblés pouvant exister d'un patient à l'autre. Ainsi, de récentes recherches s'intéressent à l'établissement de thérapies ciblées au cas par cas, adaptée au patient et à sa signature néo-antigénique spécifique [271,272]. Encore en phase précoce d'évaluation clinique, ces approches personnalisées semblent prometteuses, mais quelques interactions avec d'autres molécules du protocole thérapeutique réduisant la réponse immunitaire, telles que la dexaméthasone, doivent être étudiées de manière plus approfondie.

3.4. Technologies spécifiques pour le traitement du GB

Au-delà des immunothérapies, d'autres technologies se développent pour améliorer le traitement des GB. Notamment, il faut noter l'approche originale non-médicamenteuse des « Tumor Treating Fields » (TTFs), champs électriques de faible intensité et fréquence (200kHz) appliqués sur le crâne et ciblant spécifiquement les cellules de GB [180]. Ces TTFs induisent un arrêt mitotique et une entrée en apoptose des cellules à division rapide [273]. Le dispositif se présente sous la forme de 4 transducteurs formés de 9 électrodes, à placer directement sur le crâne rasé, connecté à un générateur qui envoie en continu des champs électriques de 200kHz. L'appareil ne nécessite pas une hospitalisation, facilitant l'acceptance des patients, mais doit être porté au maximum en continu (au moins 18h par jour).

Dans un essai de phase III, l'ajout d'une thérapie par TTFs au traitement standard a montré une augmentation de la survie totale et de la survie sans progression des patients, en comparaison avec le traitement standard seul. Avec les TTFs, la médiane de survie totale s'élève à 20.9 mois contre 16 mois sans les TTFs, et la survie sans progression à 6.7 mois contre 4 mois sans les TTFs, et ce sans augmenter la fréquence des effets indésirables [180]. Ces résultats encourageants, en contraste avec les nombreux résultats défavorables d'autres essais cliniques, représentent une réelle avancée pour la prise en charge des patients GB.

4. Mécanismes d'échappement et de résistances : plasticité et hétérogénéité du GB au cœur des challenges thérapeutiques

Introduits dans la partie « Hétérogénéité et plasticité des GB » (II-A.4) de ce manuscrit, les concepts de plasticité et hétérogénéité dans les cellules et tumeurs de GB sont les principaux enjeux expliquant les échecs thérapeutiques actuels. En effet, la forte hétérogénéité intratumorale rend le ciblage de l'ensemble des sous-populations cellulaires du GB particulièrement difficile. D'autre part, des mécanismes adaptatifs, au-delà d'être induits par le microenvironnement tumoral, sont également stimulés par la mise en place des traitements et participent ainsi à expliquer l'échec des thérapies standard comme des thérapies ciblées [147].

Si la quasi-totalité des GB recidivent, une grande majorité d'entre eux montrent des récurrences locales, dans les quelques centimètres autour du site de la tumeur initiale, mais aussi plus rarement à distance de la tumeur initiale [274]. L'essor de la transcriptomique, notamment, participe activement à l'initiation de nombreuses études tentant d'apporter des explications et modèles quant à l'évolution du GB dans sa phase de récurrence [274–276].

Plus concrètement, de nombreux mécanismes de résistance et d'adaptation à la thérapie ont déjà été identifiés. La surrégulation de la MGMT, enzyme de réparation des dommages à l'ADN induits par la thérapie alkylante, est le plus ancien mécanisme de résistance à la chimiothérapie caractérisé dans le GB [277] et fait désormais partie des biomarqueurs analysés à visée prédictive et pronostique.

Les effets de la radiothérapie sont quant à eux médiés par l'induction de dommages à l'ADN et de dommages oxydatifs dans les cellules. Ainsi, l'impact des radiations ionisantes est sensiblement réduit dans les niches hypoxiques où le manque d'oxygène limite la formation de ROS nécessaires au processus radio-induit de mort cellulaire. D'autre part, la radiothérapie a montré des effets favorisant un enrichissement du phénotype souche plus résistant aux thérapies [278,279]. L'irradiation favorise également l'entrée d'une population cellulaire du GB dans un état de type quiescence/sénescence ainsi que la conséquente production de facteurs sécrétoires associés (facteurs de croissance, cytokines, protéases...) qui secondairement favorisent le remodelage du microenvironnement et la progression du GB [278,280].

Également, la mise en place d'interconnexions cytoplasmiques, appelées microtubes, entre les cellules de GB, et notamment dans la population de CSG, a montré la formation d'un réseau connecté impliquant la voie du TGF- β et favorisant la résistance à la radiothérapie [152,281,282].

Globalement, la mise en place des thérapies, outre l'effet bénéfique anti-cancéreux qu'elles apportent, induit également des adaptations phénotypiques, cellulaires et moléculaires dans le GB qui participent grandement à sa survie et à sa récurrence. Ces adaptations sont nombreuses (loin d'être toutes abordées ici), certainement encore largement sous-estimées, et reposent très fortement sur la grande hétérogénéité présente dans le GB ainsi que sur sa plasticité étonnante, notamment au sein de sous-populations particulières comme les CSG. L'étude et le décryptage de ces adaptations semble donc être une étape clé vers l'identification des vulnérabilités du GB et l'amélioration de l'efficacité des thérapies.

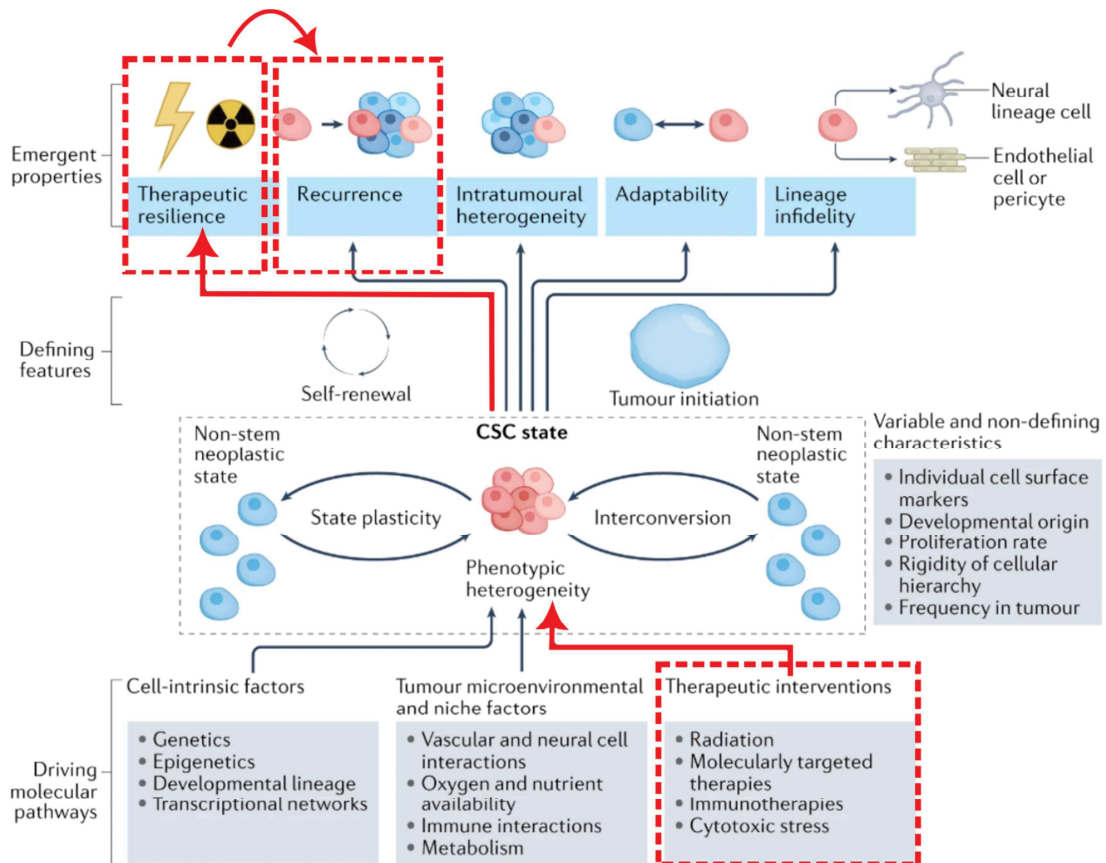


Figure 15 : Plasticité cellulaire dans le glioblastome, extrait et adapté de Gimble et al., 2022 [147].

Les CSG (CSC pour Cancer Stem Cell) représentent un état cellulaire mouvant, défini au niveau fonctionnel par des capacités d'auto-renouvellement et d'initiation de tumeur, mais également caractérisé par une importante hétérogénéité et plasticité, à l'interface entre état différencié et non-différencié. Différents facteurs influencent cette plasticité, et l'ensemble des différents états cellulaires des CSG participent aux propriétés d'adaptation diverses du GB. En rouge est notamment mise en lumière l'influence réciproque de la thérapie dans ces mécanismes de plasticité.

III- CANCER & METABOLISME

Au vu de la complexité du système colonisé par le GB, du GB lui-même, et de la faible efficacité des traitements antinéoplasiques « standards », l'approche ciblée reste pour l'instant la plus souhaitable dans le traitement du GB. Pour cela, une meilleure connaissance des mécanismes sous-jacents au développement et à la rechute des GB apparaît indispensable, et intéresse de plus en plus la communauté scientifique et clinique. « Comprendre la tumeur pour mieux la traiter » semble aujourd'hui être la ligne directrice des recherches sur le GB, et celle qui anime également nos travaux présentés dans ce manuscrit.

Pour comprendre le fonctionnement de cette cellule cancéreuse, il faut nécessairement s'intéresser à son métabolisme. En effet, comme toute chose vivante, la cellule cancéreuse incorpore un ensemble de nutriments et molécules pour alimenter et entretenir son fonctionnement. Elle subit cependant différentes contraintes, notamment la nécessité d'un rendement extrême, afin de soutenir une prolifération intense et une forte mobilité. Pour parvenir à ses fins, et c'est certainement la base de « l'intelligence du cancer », la cellule cancéreuse détourne à son avantage de nombreuses voies de fonctionnement physiologique : elle est capable d'initier une néoangiogenèse pour puiser ses ressources dans la circulation sanguine, de déréguler de nombreuses voies de signalisation pour favoriser leur rendement, et de s'alimenter de différentes sources carbonées en fonction de son besoin immédiat. Sur la base de nombreuses études décrivant ces dérégulations et leur implication dans le soutien de l'initiation, de la progression et de la récurrence du cancer, la reprogrammation métabolique est ainsi devenue l'un des *hallmarks* du cancer [94].

Le GB ne fait pas exception et montre une organisation et une plasticité étonnante, également sur le plan métabolique. Les conséquences de ces dérégulations métaboliques sont d'autant plus importantes et sensibles qu'elles prennent place dans ce milieu cérébral fermé, où l'approvisionnement est finement organisé par l'UNV et régulé par la BHE, et au sein duquel les cellules résidentes sont très dépendantes de cet afflux énergétique.

A. Métabolisme énergétique cérébral

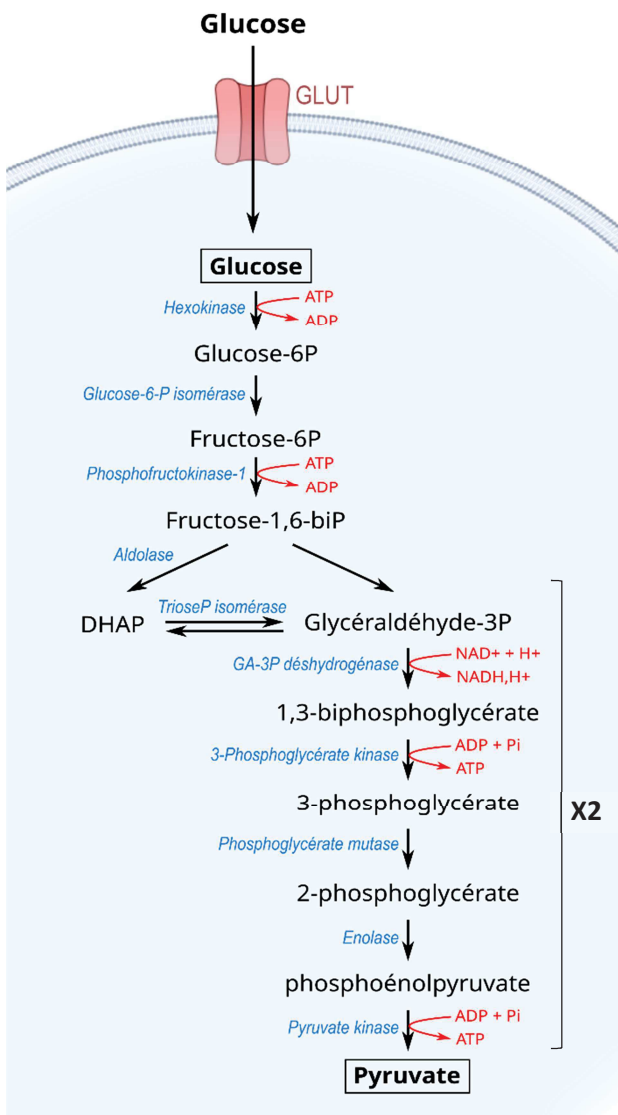
1. Généralités

Le terme « métabolisme » désigne l'ensemble des réactions chimiques, anaboliques ou cataboliques, qui se déroulent au sein d'un organisme vivant. Plus précisément, le catabolisme comprend l'ensemble des réactions visant à produire de l'énergie par la dégradation de métabolites à potentiel énergétique (réactions exergoniques), tandis que l'anabolisme rassemble les réactions non spontanées qui à l'inverse nécessitent de l'énergie (réactions

endergoniques), comme par exemple les processus de synthèse, assemblage ou stockage moléculaire. Chaque être vivant survit donc grâce à un équilibre complexe entre anabolisme et catabolisme, et un arrêt de la production énergétique entraîne nécessairement un arrêt du fonctionnement cellulaire, et donc la mort de l'organisme ou son entrée en quiescence [283].

Les cellules humaines utilisent quotidiennement de nombreuses voies métaboliques mais les deux principales voies de synthèse énergétique sont la glycolyse et le système mitochondrial des oxydations phosphorylantes. Au-delà de la simple production d'énergie, modélisée par la production d'ATP (adénosine triphosphate), ces voies permettent également la production d'intermédiaires de synthèse, nécessaires à la production de biomasse donc indispensables pour la multiplication cellulaire.

1.1. La glycolyse



La glycolyse est la voie principale de dégradation du glucose, principal substrat carboné alimentant nos cellules (Fig. 16) [284,285]. Ce glucose est incorporé dans les cellules par l'intermédiaire des transporteurs membranaires GLUT [286]. Une fois dans le cytoplasme, une série de réactions enzymatiques transforme le glucose en pyruvate. Certaines étapes clés de la glycolyse génèrent la formation de liaisons à haut potentiel énergétique pouvant être par la suite déplacées sur une molécule d'ADP (adénosine diphosphate) pour créer une molécule d'ATP, molécule énergétique par excellence. Une autre étape importante de la glycolyse est catalysée par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GA-3P déshydrogénase) et s'accompagne de la réduction d'un cofacteur, le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide), participant ainsi à la balance redox intracellulaire.

Figure 16 : Représentation schématique de la glycolyse.

En bleu : enzymes glycolytiques. En noir : intermédiaires réactionnels. En rouge : étapes utilisant ou produisant de l'ATP, ou couplées à la réduction de cofacteurs. P = phosphate ; Pi = Phosphate inorganique ; DHAP = dihydroxyacétone phosphate.

Cette voie métabolique présente en théorie un faible rendement énergétique : au total, deux molécules d'ATP sont produites par molécule de glucose. Pourtant, la glycolyse est la voie de production énergétique favorisée dans les cellules en prolifération. En effet, si le nombre de molécules d'ATP produites est relativement faible, la glycolyse présente d'autres points forts : elle est indépendante du niveau d'oxygène, sa stimulation permet une vitesse de dégradation du glucose, donc de production d'énergie, très rapide et elle génère également plusieurs intermédiaires nécessaires à la production rapide de biomasse (environ 10% du flux glycolytique, très variable en fonction des besoins cellulaires).

La multiplication cellulaire nécessite en effet la réplication de l'ensemble des compartiments subcellulaires, et donc notamment la synthèse de nouveaux acides nucléiques, protéines et lipides. Différentes voies métaboliques subsidiaires dérivent d'intermédiaires de la glycolyse et sont orientées dans ce sens. La voie des pentoses phosphates (PPP) prend source au niveau du glucose-6-phosphate et participe à la synthèse de nucléotides de l'ADN/ARN ainsi qu'à l'équilibre redox cellulaire [287]. La voie de biosynthèse des hexosamines, dérivant du fructose-6-phosphate, est nécessaire aux processus de glycosylations des protéines, notamment des récepteurs aux facteurs de croissance impliqués dans la signalisation pro-prolifération [288]. Le 3-phosphoglycérate est un précurseur de synthèse de la sérine et de la glycine, acides aminés importants pour la biosynthèse de différentes protéines mais surtout du glutathion, principal antioxydant cellulaire, ainsi que des bases puriques de l'ADN [289]. Quant au glyceraldéhyde-3-phosphate, il peut également être intégré dans la production de lipides.

A noter, pour son fonctionnement, la glycolyse requiert la présence de molécules d'ATP, indispensables à la première partie de la voie métabolique glycolytique, ainsi que de NAD⁺ oxydé, et dépend donc de l'état redox et énergétique préalable de la cellule [290,291].

1.2. La mitochondrie et le système des oxydations phosphorylantes

La glycolyse et ses voies métaboliques annexes ne sont cependant pas suffisantes pour subvenir aux demandes métaboliques des cellules. Le métabolisme mitochondrial vient alors compléter ces besoins, principalement via une production énergétique soutenue [284,292,293].

Le pyruvate cytosolique peut être intégré dans la mitochondrie par des transporteurs spécifiques (MPC : *Mitochondrial Pyruvate Carrier*), où il est pris en charge par le complexe de la pyruvate déshydrogénase et décarboxylé en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA). L'acétyl-CoA entre ensuite dans le cycle de Krebs, aussi appelé cycle du citrate ou TCA (*tricarboxylic acid cycle*), où il est couplé à l'oxaloacétate pour former du citrate. Le cycle de Krebs rassemble une succession de réactions chimiques en cycle fermé induisant la formation d'intermédiaires utiles

à divers métabolismes parallèles, mais surtout permettant la réduction de cofacteurs NAD et FAD (en NADH/H⁺ et FADH₂).

Ces cofacteurs réduits vont par la suite alimenter les complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale, ou système des oxydations phosphorylantes (OxPhos), placés sur la membrane interne mitochondriale (MIM). Ces complexes vont alors régénérer la forme oxydée NAD⁺ et FAD, en libérant électrons et ions H⁺ [291]. Les électrons sont transmis au coenzyme Q qui joue le rôle de transporteur vers le complexe III. Les protons, sont quant à eux libérés dans l'espace intermembranaire mitochondrial, générant ainsi une différence de potentiel entre la face interne et externe de la MIM. Les électrons du complexe III, qui alimente au passage le gradient de protons, sont pris en charge par le cytochrome c jusqu'au complexe IV où ils sont finalement donnés à l'accepteur final d'électrons : l'oxygène. En conditions oxygénées, des molécules d'O₂ sont ainsi consommées pour former de l'eau, la mitochondrie respire. Pour finir, le gradient de protons alimenté par les différents complexes permet de créer une force électrochimique assez intense pour faire fonctionner l'ATP synthase (ou complexe V) dont l'activité va produire une molécule d'ATP [293].

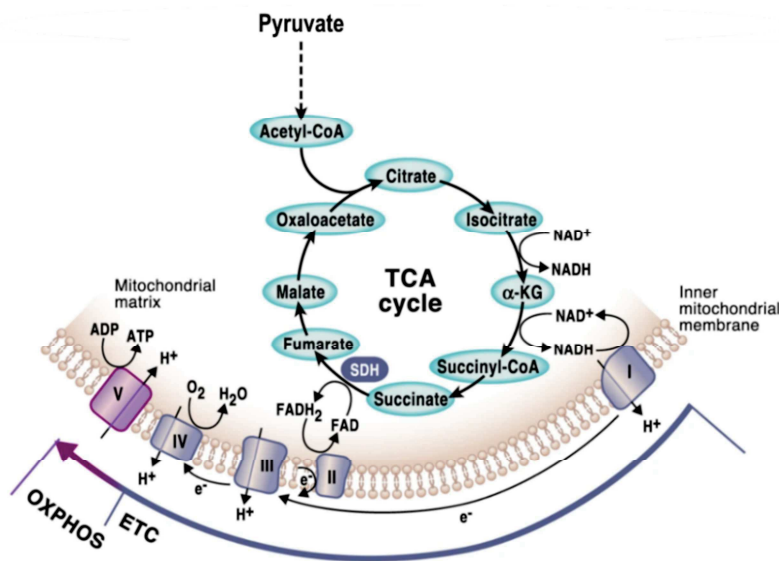


Figure 17 : Le devenir mitochondrial du pyruvate, Cycle de Krebs et oxydations phosphorylantes, extrait de [294].

Représentation schématique de la voie d'oxydation du pyruvate dans la mitochondrie. L'intégration dans le cycle de Krebs (TCA cycle) permet de réduire des coenzymes NAD et FAD, ensuite régénérés par la chaîne respiratoire mitochondriale (complexes I à V), localisée sur la membrane interne mitochondriale et couplée à un système phosphorylant produisant l'ATP. ETC : Electron transport chain ; OXPHOS : oxidative phosphorylation ; α-KG : α-cétoglutarate.

Au total, la décarboxylation d'une molécule de pyruvate et son intégration dans un cycle du TCA produit 4 NADH/H⁺, 1 FADH₂ et un équivalent ATP. Par la suite, la régénération des cofacteurs NADH/H⁺ et FADH₂ par les complexes respiratoires permet la production respective de 3 et 2 molécules d'ATP. Ainsi, l'oxydation complète d'une molécule de glucose par le système des OxPhos mitochondrial produit 32 molécules d'ATP, soit plus de 15 fois le rendement de la glycolyse seule.

1.3. La fermentation lactique

Lorsque les niveaux d'oxygène diminuent, la mitochondrie n'est plus capable d'assurer la respiration cellulaire. Dans ce cas, le pyruvate est directement pris en charge dans le cytosol par les lactate déshydrogénases (LDHs) qui permettent la synthèse de lactate et la réoxydation d'une molécule de NADH/H⁺ en NAD⁺ (Fig. 18). Cette réaction, de rendement énergétique moins important que la voie des OxPhos, est par ailleurs très rapide et permet de « découpler » les voies glycolytiques et oxydatives pour maintenir un flux glycolytique (dépendant de la régénération du NAD⁺). En effet, la réoxydation des coenzymes NAD/FAD dans la mitochondrie est relativement lente donc, pour assurer un flux de glycolyse soutenu, cette oxydation doit nécessairement être assurée par les LDHs [284,290].

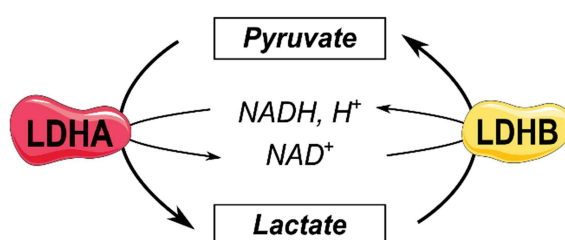


Figure 18 : Fermentation lactique assurée par les LDH dans le cytosol.

2. Organisation métabolique cérébrale

2.1. Organisation métabolique et activité cérébrale

Le glucose est le principal substrat énergétique dans le cerveau. Il est capté depuis la circulation sanguine et intégré dans les cellules par des transporteurs GLUT, où son oxydation complète apporte l'énergie nécessaire au fonctionnement des cellules cérébrales.

Sur le plan métabolique, le cerveau est un organe tout à fait singulier. Il coordonne la majorité des fonctions de l'organisme et la neurotransmission associée, plus précisément l'activité synaptique, est relativement énergivore. Malgré sa forte consommation énergétique, le cerveau ne contient que très peu de réserves d'énergie et le fonctionnement nerveux dépend donc d'un couplage très fin avec l'approvisionnement en substrats énergétiques depuis la circulation sanguine.

Pour soutenir cette organisation, chaque type cellulaire cérébral présente un fonctionnement métabolique particulier, responsable de l'intégration, la production et l'excrétion de métabolites différents en fonction des types cellulaires et orientant ainsi les échanges de molécules et substrats énergétiques entre cellules qui assurent secondairement leur fonctionnement.

Cette coopération métabolique intercellulaire est notamment imagée par le couple astrocyte/neurone dont le métabolisme intracellulaire très spécialisé favorise des échanges métaboliques spécifiques [295]. En effet, les astrocytes sont principalement glycolytiques : ils tolèrent parfaitement l'inhibition du métabolisme oxydatif *in vitro* et *in vivo* [296], qu'ils compensent par une up-régulation de la glycolyse [297]. A l'inverse des astrocytes, les neurones ne sont pas capables de contrebalancer une inhibition des OxPhos, expérimentée *in vitro* via l'action différents bloqueurs de la chaîne respiratoire mitochondriale [296,297]. Ces derniers provoquent une chute énergétique et de potentiel de membrane mitochondrial qui secondairement déclenche la mort des neurones par apoptose [296,297]. Ces résultats, confirmés *in vivo*, valident la mutuelle spécialisation métabolique des astrocytes et neurones, respectivement vers un métabolisme glycolytique ou tourné vers le système des OxPhos, et prouvent la complémentarité métabolique de ces deux populations cérébrales.

En lien direct avec leur métabolisme, on observe un transfert de lactate des astrocytes vers les neurones, également appelé navette lactate astrocyte-neurone ou ANLS (*Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle*) [29]. En effet, au vu de leur importante activité glycolytique, les astrocytes sécrètent du lactate en continu, en conditions basales ou lorsqu'ils sont activés [29,298]. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer la stimulation de la production et l'excrétion de lactate par les astrocytes. L'influx de glutamate dans les astrocytes lors d'une activation synaptique stimule l'entrée de glucose et son oxydation totale en lactate *via* la glycolyse, par le biais d'un couplage avec des transports d'ions Na⁺ et K⁺ [29]. D'autre part, le NO (oxide nitrique) et les ions NH₄⁺ libérés par les neurones lors de transmissions glutamatergiques sont également des médiateurs métaboliques. Le NO peut entrer en compétition avec l'oxygène et inhiber le complexe IV du système des OxPhos astrocytaire [296,297] ; tandis que les ions NH₄⁺ inhibent l'incorporation mitochondriale du pyruvate dans les astrocytes [299], promouvant ainsi la voie glycolytique et la conséquence production de lactate.

Ce lactate est ensuite capté par les neurones, où il est rétroconverti en pyruvate par les LDHs et directement oxydé dans la mitochondrie par la voie des OxPhos, assurant aux neurones la production d'énergie qui leur est nécessaire [29,30]. Les neurones favorisent en effet les voies oxydatives au détriment de la glycolyse et préfèrent ainsi le lactate au glucose comme source carbonée [30,300]. Ce métabolisme neuronal oxydatif est notamment orienté par l'absence de l'enzyme PFKFB3 (6-phosphofructose-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3) dans les neurones, constamment dégradée par le protéasome. En effet, cet enzyme est normalement responsable de la production de fructose-2,6-bP, lui-même un puissant activateur allostérique d'une enzyme de la glycolyse, la PFK1. La dégradation de PFKFB3 et donc l'absence de fructose-2,6-bP dans les neurones, contrairement à ce qui est observé dans les astrocytes, a pour conséquence une diminution du flux glycolytique [297,301].

En conclusion, le SNC présente une organisation métabolique unique (Fig. 19). Même si les astrocytes et les neurones sont tous deux capables d'oxyder entièrement le glucose, un couplage métabolique est mis en place entre les deux populations cellulaires : les neurones puisent leur substrat énergétique, le lactate, de l'activité glycolytique des astrocytes [29,30]. Cette organisation métabolique est appuyée par l'organisation physique des populations cellulaires. Les astrocytes vont en effet recouvrir les vaisseaux sanguins de leurs pieds astrocytaires pour capter le glucose sanguin [28], et entourent d'autre part les synapses neuronales, captant ainsi le glutamate synaptique pour stimuler leur métabolisme [29].

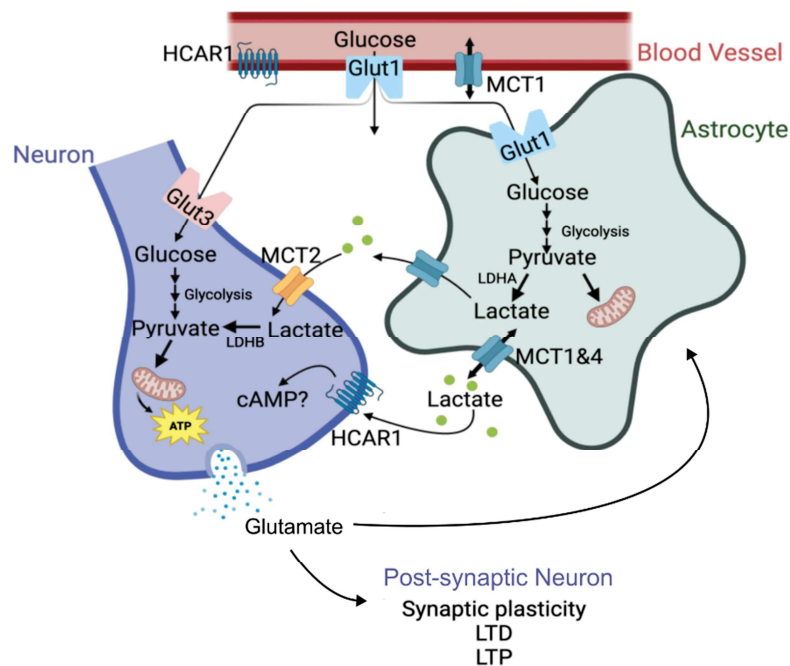


Figure 19 : Concept d'Astrocyte-Neuron Lactate shuttle, décrit initialement par Pellerin et Magistretti [29] (schéma extrait et adapté de [302]).

Le glucose est intégré dans les astrocytes via le transporteur GLUT1 et métabolisé par la glycolyse jusqu'au lactate. Ce lactate est ensuite transféré aux neurones qui l'intègrent, via les transporteurs MCT2, pour alimenter leur métabolisme oxydatif et leur production énergétique, assurant par la suite la fonction synaptique par libération de glutamate dans la fente synaptique. GLUT : Transporteurs du glucose ; MCT : Transporteurs du lactate ; LDH : Lactate déshydrogénases ; HCARA : Hydroxycarboxylic acid receptor, Récepteur du lactate ; LPT/LTD : Potentialisation/Dépression à long terme.

2.2. Focus sur le rôle du lactate

Auparavant considéré comme un déchet métabolique de la glycolyse, le lactate est désormais reconnu comme un substrat énergétique à part entière. Dans le cerveau, il est donc le substrat privilégié des neurones (surpassant même le glucose) [300], soutenant l'activité neuronale mais agissant également comme molécule de signalisation essentielle dans le processus de plasticité synaptique et de mémoire [303].

Le lactate est produit à partir du pyruvate par les LDHs dans le cytosol. Les LDHs sont formés à partir de 2 sous-unités (LDH M « muscle » et H « heart ») qui s'assemblent en homo- ou

hétérotétramères pour former différents 5 isotypes, LDH1 à 5. Tous les homo- ou hétérotétramères catalysent l'interconversion du pyruvate en lactate ou inversement. Cependant, en fonction de la sous-unité majoritaire, le complexe LDH final va présenter des caractéristiques cinétiques différentes, impactant leur affinité préférentielle pour le lactate ou le pyruvate et donc le sens réactionnel. La sous-unité H est codée par le gène *LDHA* et catalyse préférentiellement la production de lactate tandis que la sous-unité M est codée par le gène *LDHB* et tend plutôt à rétroconvertir ce lactate en pyruvate [304]. Cependant, l'orientation de cette réaction est également soumise à une régulation par le substrat/produit, c'est-à-dire qu'elle sera orientée par la concentration de pyruvate ou lactate dans la cellule, ainsi qu'à une régulation redox puisqu'elle est conditionnée par l'état oxydé ou réduit du coenzyme NAD, cofacteur de l'interconversion pyruvate/lactate. Des approches immunohistochimiques ont permis de montrer que l'expression des LDH dans le cerveau est corrélée à la signature métabolique des différents types cellulaires cérébraux : LDHA est préférentiellement exprimée dans les astrocytes tandis que LDHB est présent dans les neurones [304,305].

Une fois produit, le lactate peut être exporté/importé par l'intermédiaire de transporteurs transmembranaires : les transporteurs des monocarboxylates (MCTs). Quatre membres de la famille des MCTs (MCT1 à 4) cotransportent des protons et des monocarboxylates tels que le lactate, le pyruvate ou les corps cétoniques [306]. Les MCTs sont des transporteurs bi-directionnels, et leur sens de fonctionnement est donc déterminé par la concentration intra- et extracellulaire de lactate et d'ions H⁺. Cependant, ils ne présentent pas tous la même affinité pour le lactate. Ainsi, MCT4, ayant la plus faible affinité pour le lactate et un turnover important, est plus adapté à l'export du lactate [307]. MCT1 et MCT2, respectivement d'affinité intermédiaire et forte, sont quant à eux adaptés pour l'import de lactate [306,308].

Dans le cerveau, MCT3 est très peu exprimé et uniquement dans les plexus choroïdes, tandis que MCT1, 2 et 4 sont largement représentés [308]. MCT1 et MCT4 sont en charge de l'export de lactate des astrocytes : MCT1 en conditions basales et MCT4 en « renfort » lorsque la concentration de lactate est augmentée, par exemple en conditions hypoxiques [309]. MCT2 est quant à lui exprimé à la membrane des neurones et responsable de l'import du substrat favori de ces derniers.

Cette expression différentielle des transporteurs MCT, corrélée à la répartition des isoformes LDH, participe activement à l'établissement de la navette lactate en astrocytes et neurones [30,310].

Par ses échanges métaboliques entre astrocytes et neurones, le lactate joue un rôle décisif dans la survie et la fonctionnalité/excitabilité neuronale, mais également dans des processus plus avancés tels que la mémoire. En effet, l'inhibition de la glycolyse astrocytaire (glucose, et donc lactate stockés sous forme de glycogène dans les astrocytes) ou

encore le blocage direct des MCTs dans le cerveau entraîne une disruption de la potentialisation à long terme (LTP), mécanisme neuronal sous-jacent à la mémoire, et donc une amnésie chez le rat [311,312]. De manière intéressante, un ajout de lactate (mais pas de glucose) permet de restaurer la mémoire et la plasticité synaptique dans ce modèle [311].

Au-delà de son importance métabolique, le lactate joue également un rôle dans la signalisation cellulaire ou encore la régulation épigénétique. En effet, le lactate peut également se fixer au récepteur transmembranaire GPR81 (*G-protein-coupled receptor 81*) ou HCAR1 (*hydroxycarboxylic acid receptor 1*) [313], récepteur couplé à une protéine Gi inhibitrice, et induire un rétrocontrôle négatif sur l'activité neuronale par le biais d'une cascade de signalisation impliquant l'adénylate cyclase et l'AMP cyclique [314]. D'autre part, une régulation épigénétique récemment découverte est également induite par le lactate. Ce dernier est à l'origine de mécanismes de lactylation des histones, c'est-à-dire d'ajout d'un groupe lactyl sur un résidu lysine des histones, permettant une stimulation directe de la transcription génique de la chromatine [315]. Des dérégulations de ces processus physiologiques sont notamment à l'étude dans plusieurs pathologies, y compris le cancer.

2.3. Equilibre redox

L'organisation métabolique cérébrale est également essentielle pour la régulation redox du cerveau. La dépendance à l'oxygène du système nerveux, responsable d'environ 20% de la consommation totale d'O₂ du corps, le rend particulièrement sujet à des stress oxydants. En conditions physiologiques, une balance redox est assurée par des systèmes cellulaires antioxydants pour éviter tout dommage entraînant à terme une neurodégénération [316].

Les neurones sont particulièrement sensibles au stress oxydant. En effet, la neurotransmission est non seulement associée à un fort impact énergétique, mais également à une production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) [296,317], et les neurones sont paradoxalement peu équipés en systèmes antioxydants. Cette faible défense antioxydante des neurones s'explique notamment par la répression du facteur NRF2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor-2*), un régulateur central des systèmes antioxydants cellulaires [318,319].

Pour éviter tout dommage lié aux ROS, les neurones adaptent alors leur métabolisme. En effet, en régulant à la baisse la voie de la glycolyse, les neurones favorisent l'approvisionnement de la voie PPP en glucose-6-phosphate. Cette voie PPP permet la régénération du cofacteur NADPH/H⁺, essentiel à la réduction d'un antioxydant central, le glutathion (GSSG) en sa forme active (GSH) [320]. Cette régénération antioxydante est essentielle pour les neurones, qui ne sont que faiblement équipés en enzymes permettant la synthèse *de novo* de GSH [319]. Ainsi, pour maintenir un état redox correct et survivre à tout stress oxydant, les neurones sont finalement forcés de réduire leur flux glycolytique au profit des PPP.

Les astrocytes, au contraire, sont bien mieux organisés que les neurones pour lutter contre les dommages oxydatifs : ils expriment de façon stable le facteur NRF2 qui leur assure la transcription et la mise en place d'une machinerie antioxydante fonctionnelle et efficace. Notamment, NRF2 active la synthèse *de novo* du glutathion dans les astrocytes et ces derniers sont capables de libérer des précurseurs de synthèse. Grâce au lien étroit entre astrocytes et neurones, ces précurseurs sont alors incorporés par les neurones pour permettre en parallèle une synthèse neuronale de glutathion et aider à la protection antioxydante [321]. Cet échange est d'autant plus stimulé par la neurotransmission glutamatergique, qui induit indirectement la phosphorylation et l'activation de NRF2 dans les astrocytes [319,322].

Ainsi, les échanges astrocytes/neurones permettent non seulement d'assurer un métabolisme énergétique efficace pour soutenir leurs fonctionnements respectifs mais également de parer aux éventuelles conséquences redox de l'activation métabolique soutenue de ces cellules.

B. Métabolisme et cancer : état des lieux dans le GB

Reconnue depuis plus de 10 ans comme l'une des caractéristiques du cancer [94], la dérégulation métabolique est activement impliquée dans le soutien des paramètres de progression du cancer. A l'image de sa plasticité, le GB affiche différentes adaptations dynamiques contribuant à enrichir un peu plus l'hétérogénéité de la tumeur. Notamment, des changements au niveau de la machinerie bioénergétique cellulaire, différenciellement régulés en fonction de la sous-population du GB, de ses besoins et fonctions ainsi que de son microenvironnement, participent à soutenir l'intense prolifération cellulaire du GB.

Dans les cellules saines, l'homéostasie bioénergétique, et notamment du glucose, est régulée par la mise en place d'un équilibre subtil entre réactions cataboliques et anaboliques. La majorité de la production d'énergie est assurée par les voies oxydatives du métabolisme du glucose, c'est-à-dire via le cycle de Krebs et le système des oxydations phosphorylantes mitochondrial. Dans le GB, comme dans la majorité des cancers, les cellules cancéreuses sont capables reprogrammer leur métabolisme énergétique vers la glycolyse même en présence d'oxygène, et ce au désavantage des voies oxydatives mitochondriales normalement favorisées en conditions oxygénées [323]. Cette dérégulation énergétique, largement connue sous le nom de glycolyse aérobie ou effet Warburg, paraît en théorie contre-intuitive puisque les OxPhos permettent un rendement en ATP bien meilleur que la glycolyse, mais s'explique notamment d'un point de vue prolifératif. En effet, outre la production d'énergie pour la cellule, la surrégulation de la voie glycolytique permet au GB de générer des intermédiaires de synthèse alimentant différentes voies de biosynthèse et favorisant ainsi la production de biomasse [324].

Cette stimulation glycolytique a été associée avec différentes dérégulations moléculaires observées dans le GB. Notamment, l'activation d'oncogènes comme par exemple *AKT*, induit par la perte de *PTEN* ou l'activation de la voie *RTK/PI3K* dont les altérations cumulées sont présentes dans plus de 80% des GB, augmente l'expression d'un transporteur du glucose *GLUT4* et active l'hexokinase-2, favorisant ainsi la voie glycolytique [325]. Également, l'activation de *RAS* ou *MYC* ou la mutation de gènes suppresseurs de tumeurs comme *TP53* stimulent la glycolyse et la production de lactate, certains d'ailleurs par l'intermédiaire d'une surrégulation de *LDHA* et *PDHK1* [326–328]. Cependant, si ces altérations génétiques sont bien liées à des altérations métaboliques, toutes les cellules cancéreuses qui présentent le même type de mutations ne montrent pas forcément le même phénotype métabolique. Ceci suggère alors de considérer l'altération métabolique dans le cancer, mais également dans le GB, plutôt parmi les causes et non comme l'une des conséquences de la tumorigenèse [329].

Le métabolisme des cellules de GB, du fait de sa rapide croissance et par l'établissement de niches intratumorales caractéristiques, est également fortement régulé par l'hypoxie [139,140]. En effet, cette difficulté d'accès à l'oxygène stimule la glycolyse notamment par le biais de l'activation du facteur HIF1 α , régulant positivement plusieurs acteurs glycolytiques (GLUT, différents enzymes de la glycolyse, LDHA, MCT4...) [141,330] et stimulant de surcroît le phénotype prolifératif.

En fonction des conditions d'oxygénation, d'autres modulations métaboliques ont été mises en évidence dans le GB. En effet, la voie des PPP, impliquée dans la synthèse des acides nucléiques, est très active dans les cellules à prolifération rapide, et inhibée en condition hypoxiques au profit de la glycolyse [331]. Dans les zones oxygénées du GB, la mutation suractivatrice de la TERT, retrouvée dans 80% des GB, est associée avec une augmentation de la phospho-activation de différents enzymes des PPP [332]. En hypoxie, cette voie des PPP est donc relayée par la glycolyse, qui alimente parallèlement la voie de biosynthèse des lipides ou bien de la sérine à l'origine de la synthèse des bases puriques de l'ADN.

Si la surrégulation glycolytique, du fait de l'effet Warburg et de l'hypoxie, est largement acceptée dans le GB, de plus en plus de preuves suggèrent finalement une cohabitation avec d'autres phénotypes métaboliques, notamment une utilisation mitochondriale du glucose [333–335]. Récemment, Garofano et ses collègues, dans une large analyse transcriptomique, ont effectivement mis en évidence de nouveaux sous-groupes cellulaires dans le GB basés sur leurs caractéristiques métaboliques, et identifient à la fois une signature « glycolytique/plurimétabolique » mais aussi une signature mitochondriale [123]. L'existence d'une sous-population oxydative du GB, est également confirmée par des modèles d'infusion de [¹³C]glucose chez la souris comme chez le patient, montrant à la fois une production de lactate mais aussi une métabolisation mitochondriale de ce glucose marqué [333,336].

Si Garofano associe le phénotype mitochondrial à un meilleur pronostic [123], d'autres associent à cette population oxydative des capacités d'invasion stimulées et une chimiorésistance au TMZ [337,338]. En effet, l'étude de cellules de GB à forte motilité a notamment montré un contenu mitochondrial plus important associé à une plus forte production de ROS intracellulaires et une conséquente protection antioxydante stimulée [338].

De plus, dans les travaux de Hoang-Minh *et al.*, cette population oxydative présente des niveaux plus élevés de produits et acteurs du métabolisme des lipides, un parallèle retrouvé avec les tumeurs récurrentes de GB [337]. Ces résultats font notamment écho avec la relative dépendance des GB au cholestérol excrété par les astrocytes réactifs qui les entourent [162].

De manière intéressante, la metformine, un anti-diabétique également utilisé pour ses propriétés inhibitrices du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, a entraîné une

réduction de la viabilité cellulaire, de la prolifération mais également de la migration et de la transition épithélio-mésenchymateuse dans certaines lignées cellulaires de GB [339,340]. Du fait de ces résultats prometteurs, son efficacité est actuellement testée en clinique dans un essai de phase II, en combinaison avec les thérapies standards [341].

Au-delà du glucose, d'autres métabolites participent également au métabolisme des cellules de GB. Les acides aminés comme la glutamine peuvent notamment approvisionner le cycle de Krebs mitochondrial, et montrent un rôle essentiel dans la survie et la prolifération des cellules cancéreuses. Une addiction des cellules GB à la glutamine a d'ailleurs été proposée [329]. A son entrée dans la cellule, la glutamine est directement convertie en glutamate qui peut secondairement alimenter à la fois la voie de biosynthèse des lipides, le cycle de Krebs ou générer du glutathion, un antioxydant majeur pour la cellule [342]. De manière intéressante, cette addiction à la glutamine n'est pas valable pour toutes les cellules du GB puisque que certaines, exprimant la glutamine synthetase, sont capables de produire elles-même la glutamine à partir de glutamate capté dans le microenvironnement ou synthétisé via le métabolisme du glucose [329,343]. Cette glutamine nouvellement produite peut ensuite alimenter la voie de biosynthèse *de novo* des nucléotides et donc soutenir la prolifération [343]. Dans le GB, la faible expression de la glutamine synthetase a en effet été associée à un meilleur pronostic [344].

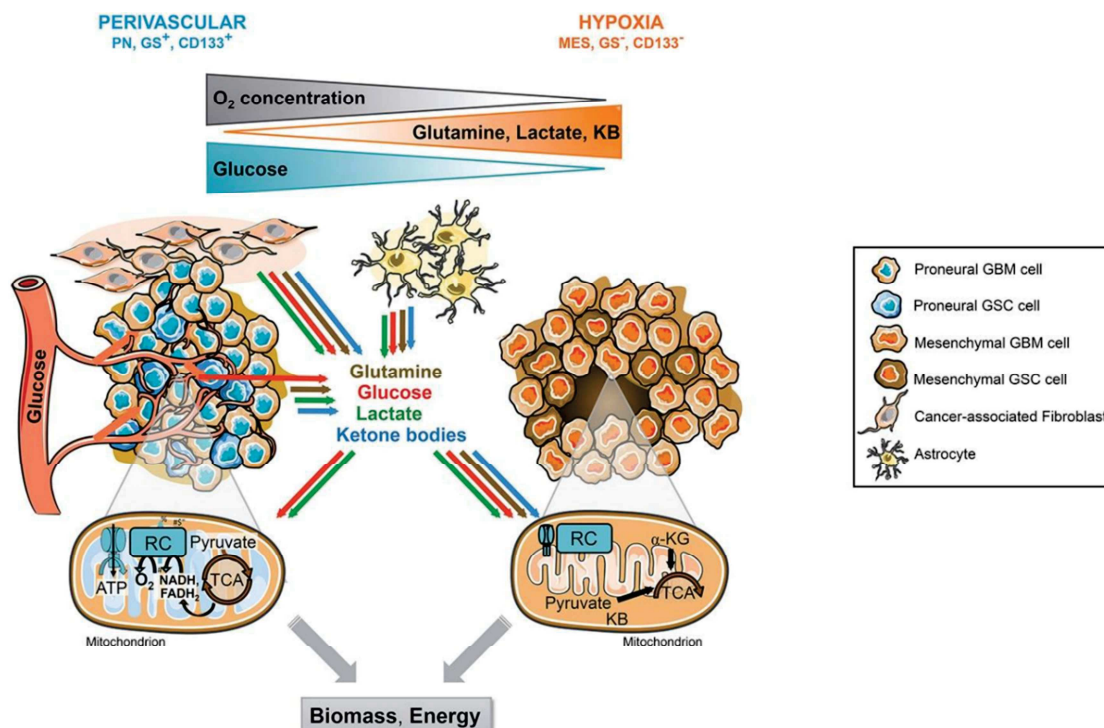


Figure 20 : Dérégulations métaboliques dans le GB conditionnées par la signature moléculaire et le microenvironnement.
 Extrait de [329] : Différentes populations cohabitent dans le GB et montrent un phénotype métabolique différent, dicté par une altération moléculaire ou par les restrictions du microenvironnement, comme l'hypoxie.

Ainsi, la plasticité du GB s'illustre aussi au niveau métabolique (*Fig. 20*). Se distinguent dans la tumeur une population de cellules à prolifération rapide utilisant préférentiellement la glycolyse et une autre population cellulaire cyclant plus lentement qui semble préférer la phosphorylation oxydative mitochondriale [337]. Dans les deux cas, le pyruvate et donc le lactate, sont essentiels puisqu'ils se placent au carrefour entre les principales voies bioénergétiques de la cellule.

La promotion du métabolisme glycolytique aboutit à la production massive de lactate à partir de ce pyruvate par le biais des LDHs, et ce lactate est ensuite co-excrété avec des protons via les transporteurs MCT1/4. Ceci entraîne une acidification secondaire du microenvironnement tumoral du GB, promouvant croissance et invasion des GB et participe à l'établissement d'un environnement immunosuppresseur [345–347]. Finalement, le lactate, autrefois considéré comme un simple déchet métabolique de la glycolyse, joue un rôle central dans le métabolisme des GB.

OBJECTIFS DES TRAVAUX :

Actuellement au centre de nombreuses recherches, l'étude des mécanismes métaboliques mis en jeu dans le GB qui semblent soutenir, et même promouvoir, la progression du GB est centrale pour la prise en charge thérapeutique des patients. En effet, différents phénotypes métaboliques semblent corrélés à des fonctions et caractéristiques spécifiques du GB. Ainsi, un ciblage métabolique pourrait représenter une piste prometteuse pour la disruption thérapeutique de la progression du GB.

Cependant, le métabolisme tumoral est un processus complexe et dynamique. Différents microenvironnements et sous-populations tumorales cohabitent et participent à la diversité métabolique des tumeurs de GB. Celles-ci évoluent de plus avec le temps et les changements d'environnements (comme par exemple après la mise en place du protocole thérapeutique), soulignant encore la complexité et la flexibilité du GB.

Dans ce contexte, ces travaux se sont intéressés à la plasticité imprégnant les régulations métaboliques, et leurs conséquences sur la progression du GB. En effet, la meilleure compréhension de ces adaptations métaboliques semble essentielle pour garantir l'efficacité d'un futur ciblage thérapeutique.

Nous nous sommes plus précisément attachés à étudier le rôle du métabolisme du lactate dans la progression du GB. Métabolite central dans le fonctionnement physiopathologique du cerveau, il semble également fortement impliqué dans les processus métaboliques soutenant le GB puisqu'il se place à l'interface entre des sous-populations arborant des profils métaboliques distincts.

Une première partie étudie l'impact du métabolisme du lactate dans la mise en place et le développement du GB, puis une seconde aborde la thématique des récurrences du GB. Plus précisément, cette deuxième partie cherche à décrypter le rôle du lactate dans la repousse du GB après résection tumorale.

MODÈLES & MÉTHODES EXPÉRIMENTAUX

I. MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

A. Modèles *in vitro*

1. Lignées cellulaires dérivées de patients

Plusieurs lignées de glioblastomes issues de patients ont été utilisées pour nos travaux. L'établissement d'une collaboration avec les neurochirurgiens du Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux (Dr. Olivier Mollier et Dr. Julien Engelhardt, Hôpital Pellegrin) a permis l'obtention de biopsies tumorales fraîches régulières et le début de la mise en place d'une banque d'échantillons cellulaires.

Grâce à l'utilisation d'un protocole et d'un milieu de culture particulier, enrichi en facteurs de croissance, nous avons choisi d'extraire et de travailler sur une population de cellules type souche, identifiées comme responsables des rechutes et résistances thérapeutiques chez le patient, et permettant une croissance tumorale *in vivo* récapitulant mieux le phénotype tumoral retrouvé chez le patient. La majorité des travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés sur une lignée type souche dérivée de patient appelée P3, présentée en détail dans cette partie.

1.1. Extraction à partir de biopsie fraîche et établissement de lignées cellulaires

Protocole extrait et optimisé depuis Guyon et al., Neuromethods, 2021 [348].

L'exérèse de la tumeur est réalisée chirurgicalement par les neurochirurgiens cités ci-dessus. Lorsque l'état du patient, de la tumeur et le déroulement de la chirurgie le permettent, des échantillons indépendants de deux zones distinctes de la tumeur sont prélevés : le centre de la tumeur et la partie invasive (zone en bordure de la tumeur). Les zones sont déterminées histologiquement et avec l'aide de l'imagerie cérébrale par les neurochirurgiens directement au bloc opératoire.

Les biopsies sont collectées directement au bloc opératoire dans un tube contenant une solution de PBS (tampon phosphate salin) stérile, avant d'être acheminées au laboratoire. En cas de procédure chirurgicale avec thérapie photo-dynamique, les tubes contenant les biopsies de GB seront protégés de la lumière.

Note : La thérapie photo-dynamique consiste en l'administration au patient d'une substance photosensibilisante permettant un effet localisé spécifiquement dans les cellules tumorales [349]. Dans notre cas, en fonction du cas clinique du patient, les neurochirurgiens ont parfois décidé de l'administration au patient de Gliolan® (5-ALA, pour acide 5-aminolevulinique), préalablement à la procédure chirurgicale. Le 5-ALA est métabolisé en protoporphyrine IX, molécule produisant une fluorescence rouge-rose après excitation par une lumière bleue-violet (400nm), qui va être largement surproduite et accumulée dans les cellules tumorales. Ainsi, la thérapie au 5-ALA permet littéralement de rendre la tumeur fluorescente et ainsi guider la chirurgie de manière plus fine et plus poussée que l'imagerie cérébrale [176,177].

Les biopsies seront ensuite découpées en pièces d'environ 1-2 mm² avec un scalpel stérile, replacées en tubes et digérées avec de la trypsine (15 min, 37°C). Toutes les 5 minutes, les tubes sont agités mécaniquement de façon vigoureuse pour aider la dissociation tissulaire. Le mélange est ensuite filtré sur tamis de 40 µm, et le tamis soigneusement lavé au PBS plusieurs fois de suite afin de récupérer le maximum de matériel cellulaire.

Les échantillons sont centrifugés puis repris dans une solution commerciale permettant une lyse des globules rouges (Red Blood Cell Lysis Buffer, Roche®). Après retrait de la solution de lyse et des déchets cellulaires puis lavage au PBS, les échantillons cellulaires sontensemencés en flasque dans du milieu neurobasal (NB) complété en supplément B27, héparine (100 U/mL), FGF basique (20 ng/mL) et pénicilline/streptomycine (1000 U/mL). Le milieu de culture sera ensuite changé pour du milieu frais tous les jours jusqu'à élimination complète des déchets cellulaires et obtention d'une suspension cellulaire limpide.

Par souci d'imager au mieux les caractéristiques initiales de la tumeur du patient, l'hétérogénéité intra-tumorale est volontairement conservée en ne réalisant aucune étape de sélection ou sous-clonage.

1.2. Conditions de culture et d'entretien des lignées cellulaires : cellules de type souche et modèle 3D de sphéroïdes

Comme cité précédemment, l'ensemble de nos lignées cellulaires sont cultivées en milieu spécialisé pour la culture de cellules neurales, sans sérum : milieu NB (Gibco®, sans glutamine) complété avec du supplément B27 (Gibco®), de l'héparine (100 U/mL), du FGF basique (20 ng/mL) et de la pénicilline/streptomycine (1000 U/mL).

Le milieu de culture utilisé permet de conserver au mieux les caractéristiques phénotypiques et génétiques des tumeurs primaires [114]. Dépourvu de sérum, il permet de favoriser la sélection et l'amplification des cellules de type souche (du moins de limiter leur différenciation) [350], qui prolifèrent spontanément sous forme de neurosphères non adhérentes, appelées sphéroïdes. Ces cellules de type souche ont d'importantes capacités d'auto-renouvellement et sont les principales mises en causes dans les processus d'initiation tumorale ou de rechute. Elles représentent donc un modèle d'intérêt pour l'étude du développement du GB et d'éventuels traitements souhaitant limiter la croissance tumorale.

Pour finir, le modèle de sphéroïde permet de reproduire *in vitro* les différents gradients d'accès à l'oxygène, aux nutriments, et en contexte thérapeutique, d'accès aux substances médicamenteuses, qui existent dans la tumeur humaine [351,352]. Ainsi, le modèle 3D de neurosphères est un meilleur prédicteur thérapeutique que le modèle 2D où des disparités sont souvent observées entre résultat *in vitro* et *in vivo* [353,354].

A partir d'une certaine taille de sphéroïde, une nécrose cellulaire se développe au centre des sphéroïdes, très similairement à ce qui est retrouvé dans les GB humains [351]. Pour éviter ce phénomène de nécrose, les sphéroïdes sont régulièrement dissociés à l'acutase (protéinase similaire à la trypsine mais moins agressive). La fréquence est adaptée en fonction de la vitesse de prolifération, et donc de croissance des sphéroïdes, de chaque lignée cellulaire. Une fois dissociées, les suspensions cellulaires sont à nouveauensemencées dans un milieu frais et reforment spontanément des sphéroïdes.

1.3. Principaux modèles cellulaires utilisés dans le laboratoire

Du fait de l'accès aux données de caractérisation de la biopsie, la lignée P3 a été la plus utilisée pour nos travaux [355]. Elle provient de l'Hôpital universitaire de Bergen (Norvège) où elle a été isolée à partir d'une biopsie de patient atteint de GB de sous-type mésoenchymateux. Isolée selon le protocole ci-dessus et cultivée depuis en milieu NB, c'est une lignée de cellules de type souche, de statut IDH-wild type, EGFR wild-type et MGMT non méthylé. Elle présente un phénotype à la fois prolifératif/angiogénique et invasif [126,355].

2. Autres modèles de glioblastome humain disponibles

2.1. Lignées cellulaires commerciales

La plupart des études publiées dans la littérature sur le glioblastome se basent sur des modèles cellulaires commerciaux, tels que les lignées U-87MG ou U-251. Il s'agit de lignées extraites de tumeurs cérébrales malignes de patients (probablement de glioblastome), cultivées de manière adhérente dans un milieu complété avec du sérum. Ces lignées ont permis de nombreuses avancées sur l'étude des mécanismes du développement des GB mais elles ne reproduisent pas toujours fidèlement les caractéristiques phénotypiques des GB retrouvés chez le patient [354]. Par exemple, les U-87MG forment d'énormes tumeurs bien délimitées et ne présentent aucune zone invasive, contrairement aux U-251 qui reproduisent plutôt fidèlement le phénotype humain lorsqu'elles sont implantées *in vivo* (front invasif important et nécrose centrale dans la masse tumorale).

De plus, isolées de la biopsie tumorale dans les années 1960 [356,357], ces modèles cellulaires commerciaux ont subi des années de culture avec sérum qui ont largement contribué à induire de nombreuses dérives génétiques, moléculaires et phénotypiques (notamment *in vivo*), par rapport à la lignée d'origine et par rapport aux GB de patients [358–360].

2.2. Xénogreffes dérivées de patient (PDX)

Si les modèles *in vitro* de culture cellulaire permettent d'obtenir de manière rapide, facile et efficace du matériel pour un testing génétique, moléculaire ou thérapeutique, leur principale limitation reste cependant l'absence totale de microenvironnement non tumoral. La xénotransplantation chez l'animal de matériel de GB humain (échantillon tissulaire ou cellulaire) permet donc de recréer le microenvironnement cérébral entourant la tumeur et ainsi reproduire au mieux les propriétés cliniques du GB [355,361]. Dans le modèle de PDX, le matériel tumoral est amplifié par croissance *in vivo* chez l'animal, puis séquentiellement réimplanté dans un nouvel animal. Par cette technique, les cellules tumorales s'absolvent de toute dérive génétique liée aux conditions de culture cellulaire, et ce sur plusieurs générations murines ; et elles conservent une hétérogénéité cellulaire, un profil biomoléculaire ainsi qu'un phénotype similaire à la clinique [355,362].

Si ce modèle montre d'intéressants avantages, notamment celui d'éviter tout contact cellule-plastique, il présente également de sérieuses limitations : une expérimentation animale en quantité et continue est nécessaire pour générer le matériel d'étude générant un coût important (en temps, en animaux et en argent) ; les procédures techniques réalisables sur le matériel tumoral sont limitées puisqu'il doit être immédiatement (ou très rapidement) processé après son extraction de l'animal.

B. Modèles *in vivo*

Du fait des limitations non-négligeables qu'impose la génération de PDXs, nous avons choisi de conserver pour nos travaux un modèle *in vitro* de culture cellulaire et de générer un modèle intermédiaire *in vivo* : sur le modèle des PDXs, nous implantons de manière stéréotaxique des sphéroïdes de nos cellules de GB type souche dérivées de patients, dans les cerveaux de souris immunodéficientes.

L'intégralité des expérimentations animales a été réalisé au sein de l'Animalerie Mutualisée de Pessac (Université de Bordeaux).

1. Modèle *in vivo* de glioblastome

La greffe de cellules tumorales chez l'animal permet d'étudier la tumorigenèse, l'architecture tumorale, l'hétérogénéité intra-tumorale, l'influence du microenvironnement sur la tumeur et inversement, mais aussi l'efficacité d'un éventuel traitement dans un contexte organisme-entier. Dans notre modèle, nous implantons nos cellules de GB dérivées de patients directement sous forme de sphéroïdes dans le cerveau de souris mâles immunodéficientes RAG2/ γ $-/-$ (indispensable pour éviter les rejets), âgées de 8 semaines. Au vu du système

particulier que représente le cerveau, l'implantation intra-crâniale est préférée à un modèle sous-cutané car il permet de recréer le microenvironnement cérébral entourant la tumeur et donc les interactions GB-SNC qui existent également chez le patient.

Les souris sont préalablement anesthésiées, antalgisées (kétamine 1.5 mg/kg/xylazine 150 µg/kg i.p., buprénorphine s.c.), leur crâne est rasé, désinfecté et leurs yeux sont protégés avec de l'ocrygel. Une fois correctement placées sur le support stéréotaxique, le crâne des souris est perforé à l'aiguille pour permettre l'insertion d'une seringue Hamilton à bregma + 2.2 mm gauche, 3.5 mm de profondeur (Fig. 21). La seringue est ensuite remontée de 0.1 mm afin de créer une « poche » microscopique qui permettra aux sphéroïdes injectés de se loger correctement dans le cerveau et de diminuer les risques de fuite cellulaire au point d'implantation. Cinq sphéroïdes de 10 000 cellules sont implantés à ces coordonnées correspondant à une implantation intra-striatale gauche.

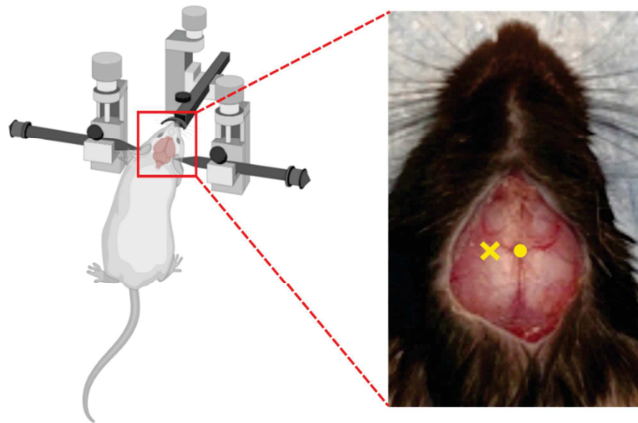


Figure 21 : Schéma de l'appareil stéréotaxique et des coordonnées d'implantation.

Gauche : Placement d'une souris immunodéficiente Rag2/γ sur un appareil stéréotaxique. Le crâne est fixé en bloquant les dents à la barre frontale et les barres d'oreilles dans le même plan. Droite : photographie du crâne dénudé d'une souris. Un point jaune est placé à l'emplacement du bregma, point de rencontre entre les sutures des os pariétaux et frontaux. Une croix jaune est placée à l'emplacement du point d'implantation : bregma + 2.2mm gauche, profondeur 3.4mm.

Le monitoring des animaux est réalisé par observation du comportement et de l'aspect des animaux quotidiennement ainsi que par suivi de poids tous les deux jours et/ou suivi de bioluminescence tumorale 1 fois par semaine. Le sacrifice des animaux est réalisé dès l'atteinte de points limites définis au préalable, notamment déterminés par une perte de poids de plus de 10%.

En fonction des expérimentations, les souris seront euthanasiées par dislocation cervicale, ou bien subiront une perfusion intra-cardiaque de PBS puis formaline 10% permettant d'extraire tout le contenu sanguin du corps et de fixer efficacement les tissus cérébraux. Dans chaque condition, les cerveaux sont prélevés puis congelés dans l'azote liquide (cas de dislocation) ou post-fixés pendant 24h en formaline puis placés en solution de sucrose 30% avant d'être congelés dans l'isopentane (cas de perfusion intra-cardiaque).

Les cerveaux congelés seront ensuite coupés au cryostat en coupes de 10 ou 30 μm d'épaisseur. Ces coupes permettront ensuite des études d'immunohistochimie (détaillées dans la partie II. Techniques expérimentales phares) permettant de recueillir de nombreuses informations architecturales, protéiques sur les tumeurs GB mais également d'évaluer la croissance et l'invasion *in vivo* de notre modèle cellulaire.

2. Modèle *in vivo* de résection tumorale

Afin d'étudier l'impact de la résection chirurgicale dans notre modèle de GB *in vivo*, nous avons mis au point un protocole de résection tumorale intra-crâniale, inspiré de la procédure de l'équipe du Dr Chevet à Rennes [363]. Ce modèle de résection a été développé en collaboration avec les techniciens et ingénieurs de l'Animalerie mutualisée de Pessac (Mme Marie-Alix Derieppe notamment) ainsi qu'avec le Dr. Olivier Mollier, neurochirurgien de l'hôpital Pellegrin de Bordeaux.

Afin de pouvoir contrôler la taille de la tumeur et pour faciliter l'étape de résection, les cellules implantées sont toujours GFP+ / Luciferase+. Elles sont implantées chez la souris immunodéficiente selon le protocole détaillé ci-avant. Le monitoring de la croissance tumorale est réalisé par bioluminescence tumorale : après administration de luciférine en IP, les cellules tumorales exprimant l'enzyme luciférase (expression assurée par l'intégration d'un plasmide porteur du gène de la luciférase) peuvent oxyder ce substrat en oxyluciférine, réaction provoquant l'émission de photons. Les photons émis pourront être détectés en plaçant l'animal dans une chambre noire et en imageant grâce à un système PhotonIMAGER (BiospaceLab).

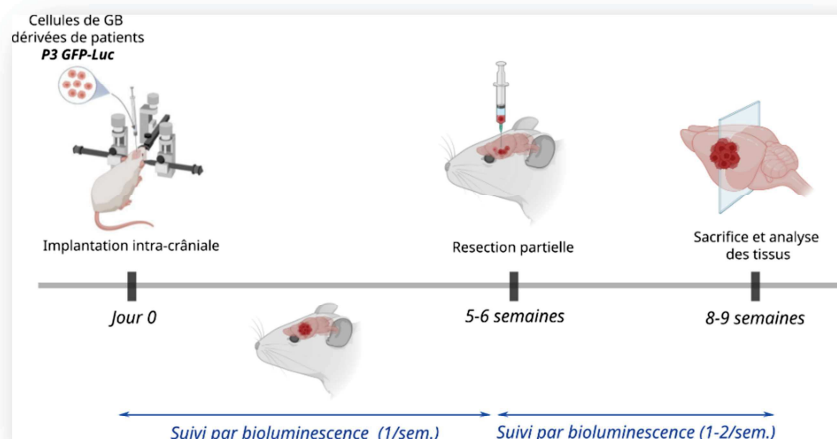
Après 5 à 7 semaines de croissance tumorale, en contrôlant d'avoir une bioluminescence toujours comparable, les souris sont à nouveau anesthésiées et la tumeur est réséquée de manière maximale. Pour cela, les souris sont à nouveau placées sur l'appareil stéréotaxique et le crâne est à nouveau percé à l'endroit du point d'implantation. Sous loupe binoculaire, l'ouverture crânienne est ensuite élargie à la pince chirurgicale pour créer une brèche d'environ 2-3 mm de diamètre (craniectomie minimale permettant une visibilité correcte de la tumeur). La tumeur GFP+ (fluorescence visible à l'œil nu ou lorsqu'elle est faible, avec l'aide d'une lampe ultraviolette) est visualisée grâce à la loupe binoculaire. La résection de la tumeur est pratiquée par aspiration du tissu tumoral fluorescent, jusqu'à ce que la fluorescence ne soit plus visible. La cavité de résection est ensuite scellée par une pièce de Teflon (2x2mm, Neuropatch®) glissée sous les bordures de la cavité crânienne et fixée avec de la colle chirurgicale. Cette étape permet de limiter le saignement hors de la cavité de résection et donc empêcher les complications post-chirurgicales de type hémorragie cérébrale ou méningée, mais aussi de restaurer la pression intracrânienne et d'éviter le développement secondaire d'une tumeur dans

l'espace sous-cutané (par fuite de matériel tumoral). La plaie est ensuite soigneusement refermée par des sutures.

L'animal est chauffé et attentivement monitoré tout au long de la procédure et jusqu'à son réveil de l'anesthésie, puis replacé dans sa cage initiale. Pendant les premiers jours post-chirurgie, les animaux opérés sont étroitement surveillés, antalgisés au besoin (buprénorphine sous-cutanée en post-opératoire) et complémentés en nourriture adaptée pour faciliter leur convalescence (gel nutritif déposé directement sur le sol des cages). Leur comportement est également attentivement surveillé : tout signe de souffrance physique ou cérébrale (apparition possible de stéréotypies, agressivité) fait l'objet d'une attention particulière et s'il n'est pas résolutif, justifie le sacrifice de l'animal. Les animaux opérés sont isolés des animaux non opérés grâce à des séparateurs créant des compartiments dans les cages, pour éviter les problèmes d'attaque ou l'altération des sutures entraînant la mauvaise cicatrisation de la plaie crâniale.

Après une semaine de récupération post-chirurgicale, la taille tumorale est à nouveau mesurée par bioluminescence, puis régulièrement, une fois par semaine pendant 3 à 5 semaines. Au terme de l'expérimentation, les animaux sont euthanasiés par perfusion intracardiaque de formaline et leurs cerveaux respectifs prélevés, post-fixés, puis congelés dans l'isopentane glacé pour de futures analyses immunohistochimiques.

Figure 22 : Timelapse du déroulement d'un protocole de résection tumorale *in vivo*.



II. TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES PHARES

A. Expérimentations *in vitro*

1. Standardisation de la culture cellulaire en 3D

Nos lignées des cellules type souche poussent spontanément en culture 3D, sous forme de sphéroïdes. Ces sphéroïdes, sortes de « mini-tumeurs », reproduisent mieux l'hétérogénéité (pas de sous clonage à partir de la tumeur primaire) ainsi que l'architecture de la tumeur en formant spontanément des gradients d'O₂ et de nutriments [351]. Plus le sphéroïde grossit, plus le centre devient hypoxique alors que la périphérie reste parfaitement oxygénée, stimulant ainsi des programmations métaboliques différentes en fonction des zones [346]. De plus, la structure sphérique et multicouche du sphéroïde permet de recréer des conditions parallèles à la tumeur (gradients, pressions physiques et pénétrabilité) permettant d'évaluer au mieux l'efficacité, pénétrabilité et pharmacocinétique de traitements *in vitro*.

Afin de standardiser toutes nos expériences, nous avons développé un protocole de formation de sphéroïdes de taille homogène [351]. Dans une plaque 96 puits à fond incurvé, 10 000 cellules (préalablement dissociées avec de l'acutase) sont ensemencées dans un milieu neurobasal complet auquel est ajouté 0.4% de méthylcellulose. La méthylcellulose, dérivé synthétique de la cellulose, permet de favoriser l'agrégation cellulaire sans influence sur le pH du milieu et sans toxicité pour les cellules. Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂, 95% d'humidité pendant 3 jours, au terme desquels un sphéroïde de taille standard est formé dans chacun des puits ensemencés.

2. Analyse de la progression du GB

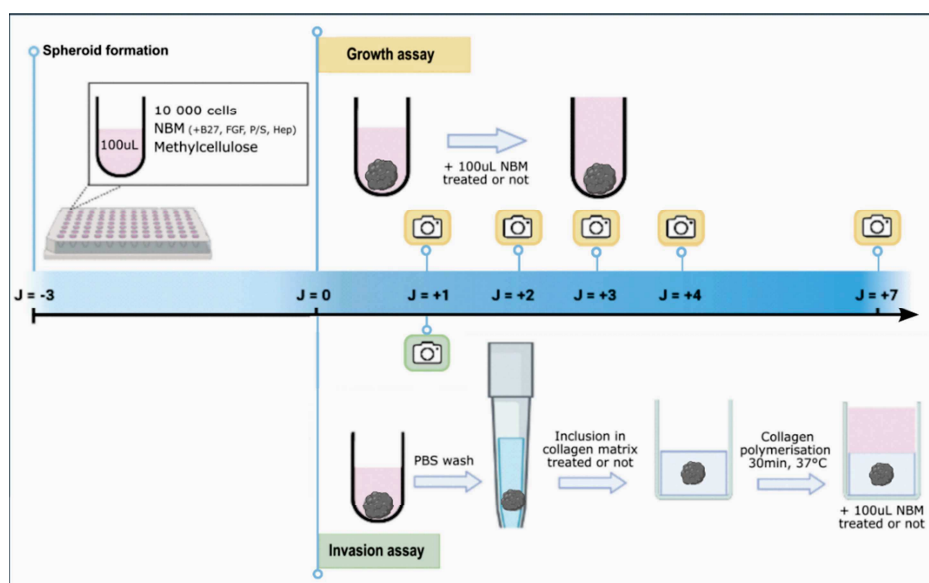


Figure 23 : Représentation schématique du protocole de formation, de croissance et d'invasion des sphéroïdes.

2.1. Analyse de la prolifération cellulaire : expérience de croissance de sphéroïdes

Après 3 jours nécessaires à la formation des sphéroïdes, 100 μ L de milieu NB complet, préalablement chauffé à 37°C est ajouté dans chaque puits contenant un sphéroïde. En fonction des conditions souhaitées, un traitement peut être ajouté dans ce milieu (traitement au 2x pour s'assurer de la bonne concentration finale en puits). Une étape préalable de lavage des sphéroïdes au PBS peut également être ajoutée, les sphéroïdes seront dans ce cas pipetés avec des cônes dont la pointe est préalablement coupée pour ne pas endommager les sphères. Une image de chacun des sphéroïdes est réalisée à T0 puis à intervalles réguliers afin de monitorer la croissance du sphéroïde, reflet de la prolifération des cellules formant le sphéroïde.

Le pourcentage de croissance est calculé en comparant l'aire du sphéroïde à un temps X à l'aire du même sphéroïde à T0. Afin de diminuer la variabilité inhérente à la manipulation, au moins 8 sphéroïdes seront considérés pour chaque condition d'expérience.

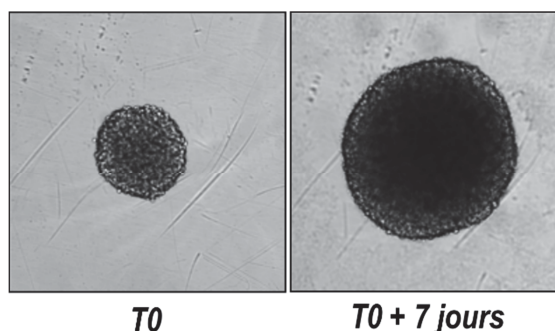


Figure 24 : Expérience de croissance de sphéroïdes.
Images représentatives d'un sphéroïde en croissance au jour 0 (gauche) et après une semaine (droite).

2.2. Analyse des capacités de prolifération : marquage EdU sur cellules dissociées

De manière complémentaire aux expériences de croissance des sphéroïdes, un marquage EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine ; Click-iT Plus EdU Imaging Kit, Life Technologies) a permis d'évaluer la prolifération de nos cellules. Cette approche, plus sensible, est basée sur l'incorporation d'un analogue de thymidine, l'EdU, pendant la phase de synthèse d'ADN lors de la multiplication cellulaire. Les cellules, préalablement traitées avec les différentes conditions expérimentales pendant un temps défini, sont donc incubées avec une solution d'EdU dilué dans le milieu de culture pendant 1h à 37°C, puis processées selon les recommandations du protocole constructeur.

Brièvement, les différents échantillons sont fixés (PFA 4%), lavés (PBS, albumine de sérum bovin 3%), perméabilisés (Triton x-100 0,5%, 20min), puis mis en contact avec un cocktail de réactifs permettant la réaction d'immunomarquage de l'EdU (Click-iT Plus EdU Imaging Kit, Life Technologies). La détection a ensuite été faite par cytométrie en flux.

2.3. Analyse des capacités invasives : invasion de sphéroïdes en matrice de collagène

Afin d'évaluer les propriétés invasives de nos cellules, les sphéroïdes sont inclus dans une matrice extracellulaire (MEC) artificielle. En effet, dans le SNC, la MEC est formée par un réseau complexe de protéines fibrillaires telles que le collagène, la laminine, la fibronectine et le protéoglycane. Ainsi, pour mimer la MEC cérébrale et permettre aux cellules du sphéroïde de se détacher pour envahir leur environnement, les sphéroïdes sont placés dans un gel 3D de collagène de type I (principal collagène fibrillaire) [351].

La matrice de collagène est préparée sur glace à partir de collagène I pur (concentration finale 1 mg/mL), PBS 1x, NaOH et eau stérile. Les sphéroïdes sont prélevés à l'aide de cônes dont la pointe est coupée, lavés avec du PBS pour éliminer tout débris, puis inclus dans 100 µL de matrice, dans un puits à fond plat de plaque 96 puits. La plaque est placée 30 minutes à 37°C pour permettre la polymérisation du gel de collagène, puis 100 µL de milieu NB est ajouté au-dessus du gel. En fonction des conditions souhaitées, un traitement peut être ajouté dans ce milieu (traitement au 2x pour s'assurer de la bonne concentration finale en puits).

Une image de chaque puits est réalisée 24h après inclusion. L'invasion relative de chaque sphéroïde est déterminée par analyse d'image semi-automatique sur Fiji (macro Fiji [351]) permettant d'évaluer l'aire d'invasion totale, ensuite soustraite de l'aire du centre du sphéroïde.

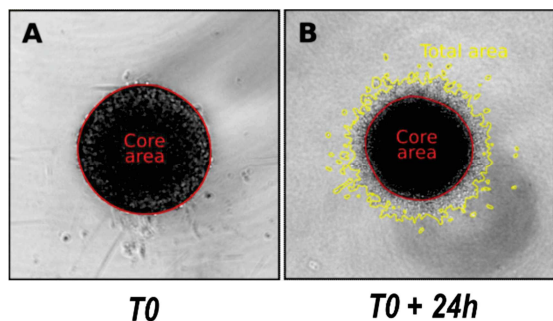


Figure 25 : Invasion d'un sphéroïde inclus dans une matrice de collagène [351].

Le sphéroïde est inclus dans un gel de collagène I à T0 (gauche) puis l'aire d'invasion est évaluée 24h plus tard (droite) par analyse d'images. En rouge est représentée l'aire du centre du sphéroïde et en jaune l'aire totale (aire zone invasive = aire totale – aire centre).

3. Analyses métaboliques et fonctionnelles

3.1. Western Blot

La modulation de l'expression protéique de différentes protéines d'intérêt est déterminée par Western Blot.

Les échantillons cellulaires, soumis aux différentes conditions expérimentales souhaitées, sont lysés avec un tampon de lyse RIPA 1x (NaCl 150 mM, tris-base 50 mM, NP40 1% w/v, SDS 0.1% w/v, sodium deoxycholate 0.5% w/v and EDTA 1 mM pH 8) supplémentés d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Une quantité équivalente de protéines de chaque condition testée est indépendamment mélangée avec un tampon de charge à base de Laemmli (60 mM

Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS w/v, 4% glycerol w/v, 9% thioglycerol w/v, 5% bromophenol blue w/v) puis dénaturée par chauffage à 95°C pendant 5 minutes (cas exceptionnel : échantillons non chauffés dans le cas de Western Blots pour MCT1 ou OXPHOS). Les échantillons sont chargés sur des gels Bis-Tris-acrylamide pour la séparation des protéines, ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose ou PVDF. Le blocage des membranes est réalisé par une solution de lait 5% en TBS-T 0,05% (*Tris Buffer Saline*, Tween 0,05%, pH8).

L'immunomarquage des protéines d'intérêt est obtenu par incubation avec des anticorps primaires puis secondaires couplés à une peroxydase (HRP, *Horse raddish peroxidase*) ou à un fluorophore. L'immunodétection est ensuite possible par chemiluminescence ou fluorescence.

La quantification de l'expression protéique est ensuite réalisée en conditions non-saturantes par analyse d'image sur le logiciel Fiji. L'expression de chaque protéine d'intérêt est normalisée par des protéines contrôles, telles que la tubuline ou la vinculine.

3.2. Immunofluorescence sur cellules

Des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées afin d'apprécier le profil d'expression intracellulaire de différentes protéines d'intérêt. La croissance spontanée de nos cellules en structures 3D telles que les sphéroïdes compliquant la détection subcellulaire, nos cellules sont préalablement dissociées et forcées à adhérer sur des lamelles coatées avec une pellicule de Matrigel (Corning Matrigel 0,2 mg/mL, ThermoFisher Scientific) afin d'obtenir une répartition en 2D.

Les lamelles de cellules sont ensuite lavées au PBS puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 30 min. Elles subiront ensuite une étape de perméabilisation au Triton x-100 0,1% (5 min) puis de blocage (PBS, albumine de sérum bovin 1%, sérum foetal bovin 2% ; 10 min), entrecoupées de lavages au PBS. L'immunomarquage est ensuite réalisé par incubation avec anticorps primaires puis secondaires fluorescents. Un marquage nucléaire par coloration Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific) et du cytosquelette grâce à la phalloïdine rhodamine (ThermoFisher Scientific) est généralement ajouté.

Après lavages au PBS, les lamelles immunomarquées sont montées sur lames dans un milieu de montage permettant de réduire les phénomènes de *photo-bleaching* (Prolong Gold Antifade Reagent, Invitrogen). Pour finir, l'immunodétection est faite par microscopie et l'analyse des images produites est réalisée grâce à des macros créées dans le laboratoire sur le logiciel Fiji.

3.3. Analyse de l'activité mitochondriale : Respiration cellulaire, potentiel de membrane mitochondrial, masse mitochondriale

- Evaluation de la respiration cellulaire

Les flux respiratoires de nos cellules sont mesurés par oxygraphie haute résolution grâce à la technologie Oroboros, permettant d'apprécier en temps réel la consommation d'oxygène des cellules. Cette consommation d'O₂ est mesurée à 37°C dans du milieu de culture classique (milieu NB). La respiration cellulaire est évaluée dans 3 différentes conditions : en état phosphorylant (respiration endogène basale), en état non-phosphorylant par ajout d'oligomycine (inhibiteur du complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale, 50 ng/mL), ou en état découplé par l'addition successive de carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP 0.5 µM) pour atteindre les capacités respiratoires maximales de nos cellules. Également, l'ajout de différents inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale permet d'évaluer la part du flux dépendant de l'un ou l'autre des complexes respiratoires. Respectivement, l'ajout de roténone (30 nM) ou d'atpénin A5 (20 nM) nous a permis d'évaluer la sensibilité de nos cellules à l'inhibition du complexe I ou II de la chaîne respiratoire. Pour finir, un traitement à l'antimycine A (100 nM), inhibiteur du complexe III, est effectué à la fin de chaque expérimentation pour évaluer la proportion du flux de consommation d'O₂ qui n'est pas lié à la chaîne respiratoire mitochondriale.

Note : D'autres expériences de respiration cellulaire ont été réalisées par des collaborateurs norvégiens (Dr. Gro Vatne Rosland) dans le cadre d'un projet sur les pyruvate déshydrogénase kinases en utilisant la technologie Seahorse XFe96 Analyzer. Le détail de ces expérimentations est délivré dans l'article « *Refining the Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinases in Glioblastoma Development* » présenté en partie Résultats – Partie 1, II.

- Evaluation du potentiel de membrane mitochondrial

Le potentiel de membrane mitochondrial de nos cellules est évalué grâce à un colorant fluorescent, la Tetramethylrhodamine (TMRM, Invitrogen), qui s'accumule dans les mitochondries présentant un potentiel de membrane intact. Ainsi, son signal est proportionnel au potentiel de membrane mitochondrial, et une diminution de ce dernier entrainera directement une perte de signal fluorescent du TMRM.

Des cellules traitées selon les conditions expérimentales souhaitées sontensemencées en plaques 6 ou 12 puits pour la durée souhaitée. Au terme de cette incubation, les cellules sont dissociées par action de l'accutase puis reprises dans du milieu chaud, les préservant de tout stress. Le colorant TMRM est ajouté directement dans le milieu NB à la concentration finale de 20 nM et incubé avec les cellules à 37°C pendant 30 min. Des témoins négatifs, sous la forme

de cellules contrôles non traitées avec le colorant TMRM et de cellules contrôles avec colorant mais non traitées avec les conditions expérimentales souhaitées (traitements, différentes conditions nutritionnelles, d'oxygène...), sont incubés en parallèle pour chaque expérimentation.

Après 30 min, la fluorescence est analysée dans les échantillons par lecture directe au cytomètre en flux (excitation : 488 nm, émission : 570 +/- 10 nm ; BD Accuri C6 Flow Cytometer, BD Biosciences). Un *gating* de la population d'intérêt est réalisé à partir du contrôle négatif sans TMRM afin de sélectionner uniquement les cellules vivantes, et à partir du contrôle négatif avec TMRM pour définir une valeur de fluorescence « contrôle ». Dès la lecture des échantillons terminée, chaque échantillon est immédiatement traité avec 50 µM de CCCP, agent découplant permettant d'abolir complètement le potentiel de membrane mitochondrial. Chaque échantillon cellulaire est incubé 30 min à température ambiante avec ce traitement CCCP puis une nouvelle lecture de la fluorescence est réalisée, permettant d'obtenir une valeur de fluorescence « bruit de fond ».

La valeur du potentiel de membrane mitochondrial est calculée par soustraction de la valeur de fluorescence avec CCCP à la fluorescence initiale, pour chaque échantillon. Au moins 3 réplicats expérimentaux sont réalisés pour chaque condition expérimentale. Chaque condition est finalement comparée à la condition contrôle et exprimée en pourcentage de variation par rapport au contrôle.

3.4. Dosage de la production de ROS intracellulaire

La production intracellulaire de ROS est mesurée grâce à une sonde fluorogénique (CellROX Green Reagent, Life Technologies), dont le signal fluorescent est activé par oxydation par les ROS et peut être quantifié par microscopie, fluorométrie ou cytométrie en flux.

Un nombre de cellules équivalent estensemencé dans les différentes conditions expérimentales souhaitées (au moins 2 réplicats techniques sont prévus pour chaque condition). Le jour de l'expérimentation, les cellules des différentes conditions sont dissociées à l'acutase, lavées au PBS, puis resuspendues dans du milieu de culture chaud. La sonde CellROX Green est directement placée dans le milieu de culture et incubée avec les cellules pendant 30 min. Les cinq dernières minutes, un colorant de l'ADN (Hoechst 33342) est ajouté dans chaque échantillon. Les différents échantillons sont lavés puis resuspendus dans du PBS,ensemencés dans une plaque 96 puits noire opaque à fond transparent, et la fluorescence est lue immédiatement grâce à un lecteur de microplaques (CLARIOstar Plus, BMG Labtech ; CellROX fluorescence excitation/émission : 485/520 nm ; Hoechst 33342 fluorescence excitation/émission : 350/461 nm). Pour chaque échantillon, la valeur de fluorescence CellROX

est normalisée par la valeur de fluorescence du colorant Hoechst, théoriquement proportionnel au nombre de cellules. Un contrôle positif de la production de ROS, réalisé par traitement de cellules contrôles au t-BHP (tert-butyl hydroperoxyde), ainsi qu'un contrôle négatif (cellules contrôles sans sonde CellROX) sont ajoutés à chaque expérimentation pour s'assurer du bon fonctionnement de la sonde.

3.5. Dosage enzymatique de la concentration de lactate intra- et extra-cellulaire

Le dosage enzymatique de lactate a été réalisé selon le protocole développé dans le laboratoire et décrit dans Bouchez *et al.*, STAR Protocols, 2022 [364]. Brièvement, il est basé sur la coopération en l'enzyme L-lactate oxydase, qui consomme lactate et oxygène pour produire pyruvate et H₂O₂, et une peroxydase (HRP) qui, avec l'ajout du réactif Amplex Red, réagit avec l'H₂O₂ de manière stœchiométrique pour produire un substrat coloré, la résorufine.

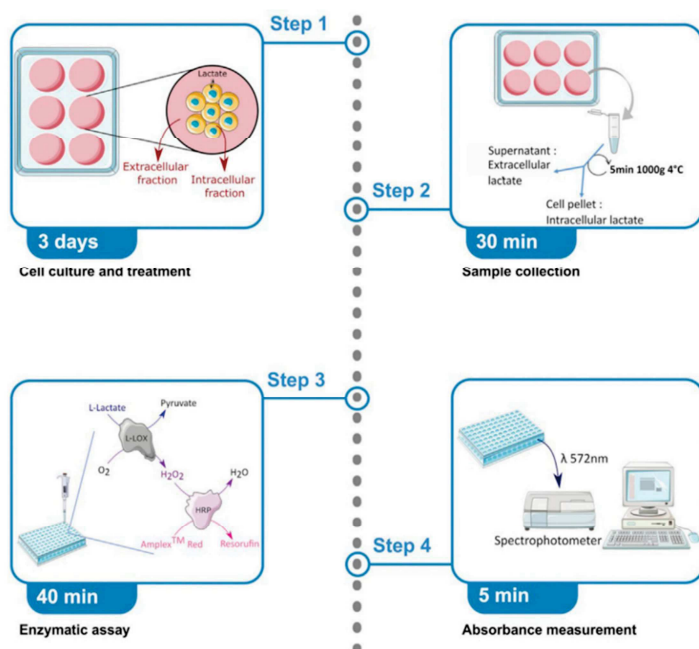


Figure 26 : Principe du dosage enzymatique du L-lactate [364].

L-LOX : L-Lactate oxydase ; HRP : Horse raddish peroxidase.

3.6. Dosage de métabolites intra- et extra-cellulaire par chromatographie ionique (Integrion)

Les dosages métaboliques abordés dans la partie Résultats – Partie II ont été réalisés grâce au Service d'Analyses Métaboliques de Bordeaux (plateforme TBMCore CNRS), en collaboration avec le Dr Benoit Pinson, selon le protocole qui suit.

Les extractions métaboliques sur milieux de culture et cellules de mammifères ont été réalisées en utilisant la méthode d'ébullition EtOH préalablement décrite [365]. La séparation des métabolites par chromatographie ionique a été faite sur une colonne AS11-HC-4 µm (250 2 mm, Thermo Electron) à l'aide de la station de chromatographie Integrion (Thermo Electron) équipée d'un générateur et d'un supprimeur d'éluant RFIC (ADRS 600) et couplé à un

détecteur UV-Vis Vanquish à barrette de diodes et à un détecteur de conductivité. La séparation des métabolites a été réalisée à 0,38 ml/min et à 30 °C avec un gradient discontinu d'hydroxyde de potassium, comme décrit en [366]. Les métabolites ont été détectés par conductimétrie et/ou par absorbance et ont été identifiés par co-injection avec des étalons et/ou par leur signature spectrale en UV. Pour les cellules, la normalisation des échantillons a été effectuée sur la base du nombre de cellules et de leur volume médian déterminés à l'aide d'un Multisizer 4 (Beckman coulter). Les concentrations intra- et extra-cellulaires des métabolites ont été déterminées en utilisant des courbes étalon obtenues avec des composés purs. La somme des nucléotides adényliques est définie comme $[AXP] = [AMP] + [ADP] + [ATP]$ et la charge d'énergie adénylique comme $AEC = ([ATP] + 1/2 [ADP])/[AXP]$ [367].

B. Expérimentations in vivo / ex vivo

1. Expérimentation in vivo

L'ensemble des expérimentations animales a été conduit en respectant les directives institutionnelles et avec accord préalable d'un comité d'éthique local. Les souris utilisées pour la majorité des expérimentations sont des souris mâles immunodéficientes RAGγ2C^{-/-}, élevées et traitées à l'Animalerie mutualisée de Pessac (Université de Bordeaux) en conditions de température et d'humidité régulée (22.0 +/- 2.0°C ; 55.0 +/- 10.0%). Un cycle d'éclairage jour/nuit de 12h est mis en place et les animaux sont nourris *ad libitum*.

2. Bioluminescence in vivo

Une fois par semaine, pour évaluer la taille tumorale *in vivo*, les animaux reçoivent une injection intrapéritonéale de 200 µL de D-luciférine (15 mg/mL ; Euromedex), sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane et soumis à une imagerie par bioluminescence à l'aide du système d'imagerie *in vivo* PhotonIMAGER (Biospace Lab). Toutes les données de bioluminescence ont été collectées et analysées à l'aide du logiciel M3 vision.

3. Immunohistochimie

Des coupes histologiques de 10 ou 30 µm sont réalisées au cryostat respectivement à partir de cerveaux extraits et immédiatement congelés en azote liquide, ou de cerveaux fixés par perfusion intracardiaque de formaline sur animal vivant anesthésié. Ces derniers sont préalablement post-fixés pendant 48h puis transférés en solution de sucrose, avant d'être congelés dans l'isopentane refroidi (-75°C, 45 secondes) puis sectionnés au cryostat. Les coupes de 10 µm d'épaisseur sont directement collées sur lames histologiques et conservées à -80°C. Les coupes de 30 µm d'épaisseur sont conservées à -20°C sous forme flottante dans

une solution *anti-freeze* (glycérol 20%, éthylène glycol 30%, NaH₂PO₄·2H₂O 0.2 M, Na₂HPO₄·2H₂O 0.2 M, H₂O).

Note : Les procédures immunohistologiques détaillées ci-après sont valables pour des coupes flottantes de 30 µm ; pour les coupes de 10 µm, se référer au protocole détaillé dans l'article « *Refining the Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinases in Glioblastoma Development* » présenté en partie Résultats – Partie 1, II.

Les coupes flottant dans l'anti-freeze sont récupérées à l'aide de pinceaux et déposées dans une boîte de pétri remplie de PBS pour séparer et sélectionner les coupes d'intérêt. Dans une plaque 24 puits, les coupes d'intérêt sont lavées 3 fois séquentiellement dans du PBS-Triton 0.3% (agitation 5 min par lavage). Elles sont ensuite incubées dans une solution de blocage (PBS-Triton 0.3% + *Donkey serum* 10% ou BSA 5%) pendant 45 min, sous faible agitation, à température ambiante. L'anticorps primaire souhaité est ensuite dilué à la concentration recommandée dans la solution de blocage puis le mélange est ajouté sur les coupes et incubé *overnight* à 4°C, sous agitation faible. Le jour suivant, les coupes sont lavées par 3 fois au PBS-Triton 0.3% avant d'être incubées dans l'anticorps secondaire d'espèce correspondante au primaire utilisé. L'anticorps secondaire est couplé à un fluorophore vert (488 nm), rouge (555 nm) ou rouge lointain (647), dilué dans la solution de blocage entre 1/250 et 1/500, et incubé 2 heures à température ambiante dans l'obscurité complète. Trois nouveaux lavages au PBS-Triton 0.3% puis un marquage DAPI (5 min, dilution 1/10000) sont effectués. Les coupes sont à nouveau lavées 3 fois au PBS-Triton 0.3% puis montées entre lames et lamelles dans un milieu de montage permettant de préserver la fluorescence tout en réduisant le *photo-bleaching* (Prolong Gold Antifade Reagent, Invitrogen). Les lames sont conservées à 4°C jusqu'à être imagées par microscopie confocale ou par scanner de lames.

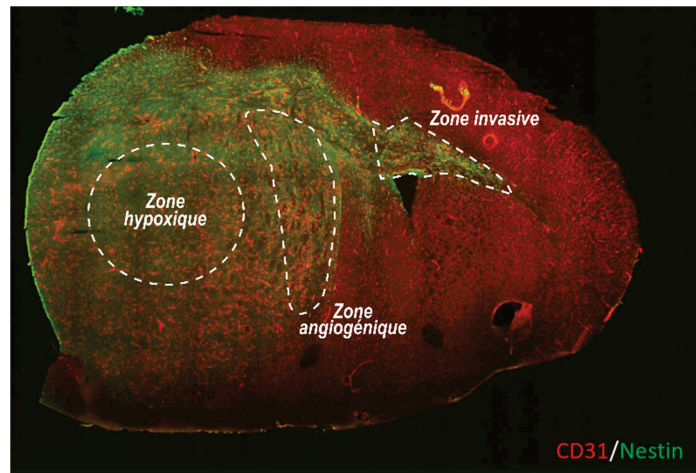
4. *Microdissection par capture laser (LCM)*

En collaboration avec la plateforme de microdissection laser du Neurocentre Magendie (Dr. Marlène Maitre), nous avons microdisséqué des coupes de cerveaux murins implantés avec nos cellules de GB (cellules P3), réséqués ou non, permettant de sélectionner des zones spécifiques de la tumeur ou de son environnement. Cette microdissection est réalisée sur des coupes congelées, avec le microdissecteur laser PALM MicroBeam (Zeiss), qui fonctionne grâce à un laser UV découpant la région d'intérêt par photoablation du tissu adjacent.

Selon le modèle dessiné ci-dessous (Fig. 27), plusieurs régions d'intérêt ont été découpées et prélevées : une partie du centre de la tumeur, appelée zone hypoxique ; une partie de la périphérie de la tumeur, appelée zone angiogénique ; ainsi que la zone invasive correspondant à la zone d'invasion tumorale en front multicellulaire ou *single cell* le long des corps calleux de l'hémisphère contro-latéral.

Figure 27 : Représentation schématique des zones microdisséquées par LCM sur coupe de cerveau murin.

Exemple de coupe coronale du cerveau d'une souris RAG γ 2C $^{-/-}$ implantée avec des cellules de GB humain P3. Un immunomarquage fait apparaître les cellules tumorales (Nestin) en vert, et les vaisseaux sanguins (CD31) en rouge. En blanc sont représentées les zones capturées par microdissection laser.



Ces 3 zones sont sélectionnées sur des cerveaux de différentes conditions : une condition contrôle, ou « Sham », représentée par des souris implantées avec du PBS, une condition avec implantation de cellules P3 formant par la suite une tumeur GB et une condition avec implantation puis résection de la tumeur (résection à 5-6 semaines post-implantation).

Les échantillons récoltés de chaque zone, et pour chaque condition, sont ensuite traités pour la préservation des acides nucléiques et envoyés pour séquençage ARN (LuxGen - LIH LNS Genome Center, Luxembourg Institute of Health, Laboratoire National de Santé - 1 rue Louis Rech, L-3555 Dudelange Luxembourg). Les données issues de ce RNASeq ont été analysées par nos collaborateurs du Centre de Bioinformatique de Bordeaux (CBIB).

5. Clearing de cerveaux murins

Le clearing des cerveaux murins a été réalisée en collaboration avec le Dr. Jérémie Teillon du Bordeaux Imaging Center (Centre Broca, Bordeaux).

Les échantillons sont préparés selon le protocole iDISCO+. La fixation des cerveaux est réalisée par perfusion intracardiaque de PFA 4% puis post-fixation en PBS-PFA 4% pendant 3h à température ambiante. Les cerveaux sont ensuite lavés 3 fois au PBS et conservés à 4°C. Les tissus sont déshydratés par bains successifs de méthanol (20-40-60-80-100-100%), 1h chaque bain puis 2h le dernier bain, le tout sous agitation à température ambiante. Les lipides sont dissous par bain de dichlorométhane/méthanol (2 :1) overnight suivi de deux lavages au méthanol pur (4h, T°C ambiante), puis un traitement à l'H₂O₂ 5% en méthanol est réalisé pour

réduire l'autofluorescence des tissus (overnight, 4°C). Les tissus sont ensuite réhydratés par bains successifs de méthanol dilué dans l'eau distillée (60-40-20%) puis lavés au PBS. Les échantillons sont alors incubés dans une solution de perméabilisation pendant 24h à 37°C sous agitation, puis dans une solution de blocage (PBS-gélatine) pendant 24h à 37°C sous agitation.

Ensuite, les cerveaux sont incubés dans l'anticorps primaire anti-GFP (Aves GFP 1020, 1/2000) pendant 10 jours à 37°C sous agitation, lavés au PBS deux fois 1h puis overnight, puis incubés avec l'anticorps secondaire couplé Alexa Fluor 647 pendant 7 jours à 37°C sous agitation et protégés de la lumière et lavés à nouveau au PBS (2 fois 1h puis overnight).

Les clichés sont finalement obtenus en 3 dimensions par Light sheet imaging (LaVision Ultramicroscope II).

6. Imagerie métabolique par spectrométrie de masse sur coupes

L'imagerie et la quantification du lactate sur coupes de cerveaux murins a été réalisée grâce à la technologie MALDI-MSI (imagerie par spectrométrie de masse MALDI) en collaboration avec le Dr. Yanis Zirem de l'équipe du Dr. Michel Salzet, PRISM INSERM U1192 (Protéomique, Réponse Inflammatoire, Spectrométrie de masse) à Lille.

Un cryostat Leica CM1510S (Leica Microsystems, Nanterre, France) a été utilisé pour couper des sections de 12 afin de réaliser l'analyse MALDI-MSI. Ces coupes de tissus ont été déposées sur des lames coatées ITO (LaserBio Labs, Valbonne, France) et séchées sous vide pendant 15 min.

Le NEDC (N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride), une matrice ionique solide, a été utilisé pour l'analyse MALDI-MSI en polarité négative. La matrice, à 10mg/ml dans le méthanol, H₂O (7:3, v/v), a été pulvérisée à l'aide d'un pulvérisateur M5 TM (HTX Technologies, US) réglé sur les paramètres optimisés : 30°C comme température de la buse, 12 passages avec un motif CC, 0.1 mL/min comme débit, la vitesse de la buse à 1200 mm/min, l'espacement de la largeur de la piste à 2 mm et 10 psi pour la pression du gaz.

Les analyses MALDI-MSI ont été réalisées sur un RapifleX MALDI TissueTyper™ (Bruker Daltonik GmbH) en mode ionique négatif et en utilisant le phosphore rouge comme calibrant externe avant l'analyse. La résolution spatiale a été fixée à 50 µm et la gamme de masse a été fixée entre m/z 50-1000. L'énergie a été réglée entre 70 et 80 % de l'énergie du laser. Les tensions de la source d'ions étaient de 20 kV et de 11 kV pour la lentille.

RÉSULTATS

PARTIE I :

SYMBIOSE MÉTABOLIQUE

DANS LE GLIOBLASTOME

I. ÉTUDE DE L'IMPLICATION DES LACTATE DÉSHYDROGENASES DANS LA PROGRESSION DES GB

Axe de recherche phare à mon arrivée dans l'équipe, j'ai intégré l'effort mis dans ce projet dès mon début de thèse. Ces premiers résultats forment le socle de la suite de mes travaux et, n'ayant pas été à l'origine de l'ensemble des expérimentations de ce premier axe, je souhaitais cependant vous en présenter les idées principales. Ce projet a donné lieu à une publication, dont je suis co-deuxième auteur, dans le journal *EMBO Molecular Medicine*, intitulée *Lactate dehydrogenase promote glioblastoma growth and invasion via a metabolic symbiosis*, et présentée en Annexe n°II.

Contexte de l'étude

Contrairement aux cellules saines dont la production énergétique repose principalement sur l'oxydation complète du pyruvate *via* les oxydations phosphorylantes mitochondriales, les cellules cancéreuses sont capables de favoriser un métabolisme glycolytique, même en présence d'oxygène. Cette dérégulation, connue sous le nom d'effet Warburg [323], permet de soutenir l'importante production de biomasse nécessaire à l'intense prolifération cellulaire des cellules malignes [368]. Conjointement, la croissance rapide de la masse tumorale condamne la pénétration intratumorale de l'oxygène et installe une forte influence hypoxique dans certaines zones tumorales, favorisant d'autant plus le métabolisme glycolytique.

Cette surrégulation de la glycolyse entraîne une forte production de lactate grâce à un complexe enzymatique tétramérique cytosolique appelé Lactate déshydrogénases (LDH). L'ensemble des isoformes LDH catalyse l'interconversion de pyruvate en lactate, couplé à l'oxydation ou la réduction du cofacteur NAD⁺/NADH. Le sens de la réaction, produisant soit du lactate soit du pyruvate, est déterminé par la concentration locale de ces substrats, l'affinité des

sous-unités LDH pour chacun d'entre eux et l'état redox cellulaire. En règle générale, LDHA catalyse préférentiellement la conversion du pyruvate en lactate tandis que LDHB va plutôt médier la rétroconversion en pyruvate.

De nombreux cancers montrent des niveaux élevés de LDHA [369], et ceux-ci corréleront généralement avec un mauvais pronostic pour les patients [370]. Des approches thérapeutiques basées sur une inhibition de LDHA ont déjà montré des effets bénéfiques antiprolifératifs dans plusieurs cancers [371,372]. D'autre part, la production et la sécrétion de lactate est également liée à la promotion de l'invasion et au développement de métastases [373,374]. Dans le GB, le lactate a également montré un effet pro-migratoire *in vitro* [375]. De manière intéressante, la mise en place de thérapies anti-angiogéniques (actuellement en 2^{ème} ligne pour le traitement du GB) stimule l'expression de LDHA dans des modèles *in vivo* chez la souris mais également chez le patient [376]. Cependant, malgré la validation de dérégulations métaboliques dans le GB [123] et la place centrale des LDHs dans la régulation métabolique, peu d'études ont étudié l'implication directe des LDHs (A et B) dans la progression du GB et leur éventuel potentiel thérapeutique.

En utilisant deux modèles de cellules type-souche dérivées de GB de patients, ces travaux mettent en lumière le rôle central du lactate et des LDHs dans l'organisation métabolique soutenant la progression du GB. Ce projet illustre une partie des mécanismes de plasticité métabolique mises en place par les cellules de GB pour soutenir leur développement, et trace les premières ébauches de l'étude des adaptations métaboliques initiées par le GB en réponse à la thérapie.

A. Expression différentielle des isoformes LDHA et LDHB dans des zones tumorales spécifiques

En se basant sur un modèle de cellules de GB type-souche dérivées de patients (cellules P3), l'analyse de coupes de sphéroïdes invasifs a montré un profil d'expression spécifique des isoformes LDHA et LDHB. Sur des coupes coronales de ces sphéroïdes inclus en matrice de collagène, on peut apprécier une expression préférentielle de LDHA au centre du sphéroïde, corrélée à des zones hypoxiques, tandis que LDHB est très exprimé sur les bordures invasives. De manière intéressante, un fort marquage LDHA est également observé ponctuellement sur quelques cellules invasives (invasion *single-cell*) (*voir Annexe II*).

Cette expression locorégionale est retrouvée *in vivo* sur des coupes de cerveaux de souris ayant subi une implantation orthotopique de nos cellules P3. L'analyse immunohistochimique a en effet révélé une expression de LDHA dans le centre de la masse tumorale, à nouveau corrélée à une zone très peu oxygénée et colocalisée avec des marqueurs typiques de

l'hypoxie tels que CAIX (anhydrase carbonique IX). LDHB est, en contraste, spécifiquement exprimé dans la zone périphérique de la tumeur et dans le front cellulaire invasif envahissant à distance de la tumeur le long des corps calleux (*Figure 28 A*).

L'analyse de l'expression de LDHA, LDHB et CAIX sur des données de transcriptomique spatiale générées à partir d'échantillons tumoraux de patients a confirmé ce pattern d'expression (*Figure 28 B-C*).

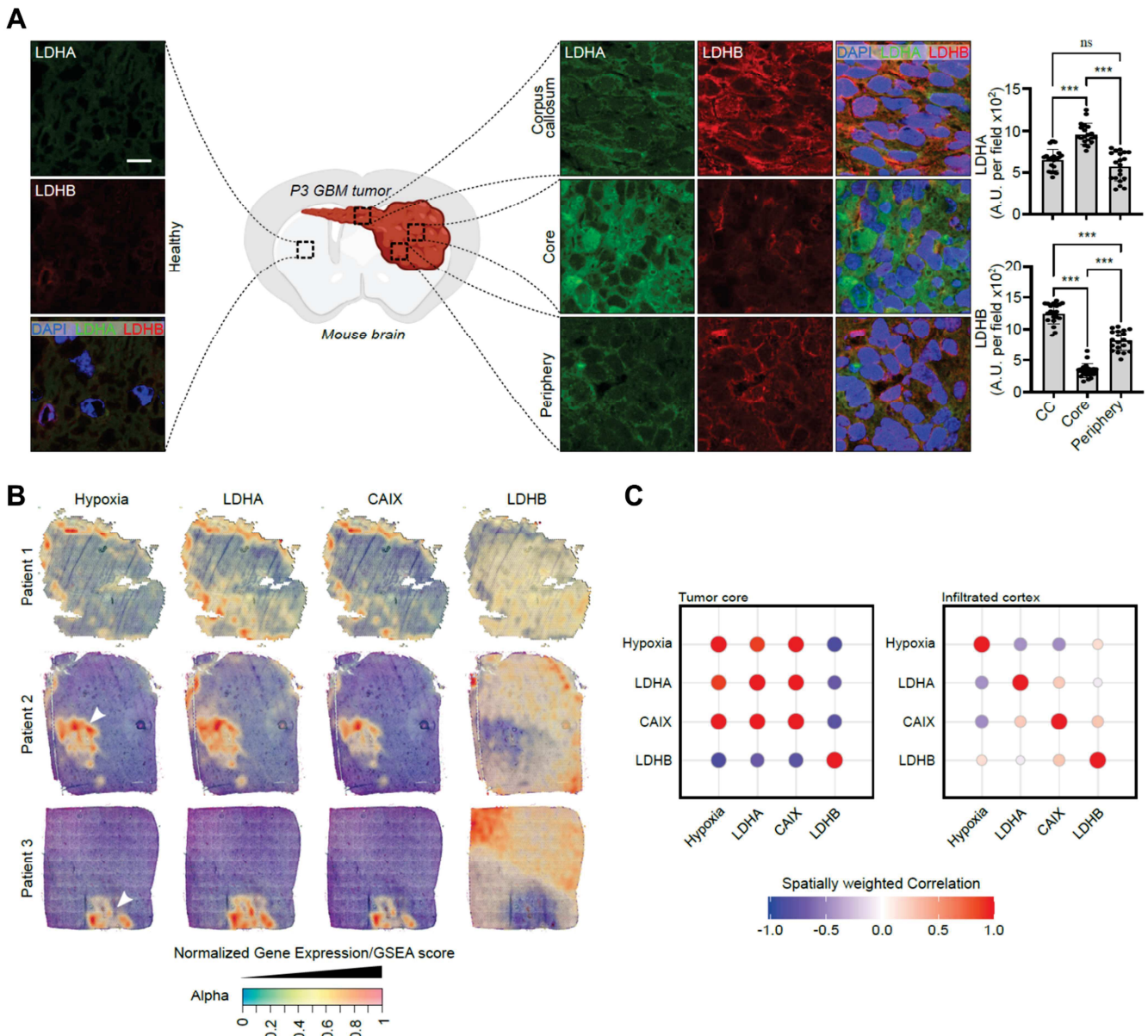


Figure 28 : Expression locorégionale des LDHs dans le GB.

A. Coupe coronale de tumeur P3 envahissant un cerveau murin. Immunomarquage DAPI (bleu), LDHA (vert), LDHB (rouge) et correspondantes quantifications dans les zones tumorales centrale (core), périphérique ou invasive le long des corps calleux (corpus callosum / CC). **B-C.** Expression génique spatiale de LDHA, LDHB, CAIX et d'une signature génique hypoxique sur des échantillons de tumeurs de patients et corrélation spatiale de ces marqueurs en fonction de leur localisation (centre de la tumeur versus zone invasive).

B. Le lactate est un moteur de la progression du GB

L'exposition des cellules P3 à de faibles niveaux d'oxygène comme c'est le cas dans l'environnement cérébral (environ 3% d'O₂), ou à d'encore plus faibles niveaux d'O₂ retrouvés par exemple dans le centre tumoral (jusqu'à 0,1% d'O₂), stimule l'expression de l'isoforme LDHA ainsi que la production de lactate. LDHB, par contre, n'est pas régulé par l'hypoxie.

Le lactate, à concentration non cytotoxique de 20 mM, réduit sensiblement la croissance des sphéroïdes (*Fig. 29 A*). Lorsqu'il est ajouté au milieu de culture et dès la concentration de 10mM, le lactate impacte également l'invasion mais cette fois à la hausse, effet qui augmente proportionnellement à la concentration de lactate (*Fig. 29 B*). Cet effet pro-invasif est conservé lorsque le glucose est retiré du milieu, prouvant un effet spécifique du lactate. Ceci est également confirmé par un test avec de l'HCl, excluant un effet acide. Par contre, l'effet pro-invasif du lactate est aboli par l'ajout de roténone, un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, suggérant un effet mitochondrial du lactate (*Fig. 29 C*).

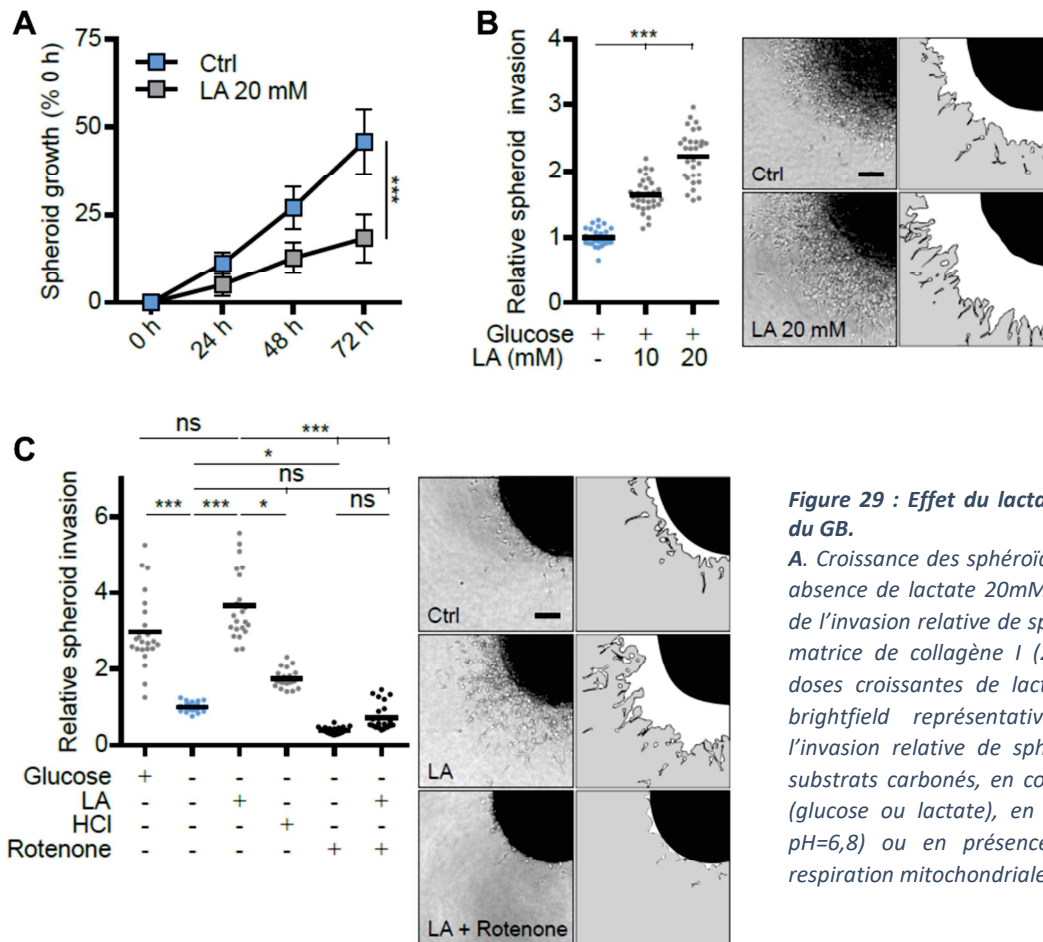


Figure 29 : Effet du lactate sur la progression du GB.

A. Croissance des sphéroïdes P3 en présence ou absence de lactate 20mM. **B.** (gauche) Analyse de l'invasion relative de sphéroïdes P3 dans une matrice de collagène I (24h), en présence de doses croissantes de lactate ; (droite) Images brightfield représentatives. **C.** Analyse de l'invasion relative de sphéroïdes P3 privés de substrats carbonés, en condition monosubstrat (glucose ou lactate), en condition acide (HCl, pH=6,8) ou en présence d'un inhibiteur de respiration mitochondriale (roténone).

En effet, la détection du flux respiratoire mitochondrial par respirométrie à haute résolution montre la même consommation d'O₂ lorsqu'on complémente les cellules P3 avec du lactate seul, du glucose seul, ou dans un milieu complet (glucose, pyruvate) (Fig. 30 A). Ces résultats sont appuyés par des expériences de traçage métabolique au carbone ¹³C : les cellules P3 préalablement privées de glucose sont infusées avec du lactate [¹³C], et la détection des sous-produits montre une production de citrate, α-cétoglutarate, et malate (intermédiaires du cycle de Krebs) ainsi que d'acides aminés (alanine, glutamate et glutamine) (Fig. 30 B).

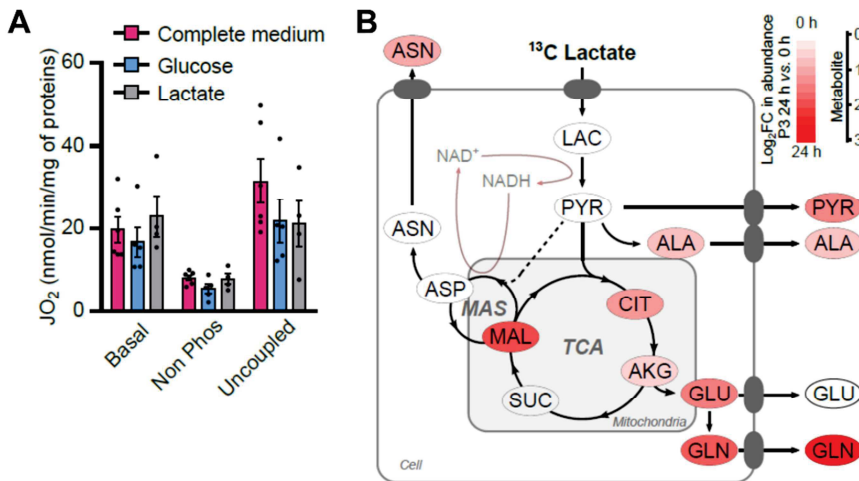


Figure 30 : Effet du lactate sur la progression du GB (suite).

A. Analyse du flux respiratoire cellulaire des cellules P3 par respirométrie haute résolution (Oroboros) : représentation de la consommation d'O₂ dans le milieu de culture classique (complete medium : glucose + pyruvate) ou en milieu complétement par seulement du glucose 10mM ou du lactate 20mM.

B. Représentation graphique des modulations de la concentration en métabolites après infusion des cellules P3, préalablement privées de substrats carbonés, avec du lactate [¹³C].

Le lactate est donc utilisé par les cellules de GB comme substrat carboné à part entière, au même titre que le glucose. Il approvisionne directement la mitochondrie, activant le métabolisme énergétique mitochondrial via le cycle de Krebs. Parallèlement, le lactate promeut les capacités d'invasion du GB, qui sont particulièrement énergivores.

C. Le blocage des LDHs et de la production de lactate altère la progression du GB

1. Suppression génétique des isoformes LDHA et LDHB

L'expression de LDHA, LDHB ou des deux conjointement a été abolie dans les cellules P3 grâce à la technologie CRISPR-Cas9. Le *knockout* (KO) de chaque isoforme a été validé par Western Blot dans les cellules sgCont (présence des deux isoformes), sgLDHA (KO de l'isoforme LDHA), sgLDHB (KO de l'isoforme LDHB) et sgLDHA/B (KO des deux isoformes). En comparaison avec les cellules P3 contrôles, la production de lactate est pratiquement inchangée par un KO simple de l'une des isoformes, seul un double KO de LDHA/B permet d'abolir cette synthèse de lactate (Fig. 31).

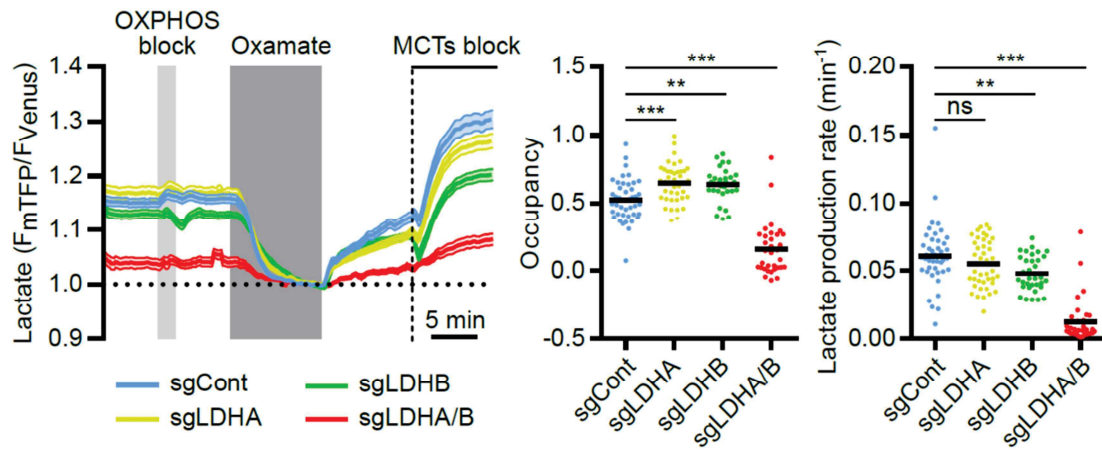


Figure 31 : Modulation du niveau de lactate intracellulaire dans les cellules P3 sgCont, sgLDHA, sgLDHB et sgLDHA/B.

Détection du lactate intracellulaire dans les cellules P3 par un biosenseur FRET. Le niveau intracellulaire basal et la production de lactate sont quantifiés dans chaque lignée cellulaire grâce à la modulation de l'utilisation, de la production ou du transport de lactate, respectivement et séquentiellement par blocage OXPHOS au NaN₃, blocage de l'activité LDH à l'oxamate, puis blocage des MCTs (AR-C1558585 + diclofenac).

Cette suppression génétique des LDH a montré un impact direct sur les paramètres de progression du GB. En effet, en conditions hypoxiques, le KO de LDHA, mais pas de LDHB, entraîne une diminution franche de la prolifération cellulaire, imagée par la croissance des sphéroïdes, tandis que le double KO LDHA/B stoppe complètement cette croissance et corrèle avec une importante mortalité cellulaire (Fig. 32 A). D'autre part, les capacités d'invasion des sphéroïdes P3 sont étonnamment stimulées par un KO de LDHB, mais décroissent modérément avec le KO de LDHA et drastiquement avec le double KO LDHA/B (Fig. 32 B).

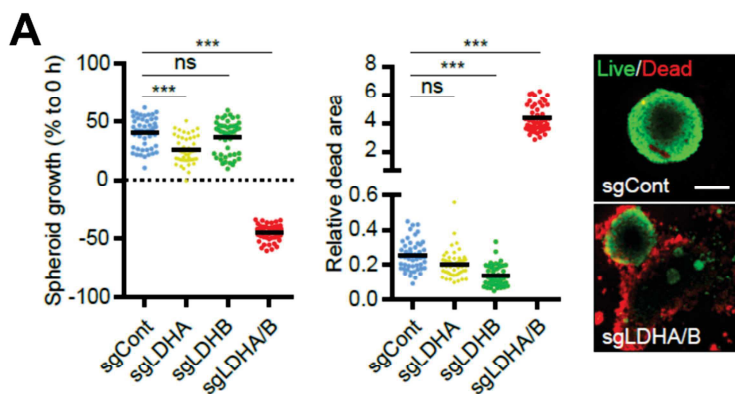
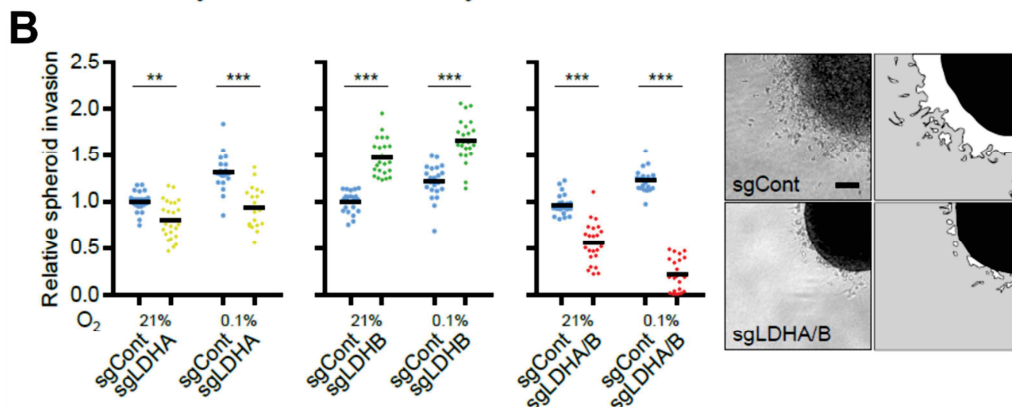


Figure 32 : Impact des différents KO LDH sur les capacités prolifératives et invasives des cellules P3 de GB.

A. (gauche) Analyse de la croissance des sphéroïdes P3 sur une semaine et comparaison entre les différents KO LDH. (droite) Viabilité des sphéroïdes après une semaine évaluée par marquage calcéine (vert) / éthidium homodimère (rouge). B. Invasion relative de sphéroïdes P3 en matrice de collagène I, analyse à 24h.



Afin de confirmer ces résultats *in vivo*, des sphéroïdes des différents KO LDH ont été implantés de manière stéréotaxique chez la souris immunodéficiente. L'analyse du développement des tumeurs de GB par exploration histopathologique n'a pas révélé de différences de croissance tumorale entre les P3 contrôles et les simples KO de LDHA ou LDHB. Par contre, les tumeurs P3 sgLDHA/B sont significativement plus petites que les contrôles et moins invasives, résultat cohérent avec l'augmentation observée de la survie des souris sgLDHA/B (Fig. 33).

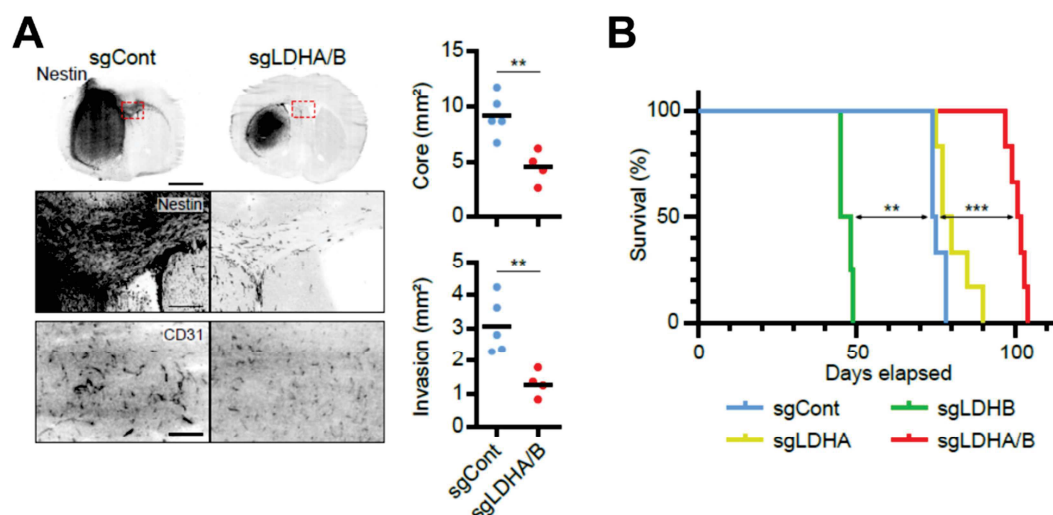


Figure 33 : Impact *in vivo* de la suppression génétique des LDHs.

A. Immunohistochimie sur coupes de cerveaux murins implantés avec des cellules P3 sgCont ou sgLDHA/B. Marquage Nestin (haut et milieu) et CD31 (bas). Quantification correspondante de la taille tumorale (masse tumorale ou core, et zone invasive).
B. Courbe de survie des souris implantées avec les cellules P3 contrôles (bleu), KO LDHA (jaune), LDHB (vert) ou les deux (rouge).

2. Blocage pharmacologique des LDHs, vers le repositionnement thérapeutique du stiripentol

Le blocage pharmacologique des LDHs grâce au stiripentol, un antiépileptique commercialisé ayant prouvé une bonne pénétration cérébrale et un pouvoir inhibiteur des LDHs chez la souris [377], a également montré des effets encourageants sur la progression du GB. *In vitro*, le stiripentol décroît d'environ 50% la production et la concentration intracellulaire de lactate dans les cellules P3 (Fig. 34 B). Étonnamment, il réduit également l'utilisation du lactate (préalablement rétroconverti en pyruvate) dans la mitochondrie, comme imagé en Figure 34 C par la baisse du flux respiratoire mitochondrial.

En conséquence, le blocage des LDH par le stiripentol induit une nette diminution de la croissance et de l'invasion des sphéroïdes (Fig. 34 D-E), cohérente avec l'effet observé dans les cellules doublement KO sgLDHA/B. Cet effet anti-cancéreux est confirmé *in vivo* par une augmentation de la survie des souris implantées avec des cellules P3 traitées avec du stiripentol (150 mg/kg, 3 injections/semaine) (Fig. 34 F).

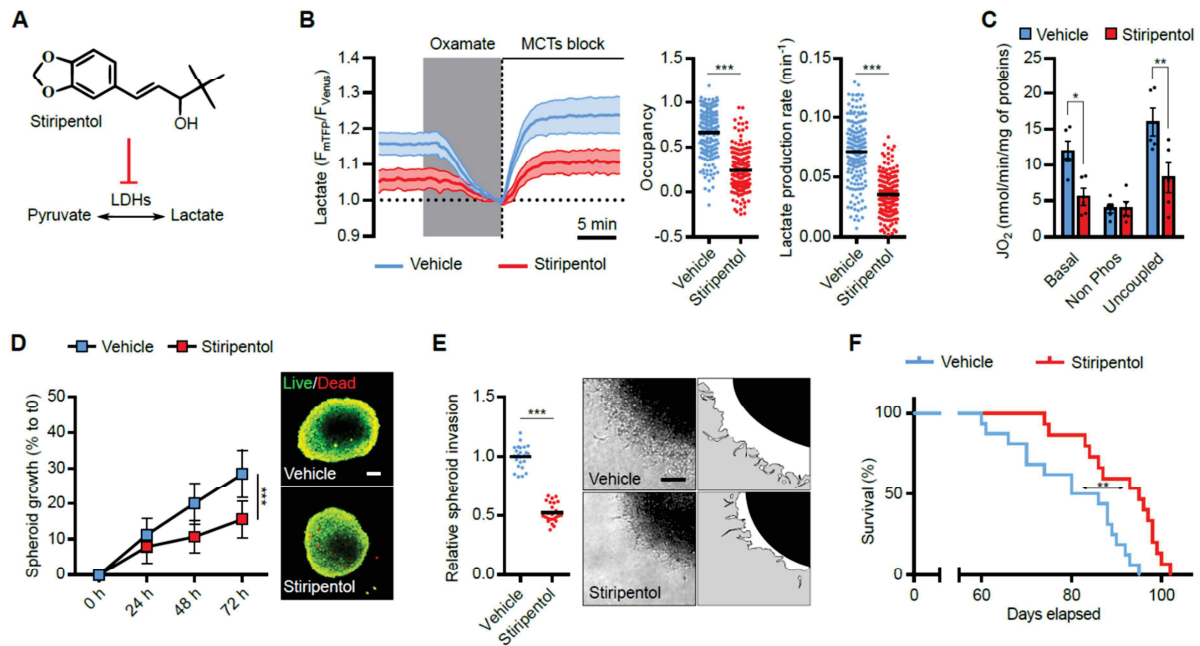


Figure 34 : Effet du stiripentol sur la progression du GB.

A. Le stiripentol inhibe l'activité des LDH. **B.** Modulation du niveau intracellulaire de lactate dans les cellules P3 traitées avec 500 μ M de stiripentol, évaluée par biosenseur FRET (Laconic). **C.** Respiration des cellules P3 sous l'influence du stiripentol (oxygraphie haute résolution). **D.** Analyse de la croissance et de la viabilité de sphéroïdes P3, traités ou non au stiripentol. **E.** Invasion relative de sphéroïdes P3, traités ou non au stiripentol, dans une matrice de collagène I. **F.** Courbes de survie de souris implantées avec les cellules P3, traitées avec du stiripentol 150 mg/kg (rouge) ou son solvant (bleu).

D. Le blocage des LDHs induit une réorganisation métabolique mitochondriale

Si le blocage génétique ou pharmacologique des LDH impacte fortement la progression du GB *in vitro* et *in vivo*, une prolifération et invasion résiduelle permet tout de même la persistance du cancer, suggérant une adaptation de ces cellules malignes.

Ainsi, afin d'étudier les modulations métaboliques mises en place après le blocage de l'activité des LDHs, en conditions hypoxiques cohérentes avec l'environnement tumoral, une infusion au glucose [13 C] des cellules P3 sgCont et sgLDHA/B a été réalisée. L'analyse de l'endo- et l'exométabolome de ces cellules a ensuite été intégrée avec une approche transcriptomique. Cette méthode nous a permis d'obtenir une vision plus précise, appuyée par des variations couplées de paires métabolites/transcrits, et plus globale, grâce à l'intégration à la fois des métabolites et des enzymes, des flux métaboliques dérégulés dans les cellules double KO LDHA/B. En conditions hypoxiques, la plupart des métabolites de la glycolyse, mais surtout des voies oxydatives mitochondriales, sont accumulés dans les cellules sgLDHA/B en comparaison avec les cellules contrôles (Fig. 35). Conjointement, les transcrits des gènes glycolytiques dans les cellules sgLDHA/B sont majoritairement sur-régulés par rapport aux cellules contrôle, tout comme ceux codant pour les enzymes du cycle de Krebs (Fig. 35). Ces résultats illustrent, en conditions hypoxiques, une franche dérégulation du métabolisme énergétique dans les cellules KO pour LDHA et LDHB par rapport aux cellules contrôle.

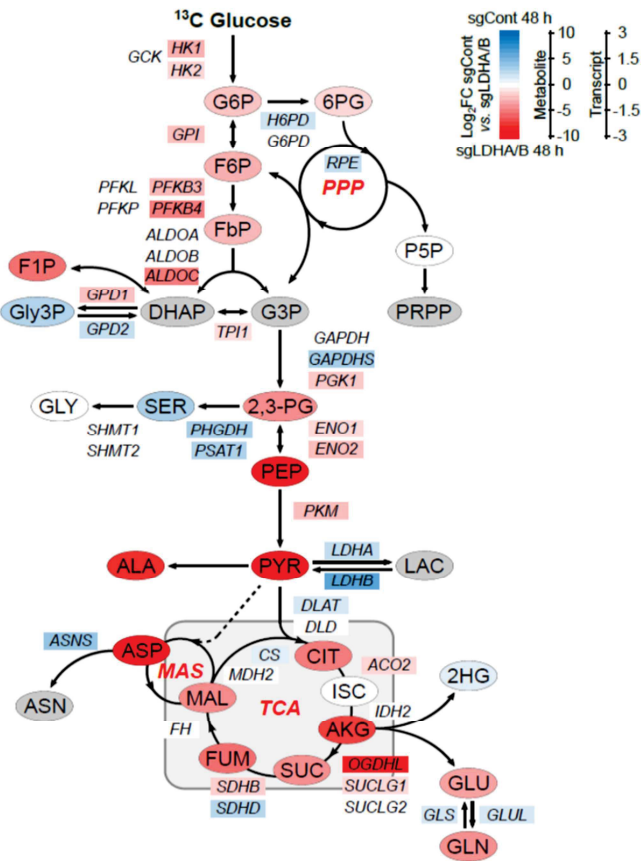


Figure 35 : Dérégulations métaboliques associées à l'abolition des LDHs.
Modulations métaboliques dans les cellules sgLDHA/B infusées avec du glucose [13C] pendant 48h à 0.1% d'O₂. Les métabolites sont représentés par des ovales, les rectangles imagent les transcrits des enzymes métaboliques. L'intensité de couleur correspond à la différence entre sgCont et sgLDHA/B exprimée en log₂ fold change.

Plus précisément, un focus sur le compartiment mitochondrial a révélé une réorganisation de la chaîne respiratoire mitochondriale, avec une augmentation de la quantité protéique des complexes I à IV de la chaîne respiratoire dans les cellules sgLDHA/B (Fig. 36 A). Ce résultat est corrélé à une augmentation de la masse mitochondriale totale, une altération de l'aspect du réseau mitochondrial ainsi qu'une augmentation de la capacité maximale respiratoire (Fig. 36 B-C).

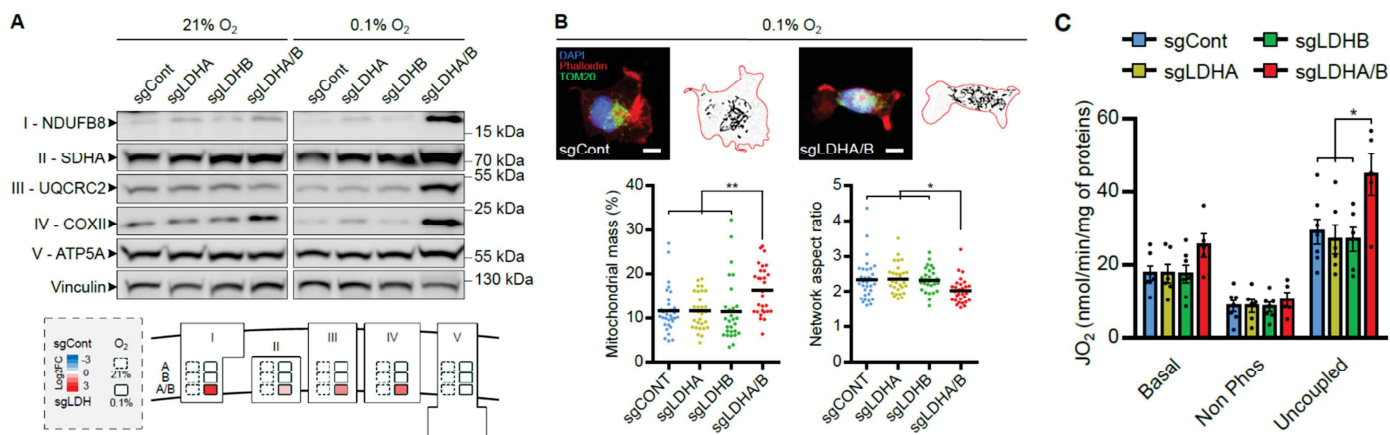


Figure 36 : Adaptations mitochondriales induites par le KO de LDHA/B.

A. Analyse Western Blot des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les cellules P3 KO LDHA, B ou A/B et sous différentes concentrations d'O₂. Les différentes sous-unités indiquées correspondent respectivement aux complexes I (NDUF8), II (SDHA), III (UQCRC2), IV (COXII) et V (ATP5A). **B.** Marquage immunofluorescent de cellules P3 sgCont ou sgLDHA/B (Tom20 en vert, Phalloïdine en rouge, DAPI en bleu) et correspondantes quantifications de la masse mitochondriale totale ou de l'aspect ratio du réseau mitochondrial (ratio du plus long axe sur le plus court) basées sur le marquage Tom20. **C.** Respiration mitochondriale analysée par oxygénométrie à haute résolution.

II. ÉTUDE DE L'IMPLICATION DES PYRUVATE DÉSHYDROGÉNASE KINASES DANS LA PROGRESSION DES GB

En s'intéressant à l'hétérogénéité métabolique intra-tumorale des GB, et plus spécifiquement aux différences métaboliques entre la population cellulaire centrale et invasive, d'autres protagonistes que les LDHs ont également attiré notre attention. Parmi ceux-ci, l'étude des pyruvate déshydrogénase kinases (PDHKs) a montré leur implication dans la régulation métabolique des GB et donc révélé un potentiel thérapeutique intéressant. Cette étude a donné lieu à une publication en premier auteur dans le journal *Cancers* au cours de ma 2^{ème} année de thèse (2022), intitulée « Refining the role of Pyruvate Dehydrogenase Kinases in glioblastoma development ».

Contexte de l'étude

Dans le contexte de dérégulation métabolique associée au développement du GB, de plus en plus d'études mettent en lumière l'implication de différents acteurs. En effet, si le complexe LDH est un régulateur clé du métabolisme glycolytique, un autre complexe enzymatique, le complexe de la Pyruvate déshydrogénase (PDH), montre un rôle central dans la régulation métabolique, puisqu'il se place au carrefour entre la fermentation lactique cytosolique et les voies oxydatives mitochondriales. Ce complexe PDH mitochondrial est finement régulé par les PDHKs qui, en bloquant l'activité de la PDH, empêchent la conversion du pyruvate en acétyl-coA et la mise en route du cycle de Krebs. Les PDHKs inhibent alors indirectement l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie, redirigeant son utilisation vers les LDH et la fermentation lactique. Ainsi, ils se placent comme des acteurs clés de la mise en place de l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses, et sont par conséquent retrouvés surexprimés dans différents cancers [378,379]. Le ciblage des PDHKs offre donc une piste thérapeutique intéressante dans le GB, vers la déstabilisation de la glycolyse aérobie (ou effet Warburg) soutenant la prolifération des cellules tumorales.






Principaux résultats :

- Les isoformes PDHK1 et PDHK2 montrent des profils d'expression différents en fonction des zones tumorales du GB : PDHK1 est exprimé préférentiellement dans le centre tumoral, régulé par l'hypoxie, tandis que PDHK2 est plus exprimé dans la zone invasive de la tumeur.

- L'abolition génétique ou pharmacologique des PDHKs impacte le métabolisme du lactate dans les cellules de GB.
- L'inhibition pharmacologique des PDHKs par le dichloroacétate (DCA) altère drastiquement les capacités prolifératives et invasives des cellules de GB, mais seulement *in vitro*. Cet effet semble lié à des modifications mitochondriales fonctionnelles et morphologiques.
- Une suppression génétique de PDHK1 ou PDHK2 ébranle la progression du GB *in vitro* et *in vivo*. De manière intéressante, un KO de PDHK2 supprime complètement l'invasion controlatérale des cellules de GB *in vivo*.

Article

Refining the Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinases in Glioblastoma Development

Claire M. Larrieu ¹, Simon Storevik ², Joris Guyon ^{3,4}, Antonio C. Pagano Zottola ¹, Cyrielle L. Bouchez ¹, Marie-Alix Derieppe ⁵, Tuan Zea Tan ^{6,7}, Hrvoje Miletic ^{2,8}, James Lorens ^{2,9}, Karl Johan Tronstad ², Thomas Daubon ^{1,*,†} and Gro Vatne Røsland ^{1,2,9,†}

- ¹ IBGC, UMR5095, CNRS, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; claire.larrieu@ibgc.cnrs.fr (C.M.L.); antonio.paganozottola@ibgc.cnrs.fr (A.C.P.Z.); cyrielle.bouchez@ibgc.cnrs.fr (C.L.B.); gro.rosland@uib.no (G.V.R.)
- ² Department of Biomedicine, University of Bergen, 5009 Bergen, Norway; simon.storevik@gmail.com (S.S.); hrvoje.miletic@uib.no (H.M.); james.lorens@uib.no (J.L.); karl.tronstad@uib.no (K.J.T.)
- ³ Department of Medical Pharmacology, Bordeaux Hospital, F-33000 Bordeaux, France; joris.guyon@u-bordeaux.fr
- ⁴ BPH, U1219 INSERM, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France
- ⁵ Animal Facility, Campus Talence, University of Bordeaux, F-33600 Pessac, France; marie-alix.derieppe@u-bordeaux.fr
- ⁶ Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore, Singapore 117599, Singapore; csittz@nus.edu.sg
- ⁷ Genomics and Data Analytics Core (GeDaC), Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore, Singapore 117599, Singapore
- ⁸ Department of Pathology, Haukeland University Hospital, 5009 Bergen, Norway
- ⁹ Department of Oncology and Medical Physics, Haukeland University Hospital, 5009 Bergen, Norway
- * Correspondence: thomas.daubon@u-bordeaux.fr
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Larrieu, C.M.; Storevik, S.; Guyon, J.; Pagano Zottola, A.C.; Bouchez, C.L.; Derieppe, M.-A.; Tan, T.Z.; Miletic, H.; Lorens, J.; Tronstad, K.J.; et al. Refining the Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinases in Glioblastoma Development. *Cancers* **2022**, *14*, 3769. <https://doi.org/10.3390/cancers14153769>

Received: 1 June 2022

Accepted: 25 July 2022

Published: 2 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Finding new treatment strategies is an urgent need in cancer medicine, especially for the fast-growing and aggressive primary brain tumor glioblastoma (GB). Patients with GB face a median survival of about 15 months, despite tumor resection and radio-chemotherapy. In this study, we targeted cancer cell metabolism, specifically the pyruvate dehydrogenase (PDH) regulators PDH kinases (PDHK), to disturb GB progression. Indeed, PDHK1 and PDHK2 were found to be highly expressed in GB tissue cohorts and presented different expression patterns in distinct areas of the tumor. We used patient-derived stem-like cells to knockout PDHK1 or PDHK2, and dichloroacetate (DCA) to inhibit all PDHK activity. DCA showed massive in vitro effects on proliferation and invasion but no in vivo benefit as monotherapy when injected into GB-bearing mice. Finally, mice implanted with PDHK KO cells presented a higher survival rate than the control group; this effect was enhanced by performing cranial irradiation.

Abstract: Glioblastoma (GB) are the most frequent brain cancers. Aggressive growth and limited treatment options induce a median survival of 12–15 months. In addition to highly proliferative and invasive properties, GB cells show cancer-associated metabolic characteristics such as increased aerobic glycolysis. Pyruvate dehydrogenase (PDH) is a key enzyme complex at the crossroads between lactic fermentation and oxidative pathways, finely regulated by PDH kinases (PDHKs). PDHKs are often overexpressed in cancer cells to facilitate high glycolytic flux. We hypothesized that targeting PDHKs, by disturbing cancer metabolic homeostasis, would alter GB progression and render cells vulnerable to additional cancer treatment. Using patient databases, distinct expression patterns of PDHK1 and PDHK2 in GB tissues were obvious. To disturb protumoral glycolysis, we modulated PDH activity through the genetic or pharmacological inhibition of PDHK in patient-derived stem-like spheroids. Striking effects of PDHKs inhibition using dichloroacetate were observed in vitro on cell morphology and metabolism, resulting in increased intracellular ROS levels and decreased proliferation and invasion. In vivo findings confirmed a reduction in tumor size and better survival of mice implanted with PDHK1 and PDHK2 knockout cells. Adding a radiotherapeutic protocol further resulted in a reduction in tumor size and improved mouse survival in our model.

Keywords: pyruvate dehydrogenase kinases; DCA; glioblastoma; invasion; lactate

1. Introduction

Reprogramming energy metabolism has become a recognized hallmark of cancer [1]; therefore, therapy targeting metabolic activity is emerging. Metabolic adaptation during tumor growth is crucial to avoid cell exhaustion inducing apoptosis or cell death. Elevated glucose uptake and increased glycolytic activity, also in the presence of oxygen, are observed in most types of cancers and are considered a key characteristic of cancer cells [2]. In cells with high glycolytic flux, pyruvate is primarily fermented into lactate and NAD⁺ by the enzyme lactate dehydrogenase (LDH). Lactate is then transported outside the cells by the monocarboxylate transporters (MCTs/SLC16), resulting in a decrease in the pH of the tumor microenvironment. To counteract this phenomenon, lactate is re-taken up by the MCTs or the cellular buffering system is upregulated, such as carbonic anhydrases (CAs) [3,4]. The LDH enzyme is more efficient as an NAD⁺ regenerator when compared to respiratory chain complex I, partly explaining why glycolysis and fermentation are elevated in cancer cells. Indeed, NAD⁺(re)generation is necessary for the NAD⁺/NADH redox balance and for nucleotide and amino acid biosynthesis, thus generating a positive feedback loop and maintaining enhanced glycolytic activity in highly proliferative cells [5].

Pyruvate dehydrogenase kinases (PDHKs) are a family of mitochondrial enzymes which are in abundance in cells with high glycolytic activity, including most cancer cells, thus representing a therapeutic target [6]. PDHKs selectively inhibit pyruvate dehydrogenase complex (PDH), a key metabolic checkpoint between glycolytic and oxidative pathways, preventing pyruvate conversion into acetyl-coA, its entrance into mitochondria and thus redirecting pyruvate towards lactic fermentation. As a therapeutic strategy, disrupting pyruvate conversion to lactate by inhibiting PDHKs has been tested both in vitro for several cancers including non-small cell lung cancer model and glioblastoma (GB) differentiated cells (U87, U251, GL261) [7–9], as well as in preclinical models and clinical trials, with some promising results. The xenobiotic pyruvate analog dichloroacetate (DCA) has been broadly described as a PDHK inhibitor [10–12]. Safety-approved in patients from clinical trials, DCA is currently used in the treatment of acute and chronic lactic acidosis, inborn errors of mitochondrial metabolism, and diabetes [13].

In the present study, we showed that PDHK1 expression, and not PDHK2, was increased in high-grade glioma (HGG) tissues when compared with control or low-grade glioma (LGG) tissues, in two brain cancer cohorts. PDHK1 was also correlated to increased levels of glycolysis genes. PDHK1 and PDHK2 were found to be differentially expressed in specific GB areas, PDHK1 in hypoxic areas and PDHK2 in the invasive margin. Glycolytic activity was partially impaired in hypoxic-PDHK2 knockout (KO) and DCA-treated cells, although only DCA improved maximal cell respiration. We found that PDHK1 and PDHK2 KO impacted spheroid growth. PDHK2 KO additionally reduced cell invasion from spheroids. DCA also massively reduced spheroid growth and invasion, but surprisingly shortened mouse survival in an orthotopic GB xenograft model. Finally, increased mouse survival was observed when PDHK1 or PDHK2 KO GB stem-like cells were implanted, and cranial irradiation further improved mouse survival.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Issues

Male RAGγ2C^{-/-} mice were housed and treated in the animal facility of Bordeaux University. All animal procedures were performed according to the institutional guidelines and approved by the local ethics committee (agreement number: A5522). Patients gave their consent before tissue analysis according to the clinical guidelines. Informed written consent was obtained from all subjects at the Haukeland Hospital, Bergen, Norway.

2.2. Expression and Correlation Analysis

Correlations between gene expression levels of PDHK1 and PDHK2 and genes involved in glucose metabolism were analyzed in RNA sequencing cohort database from glioma tissue obtained from the cancer genome association (TCGA, GBMLGG cohort, $n = 696$), normal brain tissue obtained from TCGA ($n = 5$) and RNA sequencing data obtained from the Ivy Glioblastoma Atlas Project (IVYGAP) cohort consisting of high-grade glioma samples ($n = 122$) [14]. Specific areas of HGG tumors were distinguished based on IVYGAP microdissection analysis: cellular tumor corresponding to the tumor mass (ratio of tumor cells to normal cells = 100–500/1); infiltrating tumor representing the intermediate zone between the outermost boundary of the tumor and the cellular tumor (ratio of tumor cells to normal cells about 10–20/100); microvascular proliferation for the area surrounding two or more interconnected blood vessels (generally found in the core of tumors); and pseudopalisading cells around necrosis for a specific zone surrounding tumor core necrosis (tumor cells lining up in rows 10–30 nuclei wide at a higher density than cellular tumor). The expression level data are presented as FPKM log₂ values. For the correlation analysis, values are displayed as Spearman's correlation coefficient test Rho values.

2.3. Cell Culture

P3 cells were previously generated from the low passage of patient-derived xenografts and were stabilized as a stem-like cell line (characterized by IDH1 wt and MGMT unmethylated promoter [15]). Patient-derived glioblastoma cells P3 were cultured in neurobasal medium (NBM) supplemented with B-27 serum-free supplement (ThermoFisher Scientific), heparin (100 U/ μ L), penicillin/streptomycin (1000 U/mL) and basic FGF-2 20 ng/mL, in a 37 °C and 5% CO₂ incubator. Parental cells were defined as P3 wt in the text. Stable cell lines were generated by lentiviral infection. To generate lentiviral particles, HEK293T cells were transfected with the lentiCRISPR v2 vector with psPAX2 (packaging construct), pMD2.G (viral envelope) and sgRNA targeting either PDHK1 or PDHK2. Empty lentiviral plasmids were used as controls for transducing and generating P3 sgCont cells. PDHK1 (fwd. 5' CACCGGTCATTCCCACAATGGCCCA 3', rev 3' CCAGTAAGGGTGT-TACCGGGTCAA 5'). PDHK2 fwd. 5' CACCGGCAGTTTCTGGACTTCGGTA 3', rev 3' CCGTCAAAGACCTGAAGCCATCAA 5'). Culture medium was replaced by Opti-MEM with 20 mM HEPES 16 h post-transfection. Two to three days afterwards, the supernatant was collected, filtered (0.22 μ m), supplemented with 8 μ g/mL polybrene and finally used to infect P3 cells. The infected cells were selected using blasticidin (10 μ g/mL). PDHK1 or PDHK2 deletion was further analyzed by Western blot. To evaluate the impact of different oxygen concentrations, cells were incubated either at 21% O₂ (referred to as "normoxic conditions") or 0.1% O₂ to mimic hypoxia (hypoxia incubator Xvivo System model X1; Biospherix Ltd., Parish, NY, USA). When specified, DCA treatment (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) was performed on our cells at a final concentration of 25 mM (the dose was selected based on the literature [7], and previous dose–response analysis on our P3 cell model).

2.4. Western Blotting

Cells were counted, seeded in a 6-well plate and exposed to different experimental conditions (treatments and/or different oxygen levels) for 48 to 72 h [16,17]. Cells were then washed with PBS and lysed in RIPA buffer (NaCl 150 mM, tris-base 50 mM, NP40 1% *w/v*, SDS 0.1% *w/v*, sodium deoxycholate 0.5% *w/v* and EDTA 1 mM pH 8) containing proteases and phosphatases inhibitors. Protein concentrations were determined using the BCA Protein assay kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cell lysates were mixed with Laemmli buffer (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS *w/v*, 4% glycerol *w/v*, 9% thioglycerol *w/v*, 5% bromophenol blue *w/v*) and loaded on bis-tris acrylamide gels, before being transferred on a nitrocellulose membrane or PVDF (Amersham Biosciences GE Healthcare, Chicago, IL, USA). To perform immunodetection, membranes were blocked with 5% (*w/v*) milk diluted in Tris Buffer Saline with Tween 0.05% (TBS-T; pH 8), incubated

with primary antibodies anti-PDHK1 (ab207450; Abcam, Cambridge, UK), anti-PDHK2 (PA5-35376; Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), phospho-PDH (ab92696; Abcam, Cambridge, UK), anti-vinculin (V9131; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and HRP-coupled anti-mouse/rabbit secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Ely, UK) were used. Immunodetection was performed using Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and Amersham ImageQuant 800 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Fiji software was used to determine and analyze densitometric profiles (version 1.53q; US National Health Institute, USA [18]). Full scans are included as supplementary material. Each Western blot experiment was repeated at least 3 times under the same conditions in order to provide a representative protein expression profile. Original Western Blot figures shown in File S1.

2.5. Immunofluorescence Experiments

To plate P3 cells for immunolabeling, coverslips were first coated with Matrigel (Corning™ Matrigel™ growth factor reduced membrane matrix, 356231; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) at a concentration of 0.2 mg/mL. P3 SgCont, sgPDHK1 or sgPDHK2 cells were plated on the coated coverslips and incubated for 24 to 72 h, depending on the conditions tested (25 mM DCA treatment and/or hypoxia). Cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 min and washed again with PBS. Fixed cells were permeabilized with 0.1% Triton x-100 (diluted in PBS) for 5 min and washed 3 times with PBS. After 10 min incubation in blocking solution (1% bovine serum albumin and 2% fetal bovine serum in PBS), samples were incubated with primary antibodies (anti-Tom20, sc-17764; SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) in blocking buffer for 1 h, washed 3 times with PBS and then incubated for 30 min with blocking buffer supplemented with appropriate secondary fluorescent antibodies (Goat anti-Rabbit IgG (H + L), Alexa Fluor Plus 555, 15636746, and Goat anti-Mouse IgG (H + L) Alexa Fluor Plus 488, 15626746; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), Hoechst 33342 (H3570; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), and/or phalloidin rhodamine (R415; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). After PBS washes, samples were mounted using Prolong Gold antifade reagent (P36930; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Image processing of cells and mitochondria was performed with a homemade macro in Fiji software, either from [17] or adapted from [19].

2.6. Seahorse Oxygen Consumption and Extracellular Acidification Measurements

The Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used to measure the oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR). The cell number and concentration of CCCP concentrations were titrated before running the assay. All compounds were obtained from Sigma-Aldrich, France, if not otherwise stated. The mitostress assay medium was D5030 supplemented with 10 mM glucose, 2 mM pyruvate and 4 mM glutamine at pH 7.4 (+/− 0.05). Throughout the mitostress experiments, we used 3 μM oligomycin (added in port A), 2.5 μM CCCP (added in port B), 1 μM rotenone (added in port C) and 1 μM antimycin A (added in port D). Data were ROX-corrected (antimycin A, non-mitochondrial respiration). Upon investigating the acute effects of DCA, 20,000 cells were plated the day before the assay in Seahorse 96-well plates. Mitostress assay medium was used during the assay. The pH of the DCA addition was carefully adjusted before performing the assay. For the real-time measurement of OCR and ECAR, ddH₂O control or 20 mM DCA was added in port A.

2.7. Oroboros Oxygen Consumption Assay

Real-time oxygen consumption of intact P3 cells (SgCont, SgPDHK1 or SgPDHK2, +/− DCA 25 mM) was also measured with an Oxygraph-2 k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). When indicated, cells were incubated with DCA at the final concentration of 25 mM for 3 days. Oxygen consumption was measured at 37 °C in cell culture medium. The oxygen consumption rate was measured under 3 different conditions: phosphorylating

state (endogenous respiratory condition), non-phosphorylating state with addition of oligomycin (50 ng/mL), and uncoupled state by the successive addition of carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP 0.5 μ M) to reach the maximal respiration. To determine the sensibility to complex I and complex II, injections of rotenone (30 nM) or atpenin A5 (AtpnA5, 20 nM) were performed, respectively [20,21]. Antimycin A (100 nM) was added at the end of each experiment to evaluate the proportion of oxygen consumption not linked to the respiratory chain.

2.8. ROS Detection Method

CellROX Oxidative Stress Reagents (CellROX Green Reagent, C10444; Life technologies, Carlsbad, CA, USA) were used to detect reactive oxygen species (ROS) on P3 spheroids. Cells (SgCont, SgPDHK1 or SgPDHK2) were first incubated for 3 days, with or without DCA treatment (25 mM). On the third day, CellROX probe was added directly to the cell medium and incubated for 30 min. Spheroids were then washed with PBS, dissociated with accutase (5 min) and resuspended again in PBS. Green fluorescence of CellROX probe, proportional to ROS production, was assessed for each condition on 10,000 events by flow cytometry (BD Accuri™ C6 Flow Cytometer; BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). Positive control (1,1-dimethylethyl hydroperoxide; CAS 75-91-2, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) was also added as an internal control for each replicate (data not shown). Analysis of flow cytometry data was performed with FlowJo software (v10.8.1; Ashland, OR, USA).

2.9. Lactate Measurements

Lactate measurement was performed as previously described [22]. In brief, P3 cells (0.5 to 10⁶ cells) were seeded in a 6-well plate with different conditions: SgCont, SgPDHK1, SgPDHK2, with or without DCA treatment (25 mM) in a final volume of 2 mL. Cells were incubated for 72 h either in a 21% or 0.1% O₂ incubator (hypoxia incubator Xvivo System model X1; BioSpherix Ltd., Parish, NY, USA). The day of the experiment, cell pellets and cellular medium were separated by centrifugation. Cellular pellets and medium were collected and separated by centrifugation. Pellets and medium were resuspended with perchloric acid 14% (PCA w/o EDTA; Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Pellets and medium were neutralized with KOMO solution (KOH 2 M, MOPS 0.5 mM in H₂O; VWR, Radnor, PA, USA). Lactate enzymatic measurement was then performed in every sample using a mix of L-Lactate oxidase enzyme (0.5 U/mL; Merck Millipore, Burlington, MA, USA), peroxidase from horseradish enzyme (HRP) 5 U/mL (77332; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and Amplex Red reagent 2.5 μ M (A12222; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a Tris-HCl buffer (50 mM in H₂O, pH 6.8 to 7).

2.10. Spheroid Experimental Assays

All the protocols used for spheroid assays were previously described by Guyon et al. [23]. Briefly, 10⁴ cells per well were seeded in cell medium supplemented with 0.4% methylcellulose in a 96-well round-bottomed plate to obtain a single spheroid after 3 days of incubation at 37 °C, 5% CO₂. For the spheroid growth assay, cell medium supplemented with DCA or vehicle was added on the top of each spheroid after the 3 days of formation. Spheroid growth was monitored for 7 days at 21% O₂ or 0.1% O₂, every 24 h or 48 h, by brightfield image acquisition with a microscope (Olympus IX81). For the spheroid invasion assay, each spheroid was washed in PBS and included in a 96-well flat-bottom plate, in 100 μ L of cold type I collagen matrix (1 mg/mL collagen type I diluted in PBS and NaOH). After complete polymerization (30 min at 37 °C), cell medium containing DCA or vehicle was added. Spheroid invasion was assessed after a 24 h incubation at 21% or 0.1% O₂.

2.11. Intracranial Implantation

To perform in vivo experiments, 5 spheroids of knockout P3 cells for PDHK1 or PDHK2 and control cell lines were stereotaxically implanted into the striatum of immunod-

efficient RAG γ 2C^{-/-} mice. Mice were housed and treated in the animal facility of Bordeaux University (“Animalerie Mutualisée Bordeaux”). The animals were anesthetized with ketamine (1.5 mg/kg) and xylazine (150 μ g/kg), a burr hole was drilled 2.2 mm to the left of the bregma and the spheroids were implanted into the dorsal striatum at 3 mm depth using a 10 μ L Hamilton syringe. An analgesic procedure was applied with the subcutaneous injection of buprenorphine (0.1 mg/kg, 10 min before and once 12 to 24 h after implantation). On day 4, the injection protocols started: P3 SgCont implanted mice were treated daily either with DCA (25 mg/kg in saline solution, ip) or saline solution (vehicle). Where indicated, animals were subjected to a radiotherapeutic protocol (3 \times 2 Gray). At the end of the experiment, animals were euthanized by cervical dislocation and brains removed for immunohistological analysis.

2.12. Immunohistological Procedures

Brains were extracted, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Sections (10 μ m) of cryopreserved brains were prepared using a cryostat (Leica, Wetzlar, Germany) and mounted on slides. For the immunolabeling processes, cryo-sections were dried at room temperature for 10 min and then fixed with 4% PFA for 15 min. Slides were washed 3 times with PBS and permeabilized with 0.1% Triton x-100 (15 min). After 3 washes with PBS, samples were blocked with 1% bovine serum albumin and 2% fetal bovine serum in PBS (blocking solution) for 30 min. Samples were then incubated overnight (4 $^{\circ}\text{C}$) with primary antibodies in blocking solution, followed by 3 washes with PBS and incubation in secondary antibodies in blocking solution for 1 h 30. Human anti-nestin (MA1-110; Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) primary antibody was used to detect patient-derived tumor cells and Hoechst and/or rhodamine phalloidin (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) staining to identify nucleus and/or cytoskeleton. Samples were washed 3 times with PBS and mounted using Prolong Gold antifade reagent. The slide scanner was a Nanozoomer 2.0HT with a fluorescence imaging module (Hamamatsu Photonics, Massy, France) using objective UPS APO 20X NA 0.75 combined to an additional lens 1.75X, leading to a final magnification of 35X. Virtual slides were acquired with a TDI-3CCD camera. Fluorescent acquisitions were performed with a mercury lamp (LX2000 200W—Hamamatsu Photonics, Massy, France) and the set of filters adapted for DAPI, and/or GFP/Alexa 488, and/or Alexa 568 and or Alexa 647/Cy5 fluorescence. Image analysis was performed with NDP.view2 Viewing software (Hamamatsu Photonics, Massy, France).

2.13. Statistics and Figures

Data were analyzed using GraphPad Prism 8 software and figures were prepared with Inkscape software. Depending on the conditions tested, one- or two-way ANOVA and unpaired two-tailed Student’s *t*-tests were used to evaluate statistical differences between the samples. *p*-values < 0.05 were considered to be statistically significant. For correlation analysis, values are displayed as Spearman’s correlation coefficient test and rho values were considered significant when >0.3 and <-0.3 .

3. Results

3.1. PDHK1 Is Increased in Glioblastoma Patient Samples and Correlates with Glucose Metabolism and pH Regulation Genes

Transcriptional analysis from TCGA patient cohorts revealed that the expression of PDHK1 was significantly higher in GB samples than in low-grade glioma (LGG) samples (Figure 1A). Distribution analysis of PDHK1 expression extracted from IVYGAP dataset revealed a high expression in pseudopalisading cells around necrosis, known as the hypoxic area (Figure 1B). In contrast, PDHK2 expression was lower in GB than in LGG (Figure 1C). Distribution analysis of PDHK2 expression showed that infiltrating tumor areas were enriched in PDHK2, when compared with GB cellular tumor (Figure 1D). Correlation analysis of the dataset from TCGA, as well as from the IVYGAP dataset, revealed that

PDHK1 expression was correlated with several genes involved in glycolysis and glucose metabolism, including the glucose transporters (GLUT1 and 2), LDHA and the lactate transporter MCT1 (SLC16A1) (Figure 1E). In contrast, PDHK2 expression was correlated with PFKM or PFKFB2 in both datasets (Figure 1E). In the LGG dataset, there was no correlation with the vast majority of the genes involved in glucose metabolism (Figure 1E). For two key genes involved in pH regulation, carbonic anhydrase IX and XII (CAIX and CAXII), a strong and significant correlation was found between PDHK1 for CAIX (Figure 1F) and CAXII (Figure 1G), but not for PDHK2, in both datasets in GB tissues, indicating potential different roles of PDHK1 and PDHK2 (Figure 1F,G). CAIX and CAXII expression was significantly correlated with the glucose metabolism genes (Figure 1H) and was also higher in pseudopalisading cells around necrosis (Figure 1I) as for GLUT1, LDHA, and SLC16A1 (MCT1) expression (Figure 1K–M). Taken together, these results showed that PDHK1 is elevated in GB hypoxic areas, whereas PDHK2 is higher at the invasive front.

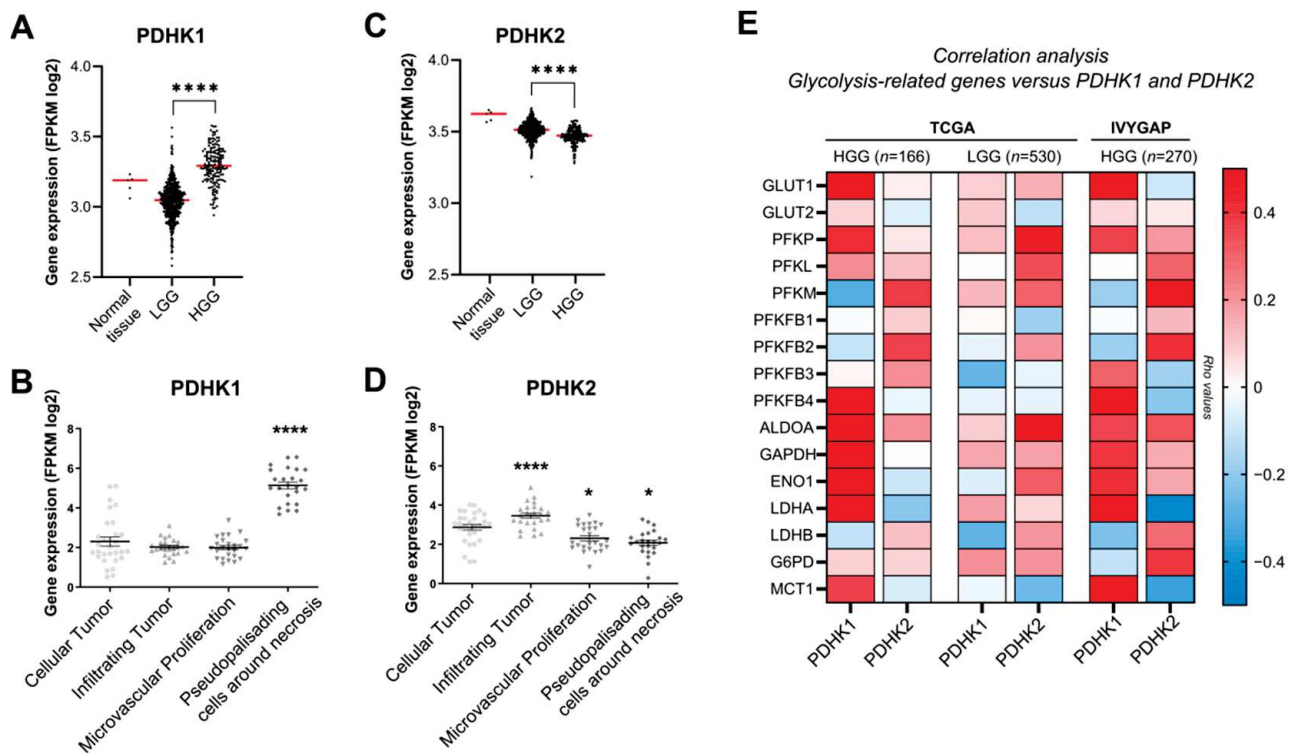


Figure 1. Cont.

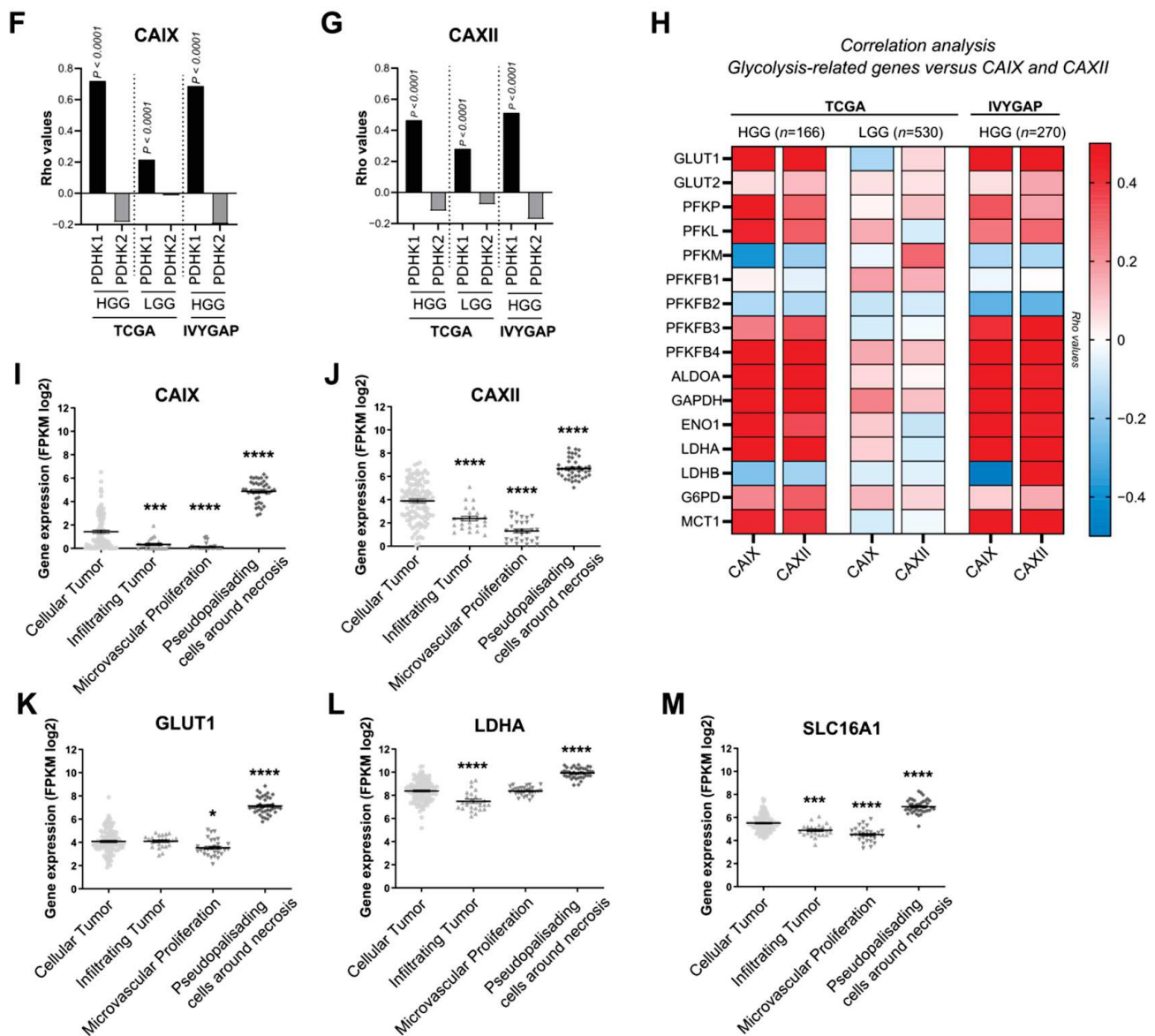


Figure 1. Expression and correlation analysis of PDHK1, PDHK2 and genes involved in glucose metabolism in HGG and LGG. (A) Expression levels of PDHK1 in normal tissue, low-grade glioma (LGG) and high-grade glioma (HGG) (TCGA). (B) PDHK1 expression levels and localization in HGG tissue (IVYGAP). (C) Expression levels of PDHK2 in normal tissue, LGG and HGG (TCGA). (D) PDHK2 expression levels and localization in HGG tissue (IVYGAP). (E) Correlation analysis of genes involved in glycolysis with PDHK1 and PDHK2 in HGG and LGG from TCGA and HGG from TCGA + IVYGAP. (F) Correlation analysis of CAIX with PDHK1 and PDHK2 in HGG and LGG from TCGA and HGG from IVYGAP. (G) Correlation analysis of CAXII with PDHK1 and PDHK2 in HGG and LGG from TCGA and HGG (TCGA + IVYGAP). (H) Correlation analysis of genes involved in glycolysis with CAIX and CAXII (TCGA + IVYGAP). (I) CAIX and (J) CAXII expression levels and localization in HGG tissue (IVYGAP). (K) GLUT1, (L) LDHA and (M) SLC16A1 expression levels and localization in HGG tissue defined by the IVYGAP database. Data are expressed as the mean \pm SEM and p -values were obtained using unpaired t -tests (A,B), Spearman's correlation coefficient tests (E–H) and one-way ANOVA (B,D,I–M); * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.2. Inhibition of PDHK Activity by DCA Modulates PDHK Expression and Cell Morphology

To determine the role of PDHK1, PDHK2 and PDH phosphorylation in GB development (Figure 2A), we used a stem-like cell model (P3 cells), as previously characterized [16,24]. P3 cells were transduced with CRISPR-Cas9 constructs against either *PDHK1*

or *PDHK2* gene, and protein depletion was confirmed by Western blot analysis at 21% and 0.1% O₂ (Figure 2B). PDHK1 expression, but not PDHK2, was found to be increased after hypoxia incubation (Figure 2B,D). Furthermore, PDH phosphorylation status was analyzed in PDHK1 and PDHK2 knockout cells and was found to be decreased compared with P3 SgCont cells in hypoxic conditions (Figure 2C). Then, P3 cells were treated with 25 mM of dichloroacetate, (a large-range PDHK inhibitor), for 72 h, and cultured either at 21% or 0.1% O₂. Upon DCA treatment, PDHK1 expression remained stable at 21% O₂ but decreased in hypoxic conditions (Figure 2D). PDHK2 levels were significantly and equally decreased upon DCA treatment in both oxygen conditions (Figure 2D). At 0.1% O₂, PDH phosphorylation was increased in P3 wt cells and inhibited upon DCA treatment (Figure 2E).

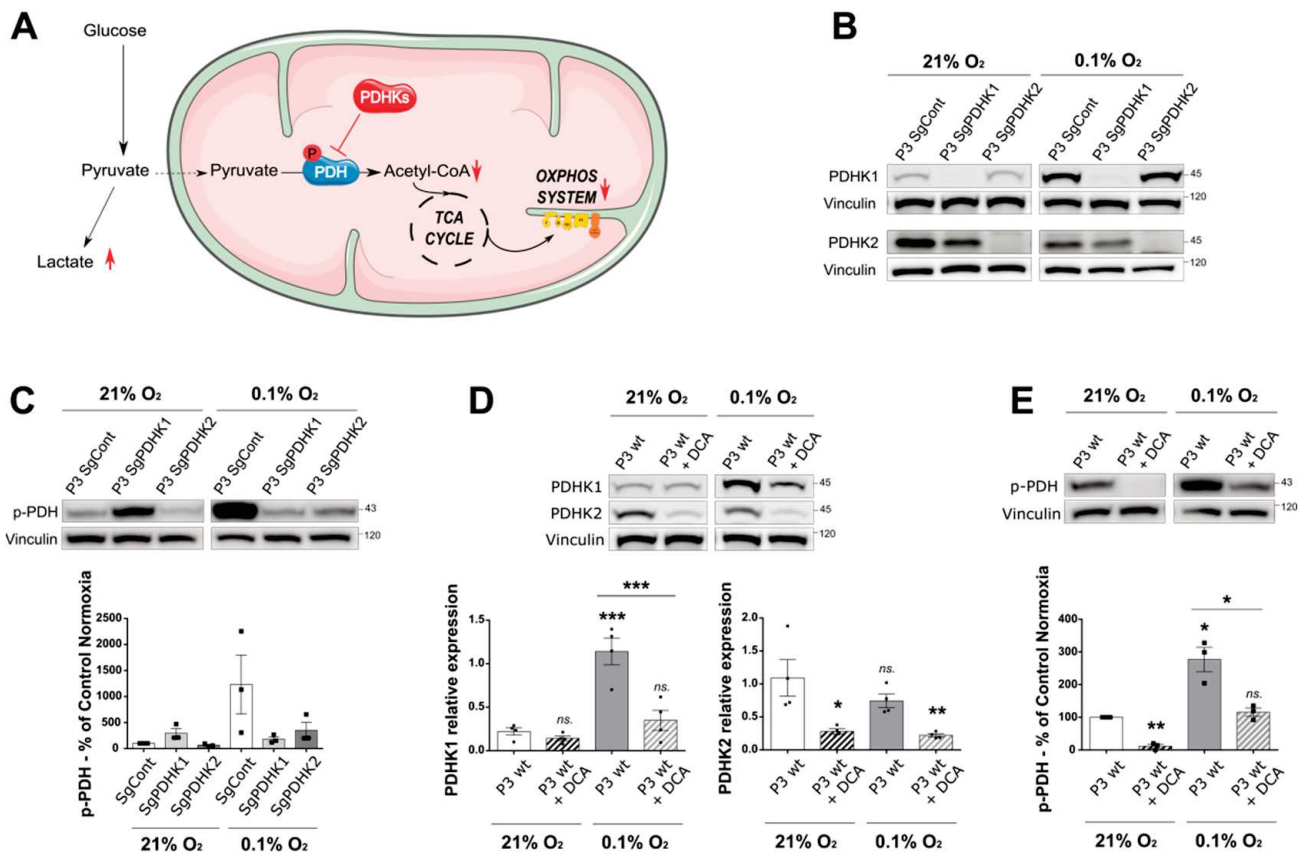


Figure 2. Cont.

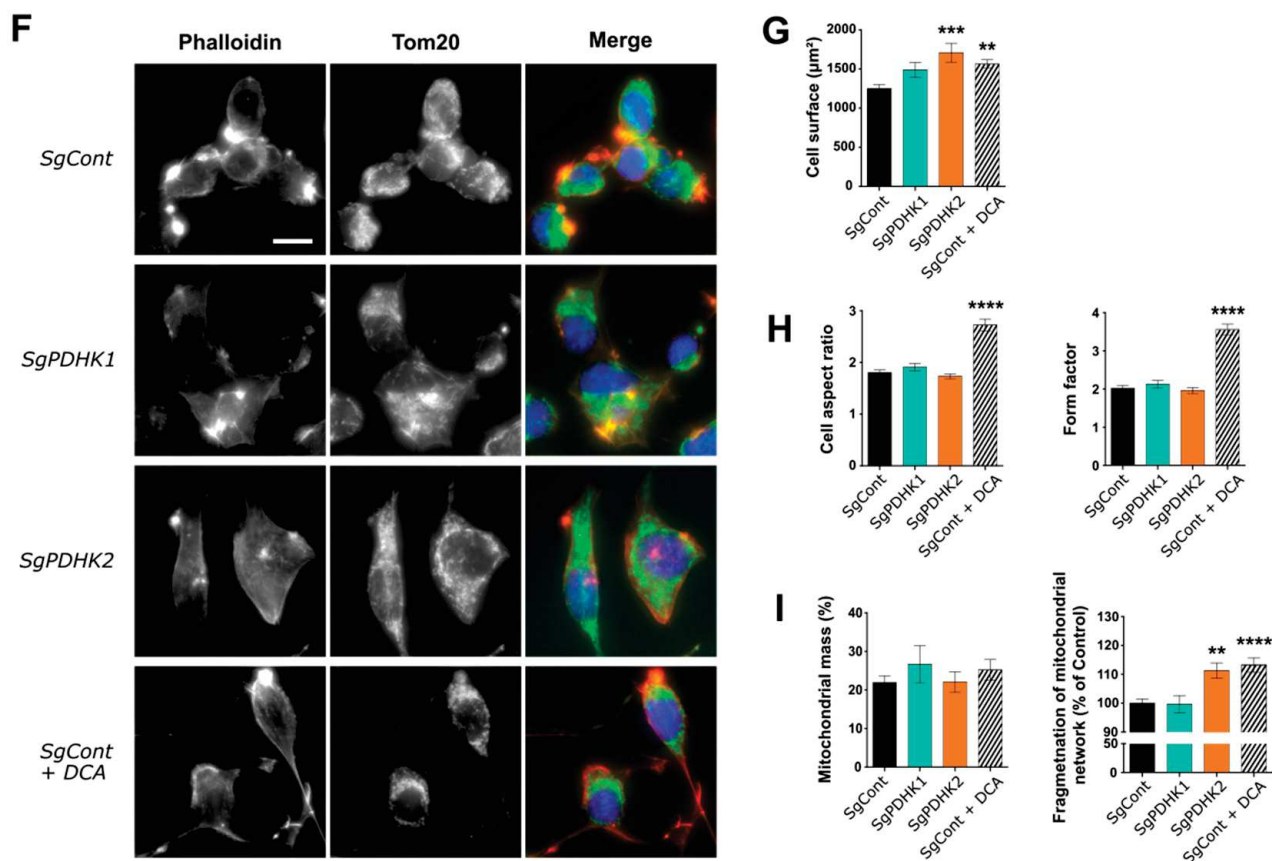


Figure 2. Dichloroacetate (DCA) reduces levels of phosphorylated PDH in a primary glioblastoma in vitro cell model, impacting cell and mitochondrial organization. (A) Illustration of the two alternative pyruvate utilization pathways and the impact of PDHK activity on the balance between lactic fermentation or mitochondrial oxidation of pyruvate. (B–E) Western blotting and corresponding quantification of PDHK1, PDHK2 expression or phospho-PDH status in P3 cells control, knockout for PDHK1, PDHK2 or treated with DCA 25 mM for 3 days; all cells were exposed to either 21% O₂ or 0.1% O₂. Graphs represent densitometry quantification normalized with vinculin ($n = 3$ or 4). (F) Epifluorescence images of immunofluorescence stainings on P3 SgCont, SgPDHK1, SgPDHK2 or treated with DCA 25 mM for 3 days (Phalloidin, red; Tom20, green; Hoechst, blue). Scale bar: 20 µm. (G,H) Immunofluorescence image analysis (120 to 240 cells per group): (G) cell surface quantification; (H, left) cell aspect ratio corresponding to the ratio of the major axis to minor axis of the cells; (H, right) form factor imaging branching of the cells. (I) Mitochondrial network analysis based on immunofluorescence pictures; (left) mitochondrial mass expressed as the percentage of total cell area (39 to 99 cells per group); (right) quantification of mitochondrial network fragmentation corresponding to the ratio of the number of mitochondria per cell on the area of the full mitochondrial network, normalized by the mean of control group and expressed as the percentage of control. Data are expressed as the mean \pm SEM and p -values were obtained using one-way ANOVA (D,G,H,I left) or unpaired t -tests (C,E,I right); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns.: not significant.

Cell morphology analysis showed that PDHK2 KO and DCA-treated cells increased in size. DCA-treated cells were also found to be more elongated, as shown by an increase in aspect ratio and form factor parameters (Figure 2F–H), correlating with a higher number of microtubes (Figure 2F, lower panels), membrane structures that have been described previously [24]. Finally, the mitochondrial network was analyzed based on anti-Tom20 staining and no difference was observed in the mitochondrial mass between conditions, but the mitochondrial networks appeared more fragmented in PDHK2 KO and DCA-treated cells (Figure 2I), indicating mitochondrial dysfunction.

3.3. Inhibition of PDHK Activity Impacts GB Cell Energy Metabolism

To investigate the metabolic effect of both DCA and single PDHK knockout in the GB cells, respiration capacity and lactate production assays were performed. The acute metabolic effect of 25 mM DCA on P3 cells showed that the extracellular acidification rate (ECAR), predominantly reflecting extracellular lactate, was significantly reduced (Figure 3A). To confirm this result, specific lactate measurements were performed on P3 cells, treated with 25 mM DCA or vehicle for 72 h. Both cell pellets and supernatants were collected to enable measurements of intracellular production and extracellular secretion of lactate, respectively. Intracellular lactate pools were significantly increased at 0.1% O₂ compared with 21% O₂, both for P3 control and PDHK1 KO cells. DCA reduced the production of intracellular lactate in both oxygen conditions; however, this was only significant at 0.1% O₂ (Figure 3B), as also observed for PDHK2 KO cells. Consistently, the level of extracellular lactate increased in P3 control cells upon incubation at 0.1% O₂, as well as in P3 PDHK1 and PDHK2 KO cells, and lactate secretion was significantly reduced upon DCA treatment (Figure 3B).

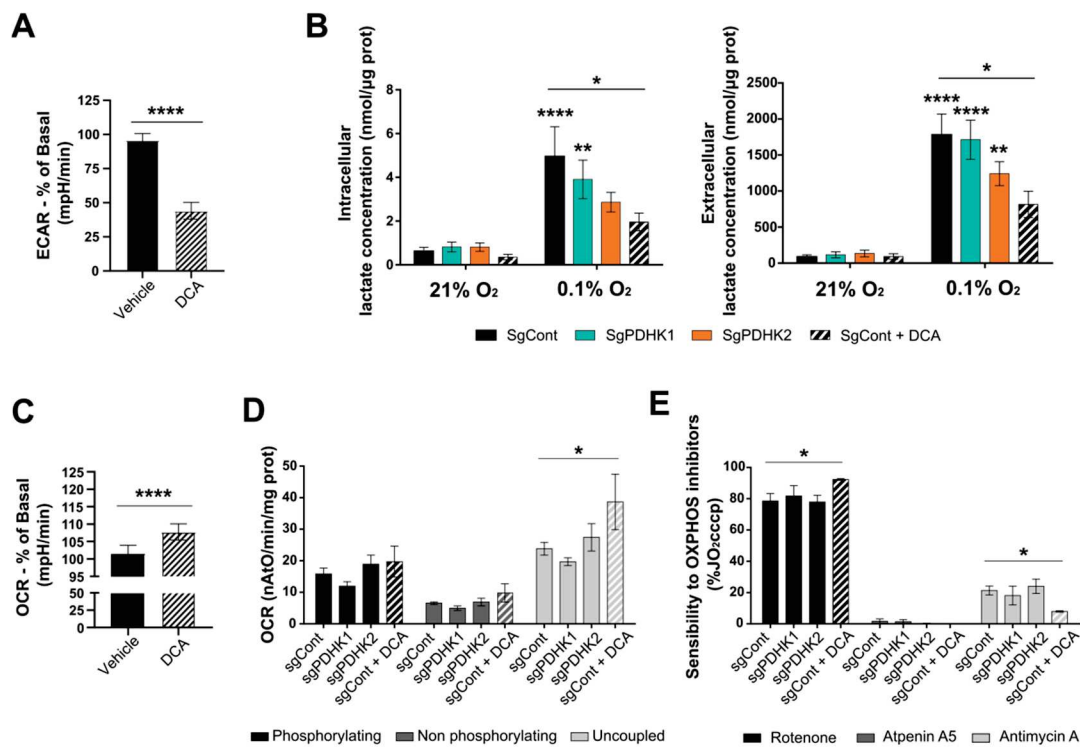


Figure 3. Cont.

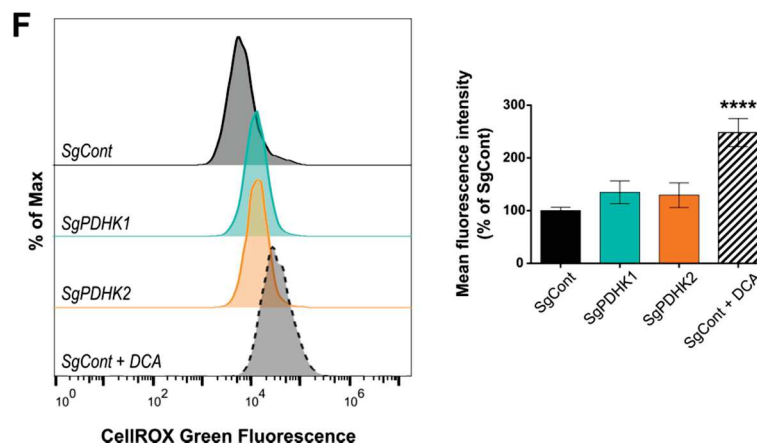


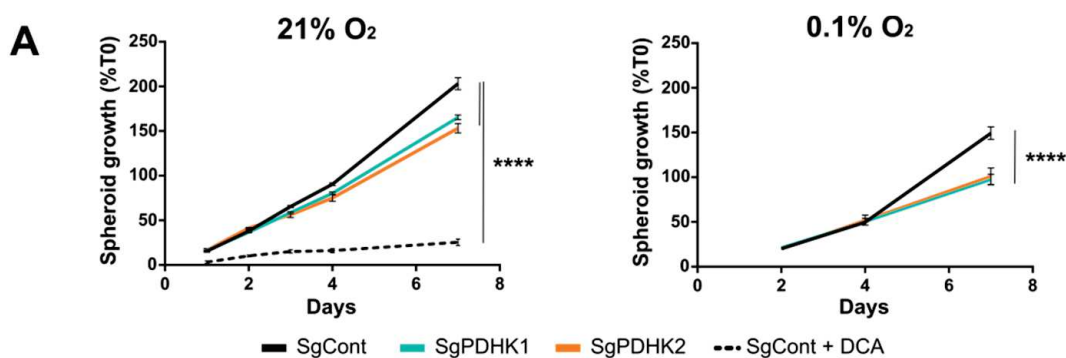
Figure 3. DCA disturbs GB cell metabolism and induces ROS production. (A) The extracellular acidification rate (ECAR) was measured in real time upon the addition of 20 mM DCA/vehicle to P3 wt cells. Values are presented as the percentage change compared with basal ECAR prior to DCA addition. (B) Intra- (*left*) and extracellular (*right*) lactate measurement in P3 SgCont, SgPDHK1, SgPDHK2 or with DCA treatment (25 mM for 3 days), upon 21% or 0.1% O₂ exposure; *n* = 7 to 8 for each condition; when not noticed, significance was assessed by comparing with control cells 21% O₂. (C) The oxygen consumption rate (OCR) was measured in real time upon the addition of 20 mM DCA/vehicle to P3 wt cells. Values are presented as the percentage change compared with basal OCR prior to DCA addition. (D) Oxygraphy analysis of P3 cells in a phosphorylating state (basal cell respiration), non-phosphorylating state (oligomycin addition) or uncoupled state (CCCP addition); *n* = 4. (E) Sensitivity in P3 cells to specific OxPhos complex inhibitors rotenone (complex I), atpeninA5 (complex II) and antimycin A (complex III); *n* = 4. The addition of inhibitors was performed upon uncoupled respiration conditions and results are expressed as the percentage of uncoupled respiration prior inhibitor addition (%JO₂cccp). (F) ROS production assessed in triplicates with CellROX Green probe in PDHK1 or PDHK2 KO cells, or in control cells exposed to 3 days of DCA treatment (25 mM). *Left panel*: Representative histograms in modal scaling (percentage of Max). *Right panel*: Quantification of mean fluorescence intensity, expressed as the percentage of control cells. Data are expressed as the mean ± SEM, and *p*-values were obtained using unpaired *t*-tests (A,C), one-way ANOVA (F) or two-way ANOVA (B,D,E); * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; **** *p* < 0.0001.

Furthermore, acute DCA treatment significantly increased the oxygen consumption rate (OCR) for the P3 cells (Figure 3C). Additional oxygen consumption analysis was performed using the Oroboros oxygraph methodology and showed no difference in endogenous oxygen consumption rate between all conditions, even with a long-term DCA treatment (3 days) (Figure 3D). However, the maximal respiratory capacity (uncoupled conditions) was significantly increased upon DCA treatment, but not altered in PDHK1 or PDHK2 KO cells, compared with control cells (Figure 3D). Moreover, DCA-treated cells were detected as more sensitive than non-treated cells to rotenone, an inhibitor of oxidative phosphorylation (OxPhos) complex I (Figure 3E), indicating that DCA induced electron transport chain (ETC) activity more dependent on complex I (Figure 3E). PDHK1 or PDHK2 KO cells did not present differences in respiration chain inhibitor sensitivity (Figure 3E), suggesting a compensatory effect between PDHKs on cell respiration. ROS production was then measured using the CellROX probe and a significant increase was detected in DCA-treated cells, but not in PDHK1 or PDHK2 KO cells (Figure 3F).

3.4. Disruption of PDHK1 or PDHK2 Activity Impairs GB Proliferation and Invasion

P3 control cells treated with DCA or vehicle and PDHK1/PDHK2 KO cells were tracked for spheroid growth during a period of 7 days, reflecting cell proliferation. The growth rate was higher in spheroids incubated at 21% O₂ when compared with 0.1% O₂ (Figure 4A). PDHK1 and PDHK2 KO spheroids presented a lower growth rate than the

corresponding control spheroids at both 21% and 0.1% O₂ (Figure 4A). DCA drastically impaired spheroid growth (Figure 4A) and destabilized spheroid integrity at 0.1% O₂, as observed by image monitoring and by viability assay (Figure 4B, right panels). In contrast, control spheroids presented a compact shape with few detached cells (Figure 4B, left panels). We then performed invasion experiments by embedding spheroids in collagen I gel (Figure 4C). Both PDHK1 KO, PDHK2 KO and DCA-treated spheroids showed a decreased invasion potential as compared with SgCont spheroids at 21% O₂ (Figure 4C, right upper panel). At 0.1% O₂, invasion potential was decreased by almost 50% after DCA treatment, and by almost 25% for PDHK2 KO spheroids, when compared with the control (Figure 4C, right lower panel). Furthermore, DCA-treated cells presented long and thin protrusions around the spheroid core, resembling 3D microtube structures (Figure 3C).



vs. SgCont	J+1	J+2	J+3	J+4	J+7
SgPDHK1	ns.	ns.	ns.	*	****
SgPDHK2	ns.	ns.	ns.	***	****
DCA	*	****	****	****	****

vs. SgCont	J+2	J+4	J+7
SgPDHK1	ns.	ns.	****
SgPDHK2	ns.	ns.	****
DCA	nd.	nd.	nd.

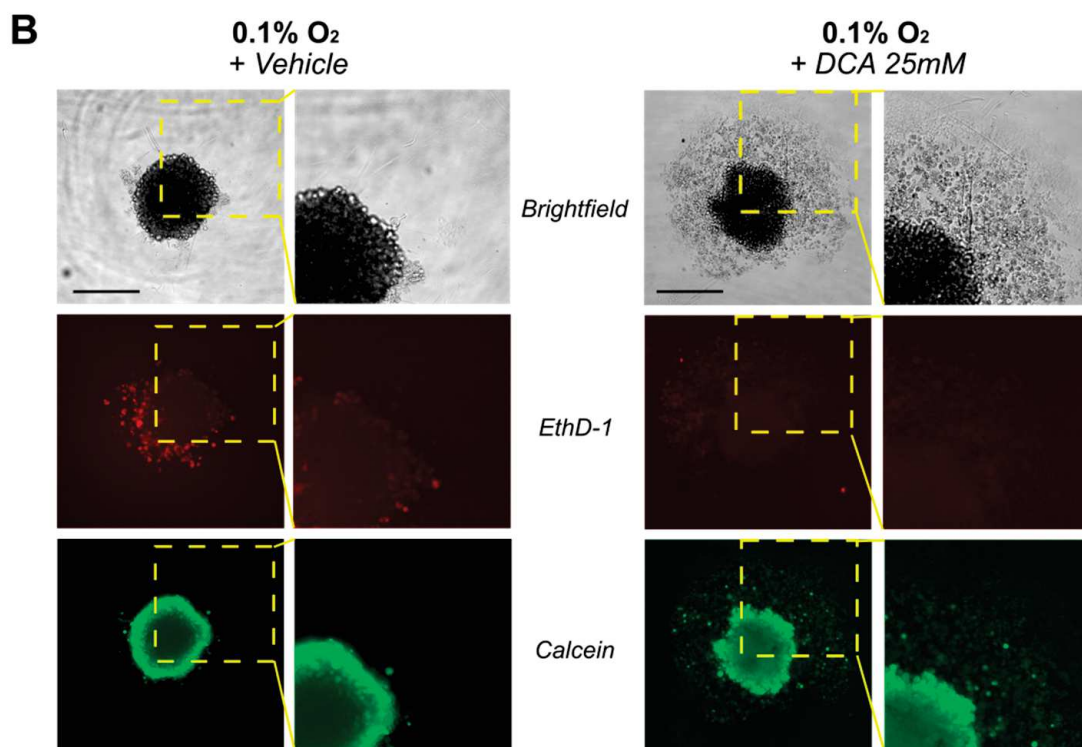


Figure 4. Cont.

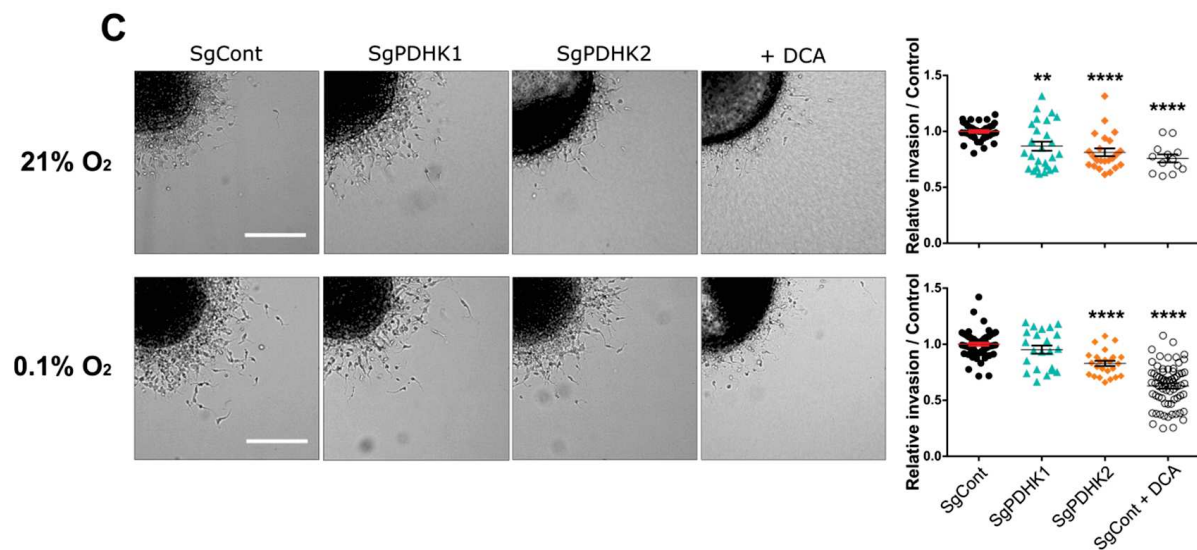


Figure 4. Genetic or pharmacologic PDHK disruption impairs GB cell proliferation and invasion. (A) *Left panel:* P3 spheroid growth recorded over 7 days in normoxic conditions (21% O₂, 8–12 spheroids per condition, $n = 3$). Statistics versus control condition are presented in the table. *Right panel:* the same experiment was processed in hypoxic condition (0.1% O₂). (B) Evaluation of live/dead cell status of spheroids exposed to both hypoxic conditions and DCA treatment. *Upper panel:* brightfield image of P3 SgCont spheroid before and after being exposed to vehicle or DCA 25 mM treatment for 7 days (left: vehicle; right: DCA). *Middle and lower panels:* viability assessment of spheroids, incubated with calcein (green) and ethidium homodimer (red), after a 7-day DCA or vehicle treatment. Scale bar: 150 μ m. (C) *Left panel:* representative images of invasive spheroids SgCont, SgPDHK1, SgPDHK2 or treated with DCA, included in a collagen I matrix and incubated either at 21% or 0.1% O₂ for 24 h. Scale bar: 150 μ m. *Right panel:* relative invasion rate compared with the control condition (8–10 spheroids per condition, $n = 3$ to 5) upon 21% or 0.1% O₂ exposure. Data are expressed as the mean \pm SEM, and p-values were obtained using two-way ANOVA (A,C); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns.: not significant; nd.: not determined.

3.5. Simple Knockout of PDHK1 or PDHK2 Impairs In Vivo GB Tumor Growth and Invasion and Improves Mice Survival

To evaluate the in vivo effects of PDHK modulation on tumor growth, intracranial implantations of control, PDHK1 KO or PDHK2 KO P3 spheroids were performed in immunodeficient mouse brains. A group of control-implanted mice was treated with 25 mg/kg DCA daily, whereas the others were injected with the vehicle. Histological analysis of the tumors from the different groups showed a decrease in tumor core area in PDHK1 and PDHK2 KO groups (Figure 5A, upper panel), and the invasive area was smaller only in PDHK2 group (Figure 5A, lower panel). No detectable difference in tumor core or invasive area was observed in the DCA-treated group when compared with the control condition (Figure 5A). Contralateral hemisphere invasion was not detected in the PDHK2 KO group, in contrast to the other groups (Figure 5B). Surprisingly, mice treated with DCA exhibited shorter survival than the control group, but both PDHK1 and PDHK2 KO induced an improvement in overall survival, with a gain of approximately 10 days when compared with the control group (Figure 5C).

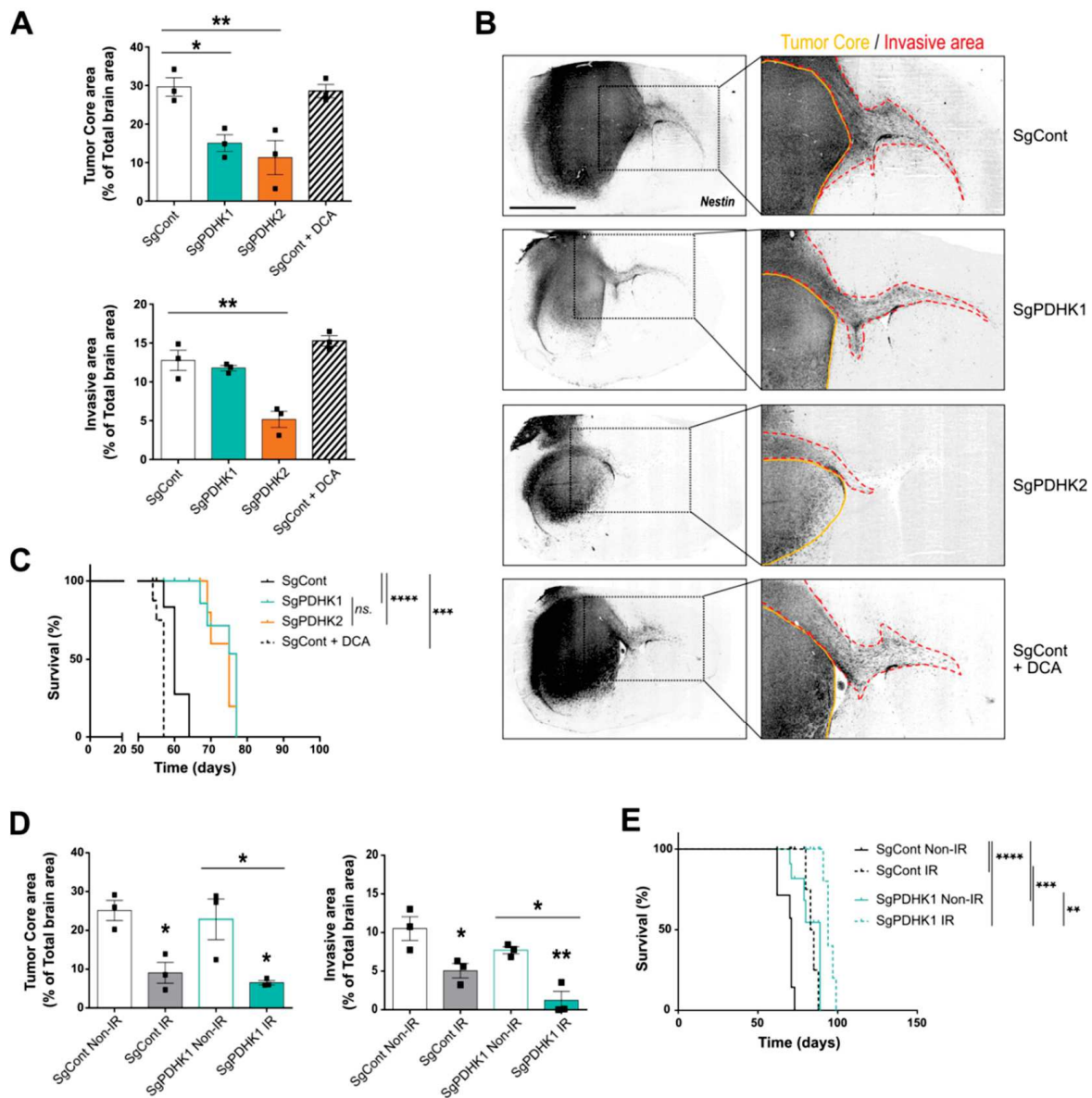


Figure 5. PDHK1 and PDHK2 KO reduce in vivo tumor growth and improve mice survival. **(A)** Tumor core and invasive areas were calculated in control, PDHK1 KO, PDHK2 KO and DCA-treated tumors based on mouse brain slices. **(B)** *Right panel:* histological analysis and staining with a human anti-nestin antibody (dark grey staining); *left panel:* magnified images showing contralateral invasion (red dashed lines). **(C)** Kaplan–Meier survival curves of xenotransplanted mice with P3 cells KO for PDHK1 (green), PDHK2 (orange), DCA-treated (dashed line) or control (black) ($n = 5$ to 8 mice per group). **(D)** Tumor core and invasive areas were calculated in control and PDHK1 KO tumors, irradiated (IR, 3×2 Gy) or not (Non-IR). **(E)** Kaplan–Meier survival curves of xenotransplanted mice with P3 cells KO for non-irradiated PDHK1 (green), or irradiated PDHK1 (green dashed line), or non-irradiated control (black) or irradiated control (black dashed line) ($n = 4$ to 7 mice per group). Data are expressed as the mean \pm SEM, and p-values were obtained using one-way ANOVA (**A,D**) or log-rank (Mantel–Cox) test (**C,E**); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns.: not significant.

Finally, in order to compare to GB treatment in patients, a radiotherapeutic protocol was used in an in vivo experiment to evaluate a potential additive effect of irradiation on the PDHK KO GB model. Comparable survival curves were observed between PDHK1 and PDHK2 KO groups, and PDHK1 is preferentially expressed in tumor cores, which is specifically targeted by cranial irradiation; therefore, mice from control and PDHK1

groups were selected for a three-time 2 Gy irradiation protocol. Histological analysis of core and invasive areas showed that irradiation decreased the tumor mass area and invasive capacities (Figure 5D). Irradiated PDHK1 KO tumors had even smaller central and invasive areas than the control tumors (Figure 5D). A similar trend was observed in the survival curves, with irradiation improving mouse survival in the two groups (SgCont and SgPDHK1) without inducing a synergistic effect (Figure 5E).

4. Discussion

Adapting metabolism according to the needs of cancer cells is crucial for tumor growth. This process, defined as the “metabolic reprogramming” hallmark of cancer [1], aims to sustain intracellular homeostasis and increase biomass and energy availability.

PDHKs specifically regulate the activation of the PDH complex, which controls the conversion of pyruvate into acetyl-coA to fuel the Krebs cycle, and consequently, the electron transport chain in mitochondria. PDHK activation impacts the balance between metabolic fluxes and promotes glycolytic pathways [25]. Indeed, PDHKs are found to be dysregulated in several cancer cell types including gliomas, as recently reviewed by Anwar et al. [26]. Here, we further investigated PDHK expression in patient samples from different glioma grades and found that the expression of PDHK1 was elevated in high-grade gliomas compared to low-grade gliomas. PDHK2 however, was found to be highly expressed in most of glioma samples. Moreover, the IVYGAP dataset on GB samples showed a differential intratumoral distribution of PDHK1 and PDHK2, suggesting distinct roles for the two isoforms. PDHK2 was preferentially expressed in the invasive area of the tumor, in contrast to PDHK1, finely regulated by HIF1 α , and which was more expressed in pseudopalisading cells surrounding necrotic areas. We also found a positive correlation between PDHK1 expression and genes involved in glucose transport (GLUT-1) and metabolism (several enzymes of the glycolysis such as ALDOA), as well as in lactate production (LDHA) and secretion (SLC16A1/MCT1). Key regulators of the pH homeostasis system, such as CAIX and CAXII, were also correlated with the expression of PDHK1. Together, these findings indicate that high glycolytic flux observed in cancer cells, increasing lactic acid production and deacidification mechanisms to avoid intracellular acidosis [4], is correlated to PDHK1 expression, confirming its role in sustaining the glycolysis-dependent proliferation of cancer cells. Thus, PDHK1, expressed in the tumor core, could be a potential candidate in controlling the balance between oxidative phosphorylation and lactic fermentation, and PDHK2 in targeting invasion.

To study the role of PDHKs in GB, we used patient-derived stem-like cells (P3 cells), in which we confirmed that hypoxic conditions (0.1% O₂) regulate PDHK1 but not PDHK2 protein expression. We showed that the pharmacological inhibition of PDHKs by DCA reduced the expression of both isoforms, delineating a potential effect of DCA on PDHK protein stability. Phosphorylation of the E1 α subunit of PDH residue S293, reflecting PDHKs activity, was increased in hypoxia and was inhibited by DCA, as previously described [27]. To dissect the differential role of PDHK1 and PDHK2, we developed PDHK single knockout cells using CRISPR-Cas9 technology. At 0.1% O₂, PDHK1 and PDHK2 KO cells showed a lower level of PDH phosphorylation when compared with the control condition. Interestingly, at 21% O₂, PDHK1 KO cells had higher p-PDH level than control cells, suggesting a compensatory effect of other PDHKs isoforms, potentially PDHK2. These results support our hypothesis of a specific PDHK isoform intratumoral organization, between hypoxic and more oxygenated tumor areas. Precise mechanisms remain to be elucidated.

Inhibition of PDHKs, either genetically or by using DCA treatment, impacted the extracellular acidification rate, as also shown in other models [28,29]. We confirmed that DCA reduced lactic acid production and secretion in our model related to increased glycolytic flux (hypoxic conditions). Oxidative pathways were also modulated; the oxygen consumption rate (OCR) was found to be increased after acute DCA treatment. Neither PDHK1 nor PDHK2 KO modulated the OCR; however, in future studies, investigating

whether PDHK1/PDHK2 double KO modifies the OCR would be of interest. In contrast, basal OCR upon longer-term DCA treatment was not modified but was elevated under uncoupled conditions, suggesting a downstream control of ATP synthase on basal respiratory rate. Moreover, DCA-treated cells showed an increased sensitivity to rotenone, technically assessed as previously described [20], revealing the pivotal role of mitochondrial complex-I-dependent respiration. The resulting flux reorganization towards complex I led to increased ROS production in DCA-treated cells [30,31]. The metabolic rearrangement induced by PDHK inhibition also modified the P3 cell shape and mitochondrial network. This network appeared fragmented upon DCA treatment and in PDHK2 KO cells, a phenomenon observed when cells are exposed to important metabolic stress [32]. Cells treated with DCA also showed an elongated shape, losing cell–cell interaction when exposed to hypoxia. However, viability assays performed on spheroids treated with DCA for 7 days and incubated at 0.1% O₂ did not show increased cell death as compared with vehicle-treated spheroids, suggesting a cytostatic but not cytotoxic effect of DCA, correlating with previously published data [12]. It has been reported that combining the inhibition of HIF1 α with chrysin, and blocking PDHK activity with DCA, impairs *in vitro* GB growth in hypoxia [33]. Consistently, we showed that the pharmacological and genetic disruption of PDHKs strongly impaired GB spheroid growth. Notably, at both O₂ levels, PDHK2 knockout and DCA treatment lowered the invasion rate when compared with the control condition, further supporting the role of PDHK2 in the invasive process.

DCA has been proposed in several pharmacological protocols, and results from clinical phase I trial confirmed the good tolerance of orally administered DCA to patients with recurrent brain tumors [34]. A Phase IIA trial of oral DCA will be performed in 40 patients before debulking surgery to evaluate the impact of DCA on recurrent GBs (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05120284> (accessed on 24 July 2022)). However, the scientific community still seems to be cautious about the use of a global PDHK inhibitor [35]. Pre-clinical studies emphasized DCA side effects, possibly linked to the hyperactivation of oxidative pathways and protumoral outcomes [36,37]. In our study, we evaluated the impact of DCA monotherapy treatment on mice implanted with P3 stem-like cells in comparison with a single knockout of either PDHK1 or PDHK2. We found that the tumor area in the DCA-treated group was not significantly different when compared with the control group. We hypothesize that differences observed between *in vitro* and *in vivo* conditions for the DCA treatment effectiveness may be linked to higher *in vivo* antioxidant defenses, provided either by GB stem-like cells themselves or by the cerebral tumor microenvironment. Furthermore, the stem-like cell model used in this study exhibited greater metabolic adaptation capacities [38,39] than other GB cell line models, such as U87 or U251, which are differentiated (serum-cultured cells) and mainly glycolytic cells. Consistently, a metabolic switch towards mitochondrial respiration induced by DCA is more effective in reducing tumor progression in these glycolytic models when compared with the P3 stem-like cells used in our study. To reinforce the *in vivo* results obtained in P3 tumors after DCA treatment, future studies on other patient-derived stem-like cell lines will be conducted.

Moreover, even when using a lower DCA dose than previously reported *in vivo* studies [40,41], the survival of DCA-treated mice was shortened in comparison to the control group, as also shown in other glioblastoma models (e.g., GL261) [9]. These results highlight a possible undesirable and undetermined adverse effect of DCA in our model and emphasize the need for a novel therapeutic strategy. An alternative approach would be to combine DCA with radiotherapy or concomitant medication that could potentiate the anti-cancer properties of DCA, and thus enhance the benefit/risk ratio. Indeed, DCA has already been shown to sensitize U87 cells to radiotherapy by reducing the mitochondrial reserve capacity and increasing oxidative stress [40]. In addition, considering the potential toxic effect of DCA shown in our model, PDHK-isoform-specific inhibition could be a more promising and safer therapy. The simple knockout of PDHK1 or PDHK2 clearly reduced GB progression *in vitro*, but also *in vivo* tumor growth when compared with the control

group; irradiation amplified this phenomenon without synergizing it. Interestingly, PDHK2 KO tumors did not present any contralateral hemisphere invasion, reinforcing a potential role of PDHK2 in GB invasion, in line with reduced invasion capacities observed *in vitro*. Considering the central role of GB stem-like cells in invasion, treatment resistance and GB relapse [42,43], these therapeutic options would represent a benefit for GB patients. Targeting PDHKs remains promising and alternatives to DCA, such as isoform-specific inhibitors, DCA mimetics or drugs targeting other sites of the PDHKs, are being developed [44].

More recently, in the era of immunotherapy in cancer medicine, DCA treatment has also proved to enhance the anti-tumor immune response in hepatocellular carcinoma [45]. Reduced production and secretion of lactate resulted in deacidification of the microenvironment, allowing for an innate immune response, representing an additional antitumor effect of DCA [46]. Immunotherapy treatment, such as immune checkpoint inhibitor (ICI), has failed in GB patients [47], but combinatory treatment with DCA could represent an interesting therapy potentiating axis; other therapeutic combinations with ICIs are currently in clinical trials [48].

5. Conclusions

In the present study, we found PDHK1 and PDHK2 to have distinct expression patterns and functions in GB tissue, coherent with metabolic specific organization and heterogeneity well characterized in GB [49]. We specifically described a new role of PDHK2 in GB invasion and lactate production. We recently showed that lactate fuels the TCA cycle to improve invasive capacities [17]; therefore, it will be interesting to further study and decipher mechanisms linking lactate, PDHK2 activity and GB invasive capacities. In a pre-clinical orthotopic mouse model, we found that both tumors generated from PDHK1 KO and PDHK2 KO cells prolonged overall mouse survival. According to our results, future therapeutic strategies to treat GB could include specific inhibitors of PDHK1 and PDHK2, which could be used sequentially to target specific roles of each isoform in GB progression, and/or be combined with radiotherapy. Distinct roles of PDHK1 and PDHK2 in GB biology will be elucidated in future studies: as they are differentially expressed in GB tumors, their specific inhibition could probably destabilize metabolic organization between the tumor central area in which PDHK1 is more expressed and the invasive area enriched for PDHK2 expression.

DCA decreased GB proliferation and invasion in our *in vitro* GB model but did not prolong survival when used as monotherapy *in vivo*. This may be due to a high metabolic flexibility of GB stem-like cells or symbiotic effects from cells in the microenvironment. Further evaluation of DCA treatment in a preclinical radio/chemotherapeutic protocol would be of interest. Overall, our findings indicate that the manipulation of PDHKs in GB shows potential for novel treatment strategies.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14153769/s1>, File S1: Original Western Blot figures.

Author Contributions: C.M.L., S.S., A.C.P.Z., C.L.B., G.V.R. and T.D. performed the experiments. J.G. analyzed the data; T.Z.T. performed bioinformatics analysis; M.-A.D. implanted animals and performed the *in vivo* experiments; C.M.L., A.C.P.Z., H.M., J.L., K.J.T., T.D. and G.V.R. discussed the results; T.D. and G.V.R. supervised the study; C.M.L., T.D. and G.V.R. wrote the manuscript. T.D. supervised the work of C.M.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from CNRS (recurrent fundings), from the “Ligue contre le Cancer” and the Fondation ARC, ARTC, PLBIO INCA, Cancéropôle GSO and the SIRIC-BRIO to T.D. and by Helse Vest, Haukeland Hospital and Department of Biomedicine, University of Bergen for G.V.R. CL is a recipient of French Research Ministry funding for her doctoral position.

Institutional Review Board Statement: The animal study was approved by the Ethics Committee of the University of Bordeaux (DAP A#5522). Patients gave their consent before tissue analysis, accord-

ing to the clinical guidelines. Informed written consent was obtained from all subjects (Haukeland Hospital, Bergen, Norway).

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author (TD).

Acknowledgments: The authors thank Arnaud Villacreses and Jean-Max Pasquet from the CellOxia facility for their technical assistance (Univ. Bordeaux, INSERM U1035, F-33000 Bordeaux, France). The histological studies were performed at the Experimental Histopathology Platform, INSERM US 005-CNRS UMS 3427-TBM CORE, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University; the help of Nathalie Dugot-Senant is acknowledged. We are also grateful for the assistance from Julie Martineau, Marcia Campistron and Marie-Paule Algeo from Animalerie Mutualisée de Talence. We thank Arnaud Mourier for sharing his expertise in cellular metabolism and the insightful discussion, and Oceane C.B. Martin for the manuscript proofreading. Microscopy was performed in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 31–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **1956**, *123*, 309–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Benej, M.; Pastorekova, S.; Pastorek, J. Carbonic Anhydrase IX: Regulation and Role in Cancer. *Subcell. Biochem.* **2014**, *75*, 199–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Corbet, C.; Feron, O. Tumour Acidosis: From the Passenger to the Driver's Seat. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 577–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lunt, S.Y.; Vander Heiden, M.G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2011**, *27*, 441–464. [[CrossRef](#)]
- Sutendra, G.; Michelakis, E.D. Pyruvate Dehydrogenase Kinase as a Novel Therapeutic Target in Oncology. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 38. [[CrossRef](#)]
- Dyrstad, S.E.; Lotsberg, M.L.; Tan, T.Z.; Pettersen, I.K.N.; Hjellbrekke, S.; Tusubira, D.; Engelsen, A.S.T.; Daubon, T.; Mourier, A.; Thiery, J.P.; et al. Blocking Aerobic Glycolysis by Targeting Pyruvate Dehydrogenase Kinase in Combination with EGFR TKI and Ionizing Radiation Increases Therapeutic Effect in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancers* **2021**, *13*, 941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, X.; Jiang, Y.; Meisenhelder, J.; Yang, W.; Hawke, D.H.; Zheng, Y.; Xia, Y.; Aldape, K.; He, J.; Hunter, T.; et al. Mitochondria-Translocated PGK1 Functions as a Protein Kinase to Coordinate Glycolysis and the TCA Cycle in Tumorigenesis. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 705–719. [[CrossRef](#)]
- Korsakova, L.; Krasko, J.A.; Stankevicius, E. Metabolic-Targeted Combination Therapy with Dichloroacetate and Metformin Suppresses Glioblastoma Cell Line Growth In Vitro and In Vivo. *In Vivo* **2021**, *35*, 341–348. [[CrossRef](#)]
- Tataranni, T.; Piccoli, C. Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. *Oxid Med. Cell Longev.* **2019**, *2019*, 8201079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ruggieri, V.; Agriesti, F.; Scrima, R.; Laurenzana, I.; Perrone, D.; Tataranni, T.; Mazzoccoli, C.; Lo Muzio, L.; Capitanio, N.; Piccoli, C. Dichloroacetate, a Selective Mitochondria-Targeting Drug for Oral Squamous Cell Carcinoma: A Metabolic Perspective of Treatment. *Oncotarget* **2015**, *6*, 1217–1230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tataranni, T.; Agriesti, F.; Pacelli, C.; Ruggieri, V.; Laurenzana, I.; Mazzoccoli, C.; Sala, G.D.; Panebianco, C.; Paziienza, V.; Capitanio, N.; et al. Dichloroacetate Affects Mitochondrial Function and Stemness-Associated Properties in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Cells* **2019**, *8*, E478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- James, M.O.; Jahn, S.C.; Zhong, G.; Smeltz, M.G.; Hu, Z.; Stacpoole, P.W. Therapeutic Applications of Dichloroacetate and the Role of Glutathione Transferase Zeta-1. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *170*, 166–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Puchalski, R.B.; Shah, N.; Miller, J.; Dalley, R.; Nomura, S.R.; Yoon, J.-G.; Smith, K.A.; Lankerovich, M.; Bertagnolli, D.; Bickley, K.; et al. An Anatomic Transcriptional Atlas of Human Glioblastoma. *Science* **2018**, *360*, 660–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rahman, M.A.; Brekke, J.; Arnesen, V.; Hannisdal, M.H.; Navarro, A.G.; Waha, A.; Herfindal, L.; Rygh, C.B.; Bratland, E.; Brandal, P.; et al. Sequential Bortezomib and Temozolomide Treatment Promotes Immunological Responses in Glioblastoma Patients with Positive Clinical Outcomes: A Phase 1B Study. *Immun. Inflamm. Dis.* **2020**, *8*, 342–359. [[CrossRef](#)]
- Daubon, T.; Léon, C.; Clarke, K.; Andrique, L.; Salabert, L.; Darbo, E.; Pineau, R.; Guérit, S.; Maitre, M.; Dedieu, S.; et al. Deciphering the Complex Role of Thrombospondin-1 in Glioblastoma Development. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1146. [[CrossRef](#)]
- Guyon, J.; Fernandez-Moncada, I.; Larrieu, C.; Bouchez, C.; Chouleur, T.; Espedal, H.; Røslund, G.; Daher, B.; Barre, A.; Dartigues, B.; et al. Specific Expression of Lactate Dehydrogenases in Glioblastoma Controls Intercellular Lactate Transfer to Promote Tumor Growth and Invasion. 2021; *In Review*.

18. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)]
19. Koopman, W.J.H.; Visch, H.-J.; Smeitink, J.A.M.; Willems, P.H.G.M. Simultaneous Quantitative Measurement and Automated Analysis of Mitochondrial Morphology, Mass, Potential, and Motility in Living Human Skin Fibroblasts. *Cytometry* **2006**, *69A*, 1–12. [[CrossRef](#)]
20. Molinié, T.; Cougouilles, E.; David, C.; Cahoreau, E.; Portais, J.-C.; Mourier, A. MDH2 Produced OAA Is a Metabolic Switch Rewiring the Fuelling of Respiratory Chain and TCA Cycle. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2022**, *1863*, 148532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Lobo-Jarne, T.; Nývltová, E.; Pérez-Pérez, R.; Timón-Gómez, A.; Molinié, T.; Choi, A.; Mourier, A.; Fontanesi, F.; Ugalde, C.; Barrientos, A. Human COX7A2L Regulates Complex III Biogenesis and Promotes Supercomplex Organization Remodeling without Affecting Mitochondrial Bioenergetics. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 1786–1799.e4. [[CrossRef](#)]
22. Bouchez, C.L.; Daubon, T.; Mourier, A. NADH-Independent Enzymatic Assay to Quantify Extracellular and Intracellular L-Lactate Levels. *STAR Protoc.* **2022**, *3*, 101403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Guyon, J.; Andrique, L.; Pujol, N.; Røslund, G.V.; Recher, G.; Bikfalvi, A.; Daubon, T. A 3D Spheroid Model for Glioblastoma. *J. Vis. Exp.* **2020**, *158*, e60998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Joseph, J.V.; Magaut, C.R.; Storevik, S.; Geraldo, L.H.; Mathivet, T.; Latif, M.A.; Rudewicz, J.; Guyon, J.; Gambaretti, M.; Haukas, F.; et al. TGF- β Promotes Microtubule Formation in Glioblastoma through Thrombospondin 1. *Neuro Oncol.* **2022**, *24*, 541–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Saunier, E.; Benelli, C.; Bortoli, S. The Pyruvate Dehydrogenase Complex in Cancer: An Old Metabolic Gatekeeper Regulated by New Pathways and Pharmacological Agents: Pyruvate Dehydrogenase Complex in Cancer. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 809–817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Anwar, S.; Shamsi, A.; Mohammad, T.; Islam, A.; Hassan, M.I. Targeting Pyruvate Dehydrogenase Kinase Signaling in the Development of Effective Cancer Therapy. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2021**, *1876*, 188568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hitosugi, T.; Fan, J.; Chung, T.-W.; Lythgoe, K.; Wang, X.; Xie, J.; Ge, Q.; Gu, T.-L.; Polakiewicz, R.D.; Roesel, J.L.; et al. Tyrosine Phosphorylation of Mitochondrial Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Is Important for Cancer Metabolism. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 864–877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Niewisch, M.R.; Kuçi, Z.; Wolburg, H.; Sautter, M.; Krampen, L.; Deubzer, B.; Handgretinger, R.; Bruchelt, G. Influence of Dichloroacetate (DCA) on Lactate Production and Oxygen Consumption in Neuroblastoma Cells: Is DCA a Suitable Drug for Neuroblastoma Therapy? *Cell Physiol. Biochem.* **2012**, *29*, 373–380. [[CrossRef](#)]
29. Stacpoole, P.W.; Nagaraja, N.V.; Hutson, A.D. Efficacy of Dichloroacetate as a Lactate-Lowering Drug. *J. Clin. Pharmacol.* **2003**, *43*, 683–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Murphy, M.P. How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Dubouchaud, H.; Walter, L.; Rigoulet, M.; Batandier, C. Mitochondrial NADH Redox Potential Impacts the Reactive Oxygen Species Production of Reverse Electron Transfer through Complex I. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2018**, *50*, 367–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Rossignol, R.; Gilkerson, R.; Aggeler, R.; Yamagata, K.; Remington, S.J.; Capaldi, R.A. Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 985–993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Han, J.E.; Lim, P.W.; Na, C.M.; Choi, Y.S.; Lee, J.Y.; Kim, Y.; Park, H.W.; Moon, H.E.; Heo, M.S.; Park, H.R.; et al. Inhibition of HIF1 α and PDK Induces Cell Death of Glioblastoma Multiforme. *Exp. Neurol.* **2017**, *26*, 295–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Dunbar, E.M.; Coats, B.S.; Shroads, A.L.; Langae, T.; Lew, A.; Forder, J.R.; Shuster, J.J.; Wagner, D.A.; Stacpoole, P.W. Phase 1 Trial of Dichloroacetate (DCA) in Adults with Recurrent Malignant Brain Tumors. *Investig. New Drugs* **2014**, *32*, 452–464. [[CrossRef](#)]
35. Donohue, J.M.; Galal-Gorchev, H.; Brattin, W.; Liccione, J.J.; Altshuler, K.B. *Toxicological Review of Dichloroacetic Acid*; U.S. Environmental Protection Agency: Washington DC, USA, 2003.
36. Stacpoole, P.W.; Martyniuk, C.J.; James, M.O.; Calcutt, N.A. Dichloroacetate-Induced Peripheral Neuropathy. *Int. Rev. Neurobiol.* **2019**, *145*, 211–238. [[CrossRef](#)]
37. Feurecker, B.; Seidl, C.; Pirsig, S.; Bruchelt, G.; Senekowitsch-Schmidtke, R. DCA Promotes Progression of Neuroblastoma Tumors in Nude Mice. *Am. J. Cancer Res.* **2015**, *5*, 812–820.
38. Godoy, P.R.D.V.; Pour Khavari, A.; Rizzo, M.; Sakamoto-Hojo, E.T.; Haghdoost, S. Targeting NRF2, Regulator of Antioxidant System, to Sensitize Glioblastoma Neurosphere Cells to Radiation-Induced Oxidative Stress. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 2534643. [[CrossRef](#)]
39. Vlashi, E.; Lagadec, C.; Vergnes, L.; Matsutani, T.; Masui, K.; Poulou, M.; Popescu, R.; Della Donna, L.; Evers, P.; Dekmezian, C.; et al. Metabolic State of Glioma Stem Cells and Nontumorigenic Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16062–16067. [[CrossRef](#)]
40. Shen, H.; Hau, E.; Joshi, S.; Dilda, P.J.; McDonald, K.L. Sensitization of Glioblastoma Cells to Irradiation by Modulating the Glucose Metabolism. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 1794–1804. [[CrossRef](#)]
41. Kumar, K.; Wigfield, S.; Gee, H.E.; Devlin, C.M.; Singleton, D.; Li, J.-L.; Buffa, F.; Huffman, M.; Sinn, A.L.; Silver, J.; et al. Dichloroacetate Reverses the Hypoxic Adaptation to Bevacizumab and Enhances Its Antitumor Effects in Mouse Xenografts. *J. Mol. Med.* **2013**, *91*, 749–758. [[CrossRef](#)]
42. Knudsen, A.M.; Halle, B.; Cédile, O.; Burton, M.; Baun, C.; Thisgaard, H.; Anand, A.; Hubert, C.; Thomassen, M.; Michaelsen, S.R.; et al. Surgical Resection of Glioblastomas Induces Pleiotrophin-Mediated Self-Renewal of Glioblastoma Stem Cells in Recurrent Tumors. *Neuro-Oncol.* **2022**, *24*, 1074–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Bao, S.; Wu, Q.; McLendon, R.E.; Hao, Y.; Shi, Q.; Hjelmeland, A.B.; Dewhirst, M.W.; Bigner, D.D.; Rich, J.N. Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response. *Nature* **2006**, *444*, 756–760. [[CrossRef](#)]
44. Stacpoole, P.W. Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109*, djx071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Meng, G.; Li, B.; Chen, A.; Zheng, M.; Xu, T.; Zhang, H.; Dong, J.; Wu, J.; Yu, D.; Wei, J. Targeting Aerobic Glycolysis by Dichloroacetate Improves Newcastle Disease Virus-Mediated Viro-Immunotherapy in Hepatocellular Carcinoma. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 111–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ohashi, T.; Akazawa, T.; Aoki, M.; Kuze, B.; Mizuta, K.; Ito, Y.; Inoue, N. Dichloroacetate Improves Immune Dysfunction Caused by Tumor-Secreted Lactic Acid and Increases Antitumor Immunoreactivity. *Int. J. Cancer* **2013**, *133*, 1107–1118. [[CrossRef](#)]
47. Reardon, D.A.; Brandes, A.A.; Omuro, A.; Mulholland, P.; Lim, M.; Wick, A.; Baehring, J.; Ahluwalia, M.S.; Roth, P.; Bähr, O.; et al. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* **2020**, *6*, 1003–1010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Huang, B.; Li, X.; Li, Y.; Zhang, J.; Zong, Z.; Zhang, H. Current Immunotherapies for Glioblastoma Multiforme. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 603911. [[CrossRef](#)]
49. Duraj, T.; García-Romero, N.; Carrión-Navarro, J.; Madurga, R.; de Mendivil, A.O.; Prat-Acin, R.; Garcia-Cañamaque, L.; Ayuso-Sacido, A. Beyond the Warburg Effect: Oxidative and Glycolytic Phenotypes Coexist within the Metabolic Heterogeneity of Glioblastoma. *Cells* **2021**, *10*, 202. [[CrossRef](#)]

PARTIE II :

ADAPTATIONS

MÉTABOLIQUES POST-

RÉSECTION TUMORALE

Ce projet, initié de manière relativement récente au laboratoire, s'intègre dans la continuité des travaux précédents mais avec la volonté d'aborder les adaptations métaboliques mises en jeu dans le GB dans un contexte plus clinique. Ayant nécessité une mise au point des modèles assez poussée et chronophage, ce projet est toujours en cours dans le laboratoire et n'a pas encore donné lieu à une publication. Cette partie vous en présente les principales avancées à ce jour.

Contexte de l'étude

En clinique, le diagnostic des patients atteints de GB est souvent tardif, réalisé suite à l'apparition de troubles neurologiques dus à une tumeur déjà massive et infiltrative. La mise en place du traitement est donc urgente et la résection tumorale, lorsqu'elle est possible, est la première intervention thérapeutique chez le patient. Malgré l'amélioration des pratiques chirurgicales et la mise en place de technologies diverses pour le guidage neurochirurgical, une part des cellules tumorales échappe à cette exérèse, majoritairement les cellules ayant envahi à distance de la tumeur. Ces cellules invasives résiduelles ont également montré d'importantes capacités de résistance aux traitements radio- et chimiothérapeutiques, et rebasculent invariablement vers un phénotype prolifératif afin de reformer une tumeur.

Nos premiers travaux confirment la présence d'une symbiose métabolique intra-tumorale dans le GB. En effet, une architecture métabolique précise s'établit entre une masse tumorale hypoxique et glycolytique, exprimant des marqueurs tels que LDHA, et la population invasive exprimant en contraste des marqueurs tournés vers le métabolisme oxydatif. Sur le modèle du « Astrocyte-Neuron lactate shuttle » mis en évidence dans le cerveau sain, nos travaux mettent aussi en lumière des échanges de lactate entre les populations tumorales centrale et invasive, promouvant l'invasivité du GB.

Acte traumatique et invasif pour le patient, l'exérèse de la masse tumorale induit aussi des perturbations pour la tumeur elle-même puisqu'elle désorganise complètement cette symbiose métabolique intra-tumorale. En effet, le retrait de la masse tumorale, fortement productrice de lactate, entraîne une réduction drastique de la concentration de ce métabolite dans les cellules résiduelles post-résection, qui se trouvent ainsi privées de leur substrat de prédilection. L'hypothèse d'un *switch* métabolique induit par cette privation de lactate après résection chirurgicale de la tumeur pourrait expliquer le basculement des cellules invasives résiduelles d'un phénotype pro-invasif vers la promotion d'une prolifération secondaire, et ainsi initier la rechute du GB.

I. DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES D'ÉTUDES POUR LA RÉSECTION

A. *Modèle in vivo*

Pour étudier l'impact de la résection sur les cellules P3 dans un contexte organisme entier, nous avons développé un modèle de résection tumorale *in vivo* chez la souris. Basé sur le modèle déjà mis en place au laboratoire pour l'implantation orthotopique de cellules de GB humain chez la souris immunodéficiente, la procédure de résection a été initialement développée avec la collaboration du Dr. Olivier Mollier, neurochirurgien de l'hôpital Pellegrin de Bordeaux, puis mise au point et adaptée pour l'application courante par nos soins ainsi que ceux de nos collaborateurs de l'Animalerie de Talence, notamment Mme Marie-Alix Derieppe (procédure basée sur les travaux du Dr PJ Le Reste et de l'équipe du Dr Chevet à Rennes [363]). La procédure détaillée est présentée en partie « Modèles expérimentaux ».

La résection tumorale du GB chez la souris est une procédure lourde et invasive, et nécessite donc de nombreuses précautions pour garantir son efficacité et sa sécurité pour l'animal. La mise en place de ce modèle de résection, montrant plusieurs défis techniques et scientifiques, a nécessité une longue phase de mise au point et le développement conjoint de plusieurs techniques dans le laboratoire, permettant d'assurer divers contrôles des conditions expérimentales de ce modèle. De plus, ce modèle a été développé sur des animaux sévèrement immunodéficients (souris RAG2 $\gamma^{-/-}$), représentant un défi certain du fait d'une fragilité sensiblement plus élevée, d'après notre expérience et notamment en ce qui concerne la rémission post-opératoire, par comparaison à d'autres modèles murins immunocompétents.

1. *Amélioration de la technique chirurgicale*

La première difficulté liée à l'opération cérébrale du petit animal réside en la taille des structures anatomiques et plus généralement, la taille de l'animal. En effet, afin de préserver l'intégrité du SNC, la taille de la craniotomie doit être la plus réduite possible, réduisant la visibilité opératoire. Afin de limiter ce problème, la chirurgie est réalisée sous une loupe binoculaire. D'autre part, les structures anatomiques étant difficilement visibles, des aides pour le guidage chirurgical et la sélection des zones tumorales sont nécessaires. Les cellules P3 sont préalablement rendues fluorescentes par intégration d'un plasmide porteur d'une GFP (*Green Fluorescent protein*), rendant la tumeur fluorescente (vert) à l'œil nu ou sous lampe UV. Également, lorsque la visibilité reste difficile, l'administration de fluorescéine, un colorant fluorescent sous lumière bleue également utilisé chez l'homme, permet de visualiser les zones cérébrales tumorales puisqu'il s'accumule dans les régions où la BHE est altérée.

Afin de se rapprocher au mieux des conditions cliniques de résection de GB, l'outillage et la technique de résection ont également été optimisés. La résection se réalise désormais par aspiration (pointe d'aspiration connectée à une pompe réglée sur faible puissance), comme c'est le cas chez l'homme.

2. Validation de l'efficacité du modèle de résection et reproductibilité

2.1. Validation histologique

L'analyse histologique a permis de déterminer l'étendue de la résection dans notre modèle. Suite à l'implantation orthotopique de 5 sphéroïdes de 10 000 cellules P3 dans le striatum de souris RAG2/ $\gamma^{-/-}$, une tumeur se forme et est détectable sur des coupes histologiques dès 3 semaines / 1 mois. Une transparation de cerveaux murins présentant une tumeur P3, réséquée ou non (chirurgie un mois post-implantation), a révélé le retrait de la majorité de la masse tumorale, mais pas de sa totalité. En effet, une partie de la zone invasive péri-tumorale est toujours présente en bordure de la cavité de résection, ainsi que les cellules ayant envahi à distance le long des corps calleux (Fig. 37).

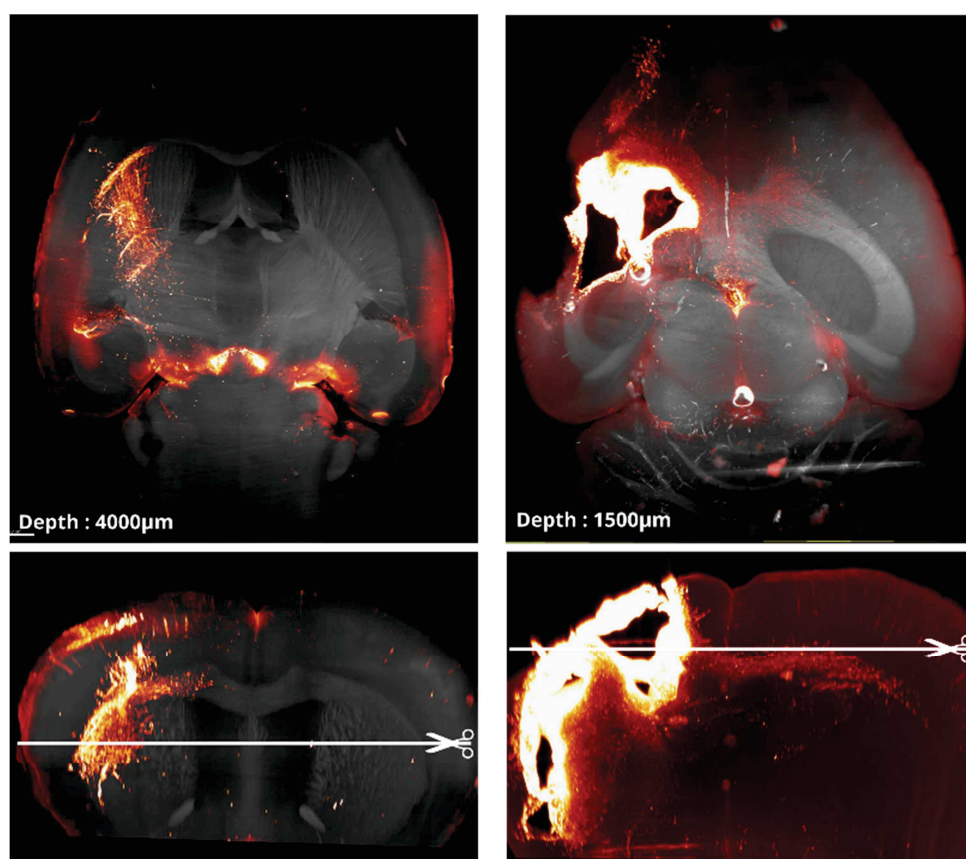


Figure 37 : Représentation histologique de cerveaux murins implantés avec des cellules P3, réséqués ou non. Clearing de cerveaux murins implantés avec des cellules P3 puis ayant subi une résection tumorale (droite) ou non (gauche), un mois post-implantation. Light Sheet imaging de coupes transversales (panel sup.) ou coronales (panel inf.) : cellules P3-GFP en couleur, autofluorescence en gris. Clearing et imagerie réalisés en collaboration avec le Bordeaux Imaging Center (BIC) par le Dr. Jérémie Teillon.

Rapidement après la résection, on observe une repousse tumorale à partir des résidus tumoraux post-résection. Après 3 à 5 semaines, en fonction de la taille de la tumeur initiale et de l'efficacité de la résection, les tumeurs P3 ont reformé une tumeur aussi massive, parfois plus, qu'au moment de la résection (*Fig. 38*).

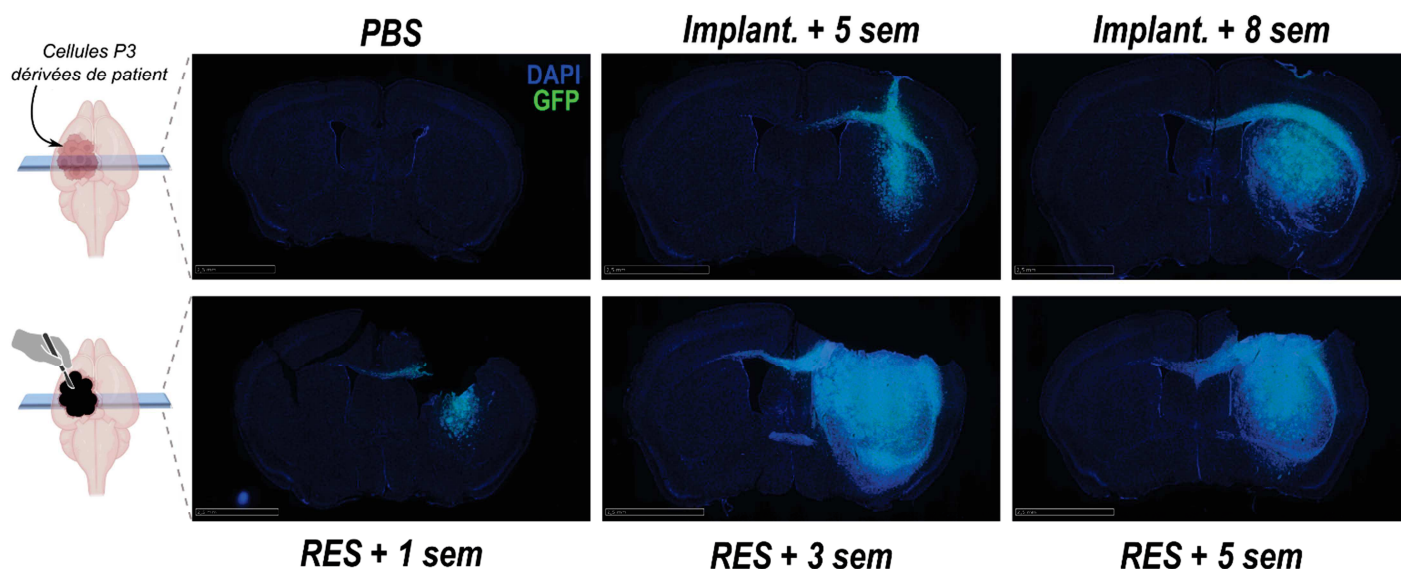


Figure 38 : Evolution histologique des tumeurs P3 : croissance et résection.

Coupes de cerveaux murins de 30 μm à partir de cerveaux fixés par perfusion intracardiaque de formaline puis cryopréservés. La fluorescence des cellules P3 (vert) montre l'architecture tumorale et un immunomarquage DAPI (bleu) identifie les noyaux cellulaires. **Panel supérieur**, de gauche à droite : cerveau implanté PBS, implanté avec des cellules P3 et extrait à 5 semaines post-injection (timing approximatif de la résection lorsqu'elle est pratiquée), ou à 8 semaines post-injection. **Panel inférieur**, de gauche à droite : cerveaux implantés avec des cellules P3, réséqués (5 semaines post-implantation) puis extraits 1 semaine post-résection, 3 semaines post-résection ou 5 semaines post-résection. Echelle : 2,5mm.

2.2. Validation par suivi de bioluminescence tumorale

Initialement réalisé uniquement par histologie, le suivi de croissance et de repousse tumorale est désormais obtenu par bioluminescence et complété en fin d'expérimentation par l'histologie. Pour cela, les cellules P3-GFP ont également été transduites avec un plasmide contenant le gène de la Luciferase (Luc). Chaque semaine, la taille de la tumeur peut ainsi être évaluée grâce à l'injection de luciférine, substrat qui, grâce à la réaction médiée par la luciférase, émet des photons détectables avec à un photodétecteur.

Cette technique, peu invasive pour l'animal et moins coûteuse en temps comme en coût, nous a permis de valider et standardiser notre modèle de résection : les tumeurs sont ainsi réséquées lorsqu'elles atteignent une bioluminescence comparable et l'efficacité de la résection est imagée par la chute de la valeur de bioluminescence (*Fig. 39*). La technique de résection s'est montrée reproductible sur plusieurs expérimentations.

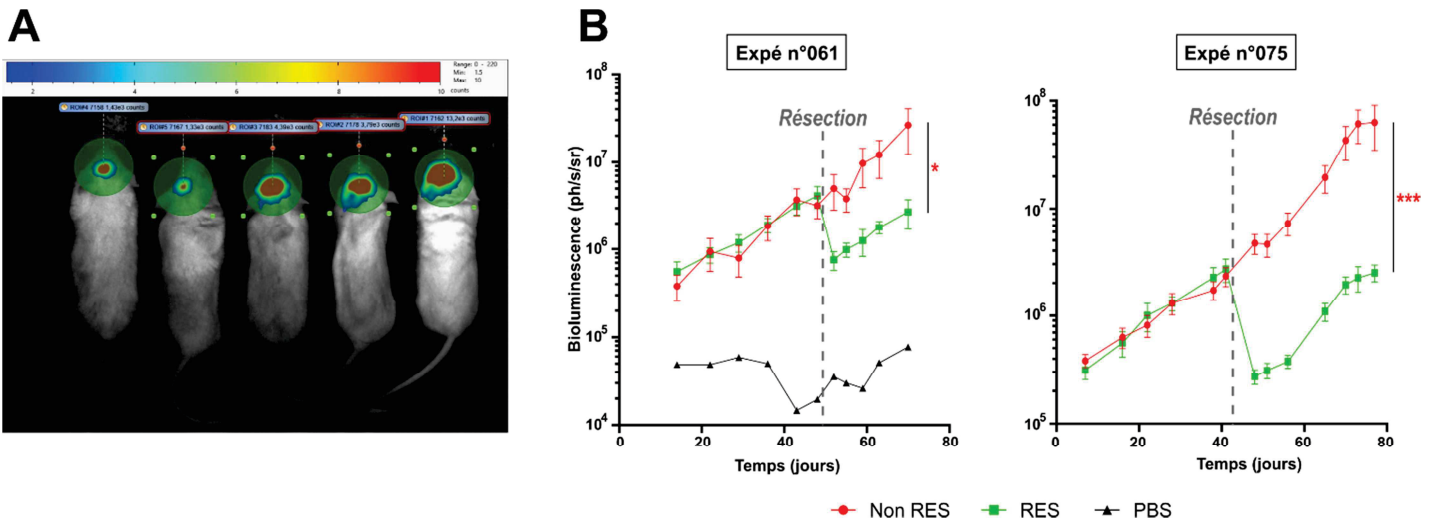


Figure 39 : Suivi de la bioluminescence et validation du modèle de résection tumorale.

A. Image représentative obtenue par photo-imagerie de souris implantées P3 avec résection tumorale (2 souris, gauche) ou sans (3 souris, droite). **B.** Suivi par bioluminescence de souris implantées avec des cellules P3 GFP/Luc puis réséquées (vert, RES) ou non (rouge, Non RES) ; $n = 6-18$. En noir est représentée la courbe de suivi de bioluminescence de souris implantées avec du PBS ($n = 1-2$). Data présentées en moyenne \pm SEM et analysées par two-way ANOVA (mesures répétées) ; * : $p < 0.05$, *** : $p < 0.0001$.

D'après les valeurs de bioluminescence, la résection du GB dans ce modèle murin est considérée subtotale mais elle permet en moyenne de diminuer le signal bioluminescent tumoral d'environ 85%, résultat cohérent avec les données histologiques.

2.3. Validation de la sécurité pour l'animal

L'étroit suivi des animaux en post-opératoire a permis de valider une bonne rémission post-résection tumorale pour la plupart des animaux. Un monitoring attentif de signes neurologiques possiblement liés à un œdème ou à une hémorragie intra-crâniale post-opératoire (stéréotypies, animaux penchés en controlatéral, fuites liquidiennes au niveau de la plaie, épilepsié...) n'ont révélé que de rares cas isolés.

Le suivi au long cours des poids des animaux implantés avec des cellules P3 ne montre pas de différence statistique entre des souris dont la tumeur a été réséquée ou non (légère baisse de poids transitoire dans les jours suivant l'opération, cohérente avec la chirurgie et la convalescence des animaux) (Fig. 40 A). Bien que l'expérimentation ait été stoppée pour des raisons techniques, la survie des souris n'est pas altérée par la résection chirurgicale ; à 76 jours post-implantation, elle est même légèrement augmentée pour le groupe réséqué (environ 80% de survie contre 70% dans le groupe non réséqué) (Fig. 40 B).

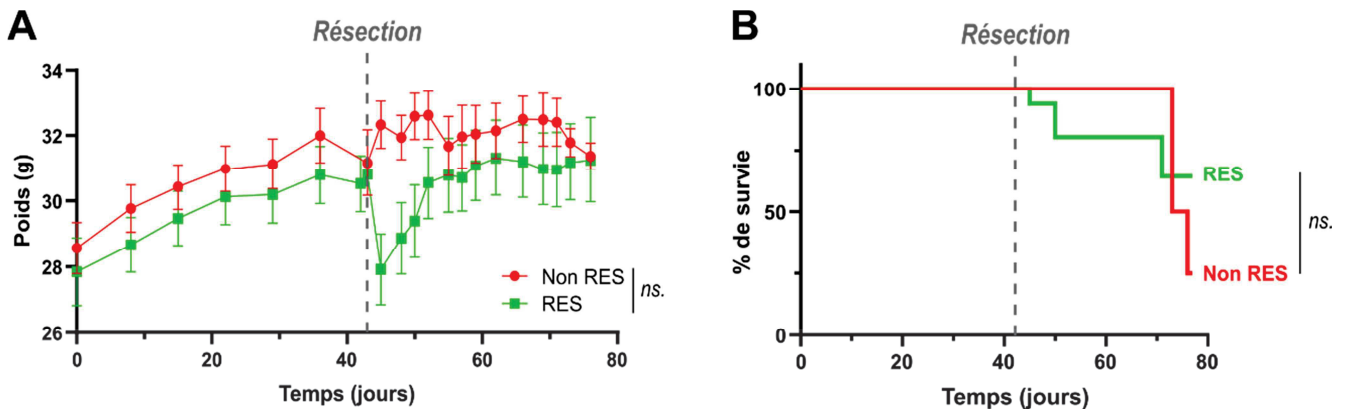


Figure 40 : Evolution des poids et de la survie des souris implantées et résectionnées.

A. Courbe d'évolution des poids des souris implantées de cellules P3 puis résectionnées (vert, RES) ou non (rouge, Non RES) au jour 42 post-implantation ; $n = 10-18$, data représentées en moyenne \pm SEM et analysées par multiple t-test. **B.** Courbes de survie Kaplan-Meier correspondantes, souris sacrifiées au jour 76 post-implantation ; $n = 10-18$, data analysées par test Log-rank (Mantel-Cox).

B. Modèle *in vitro*

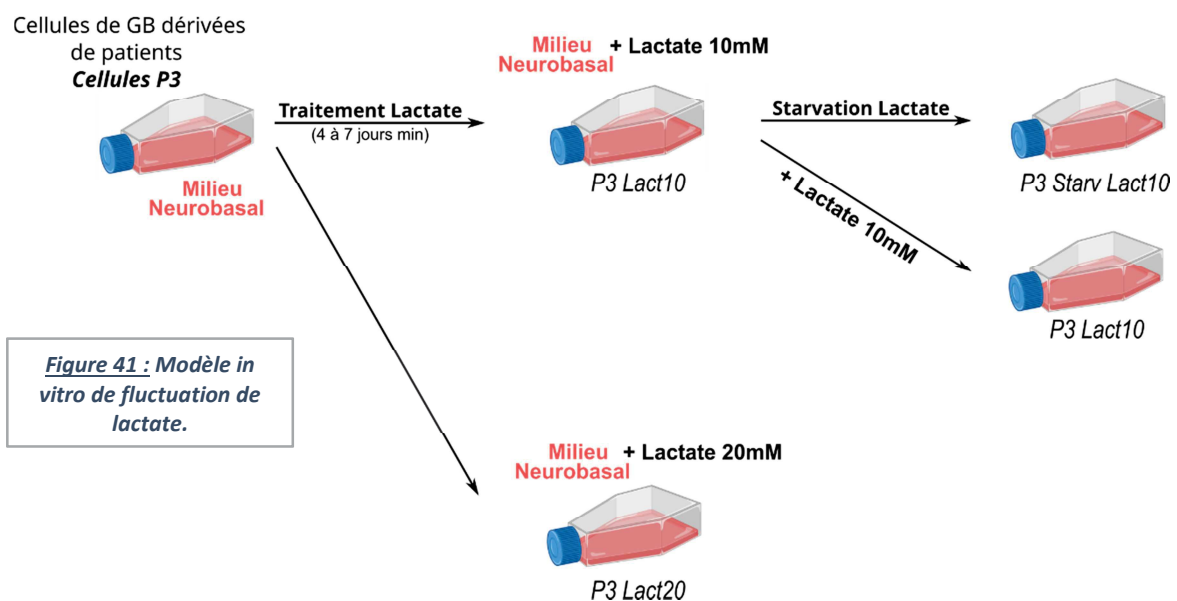
S'il est difficile de reproduire la complexité du GB *in vitro*, nos premiers projets (voir « Partie I : Symbiose métabolique dans le GB ») indiquent tout de même l'établissement d'une organisation métabolique similaire à celle établie *in vivo*, entre des cellules de GB glycolytiques, productrices de lactate, et d'autres plutôt oxydatives, utilisant ce lactate comme source carbonée. Dans le contexte de résection, notre hypothèse principale s'appuie sur la fluctuation de la concentration de lactate intracérébrale induite par l'exérèse de la masse tumorale très glycolytique, donc fortement productrice de lactate. Pour étudier l'impact de ces fluctuations de lactate sur nos cellules P3 dans un système techniquement plus simple que le modèle *in vivo* décrit précédemment, nous avons également mis en place un modèle *in vitro* mimant ces modulations de lactate associées à la résection.

Pour ce faire, nos cellules P3 ont été cultivées dans un milieu NB complet (supplémenté en B27, FGFb, héparine, pénicilline/streptomycine), complémenté ou non avec du lactate (Fig. 41). Après une phase d'habituation de minimum 4 à 7 jours, plusieurs conditions sont générées pour nos expériences :

- La condition « P3 wt » : ces cellules sont cultivées en milieu NB complet classique et ne reçoivent jamais de lactate, et représentent donc notre condition contrôle.
- La condition « P3 Lact10 » : les cellules P3 sont habituées à recevoir respectivement 10 mM de lactate dans leur milieu de culture. Leur milieu est changé et à nouveau complémenté en lactate tous les 2 à 3 jours pour maintenir

une concentration de lactate et autres métabolites relativement stable au contact des cellules.

- La condition « P3 Starv Lact10 » : les cellules P3 sont habituées à recevoir respectivement 10 mM de lactate dans leur milieu de culture. Leur milieu est changé et à nouveau complétement en lactate tous les 2 à 3 jours pour maintenir une concentration de lactate et autres métabolites relativement stable au contact des cellules. Au jour de l'expérience, et pour une durée déterminée par les besoins expérimentaux, les cellules sont privées (« Starv » pour *starvation*) de lactate par changement de milieu et réensemencement dans un milieu NB complet classique.



Note : Pour chaque expérience, les cellules de la condition P3 Lact10 et P3 Starv Lact10 sont systématiquement issues de la même population cellulaire, leur seule différence s'illustrant alors par la privation de lactate.

II. ADAPTATIONS MÉTABOLIQUES POST-RÉSECTION TUMORALE

A. La résection tumorale prive les cellules invasives résiduelles de leur source carbonée privilégiée, le lactate

Dans les tissus sains, la concentration de lactate varie généralement entre 1,5 à 3 mM mais elle s'élève entre 10 et 30 mM dans les tissus cancéreux [347].

Déjà mis en évidence *in vitro* dans nos précédentes études, la production tumorale de lactate est assurée principalement par le centre glycolytique et hypoxique des sphéroïdes de cellules de GB. En effet, la séparation *in vitro* des populations centrales et invasives de sphéroïdes invasifs P3, par digestion de la matrice de collagène qu'ils envahissent, a montré une différence importante d'expression des LDHs entre la partie centrale (Core) et la partie invasive (Inv), soutenant une localisation centrale de la production de lactate dans le sphéroïde et corrélant avec des marqueurs hypoxiques tels que la CAIX (Fig. 42 A).

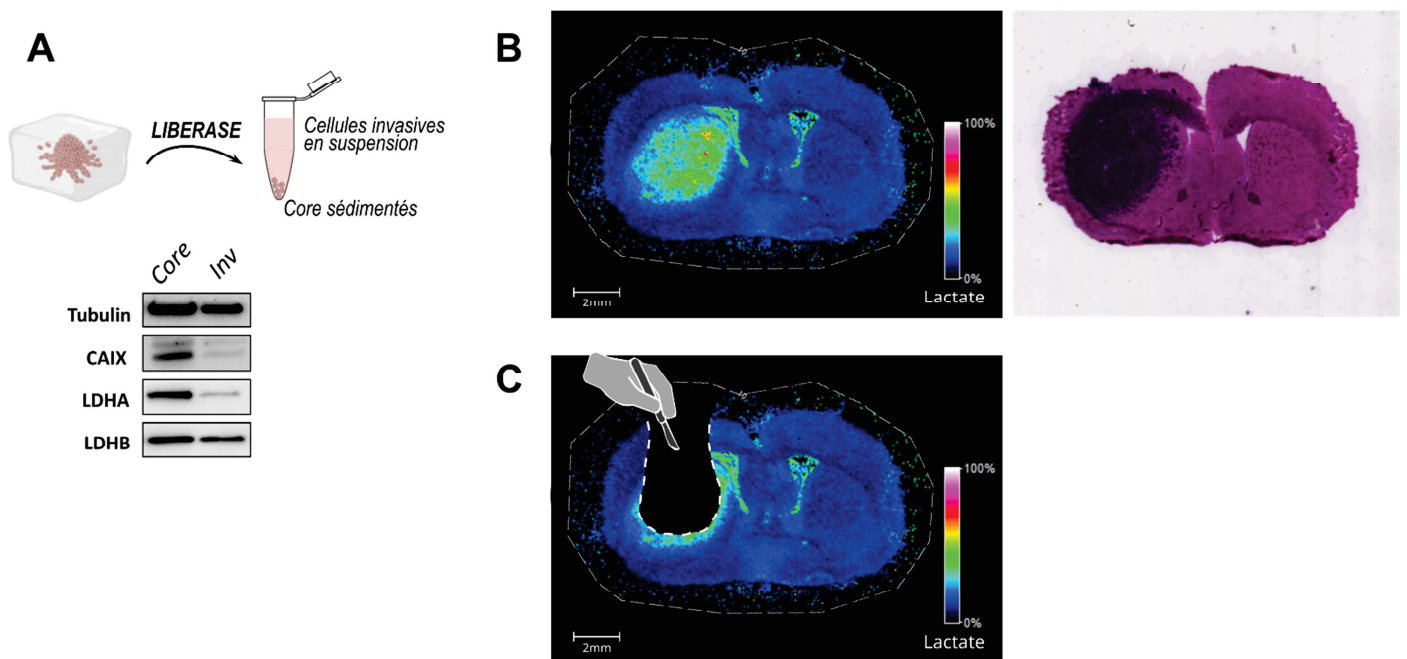


Figure 42 : Détection de la concentration de lactate sur coupes histologiques.

A. Western Blot illustrant les différences d'expression des enzymes LDHA, LDHB et CAIX entre les populations cellulaires centrales (Core) et invasives (Inv) de sphéroïdes P3. Isolation des populations par digestion de la matrice de collagène après 48h d'invasion de sphéroïdes P3. **B. (Gauche)** Concentration de lactate détectée par imagerie par spectrométrie de masse (MALDI-MSI) sur coupe de cerveau murin présentant une tumeur P3. **(Droite)** Correspondante coupe coronale colorée par coloration HPS (Hémalun, Phloxine, Safran). **C.** Objectif de résection chirurgicale de la tumeur appliqué sur image MALDI-MSI correspondante.

Pour mettre en lumière la production de lactate *in vivo* dans les différentes zones tumorales, la concentration de lactate a été visualisée directement sur des coupes de cerveaux murins implantés avec des cellules P3 grâce à la technologie d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI (MALDI-MSI, collaboration avec l'équipe du Dr. Michel Salzet, Lille). Une analyse similaire sur coupes de cerveaux implantés P3 dont la tumeur a ensuite été réséquée est en cours de réalisation. Dans notre modèle, l'imagerie MALDI-MSI identifie clairement la tumeur comme la zone principale de production de lactate intracérébrale et image des concentrations de lactate très importantes (*Fig. 42 B*).

La résection de la masse tumorale, retrait chirurgical de cet important producteur de lactate, induit donc nécessairement une fluctuation de la concentration en lactate dans le parenchyme cérébral et les cellules résiduelles post-résection.

B. La résection tumorale induit des modulations métaboliques dans les cellules résiduelles in vivo

1. Analyse moléculaire de l'expression de gènes métaboliques

Un séquençage ARN a été réalisé sur des échantillons de cerveaux murins implantés avec des cellules P3 et dont la tumeur a été réséquée après 5 semaines de croissance (RES, ou non réséquée pour la condition contrôle, NON RES). Trois zones de chaque condition sont prélevées par microdissection laser pour permettre une analyse différentielle de zones tumorales spécifiques : la zone hypoxique au centre de la tumeur (repousse secondaire dans le cas d'échantillons RES), la zone angiogénique correspondant à une zone vascularisée et oxygénée en bordure de la tumeur et la zone invasive correspondant au front invasif envahissant les corps calleux et migrant vers l'hémisphère controlatéral. Dans ce modèle *in vivo*, seules les zones invasives et angiogéniques (en plus ou moins grande partie selon l'étendue de la résection) sont conservées après résection, et ces reliquats tumoraux repoussent invariablement dès les premières semaines post-résection, jusqu'à reformer une tumeur massive secondaire. Afin d'illustrer les modulations métaboliques dans ces zones résiduelles post-résection, la *Figure 43* présente les différences d'expression de gènes du métabolisme énergétique, entre les zones invasives et angiogéniques RES et NON RES.

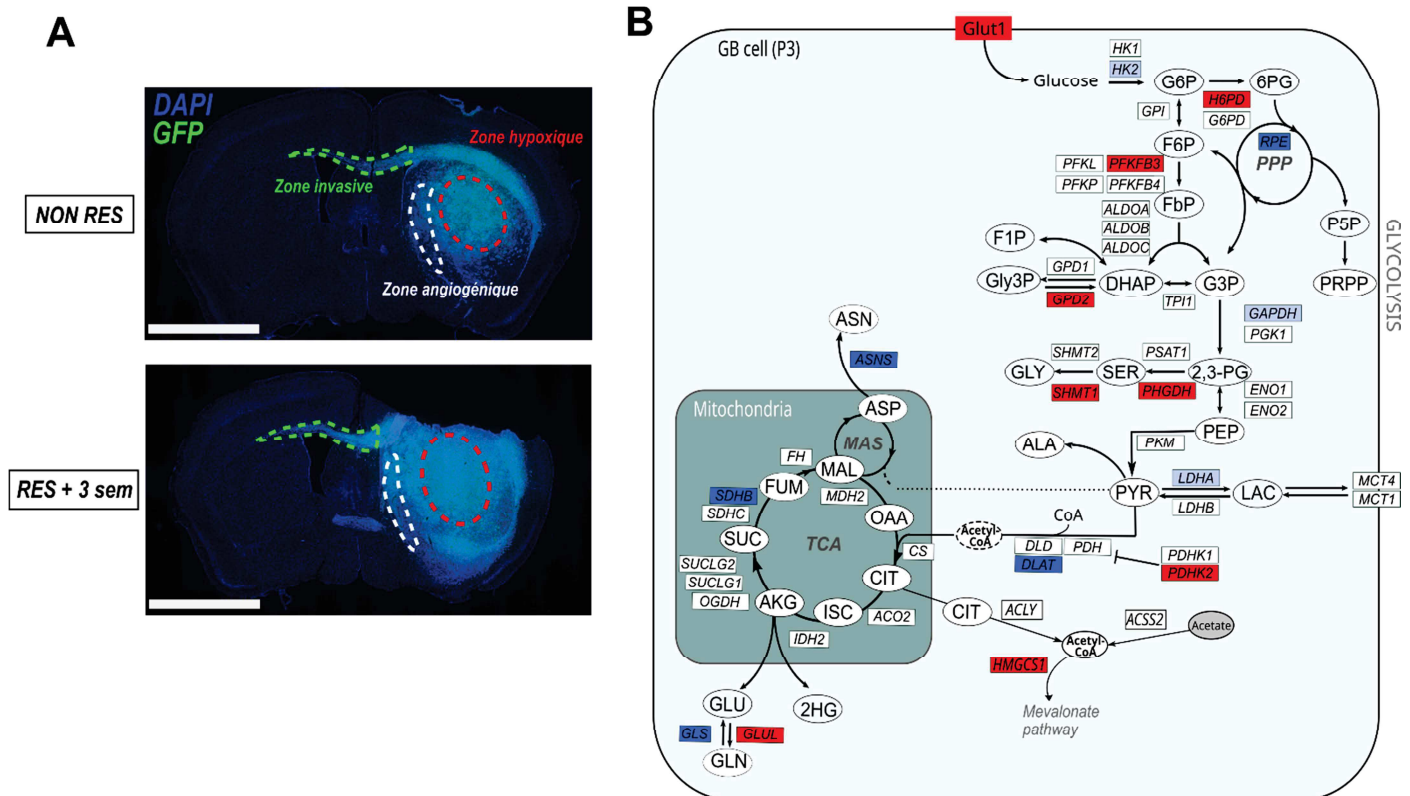


Figure 43 : Impact de la résection tumorale sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et lactate.
A. Représentation schématique des zones de microdissection sur coupes de cerveau murin présentant une tumeur P3 non réséquée (NON RES) ou réséquée (RES). **B.** Représentation graphique de la modulation des gènes codant pour les enzymes du métabolisme énergétique. La modulation des transcrits est analysée par RNASeq à partir d'échantillons microdisséqués des zones hypoxiques, angiogéniques ou invasives de cerveaux murins implantés avec des cellules P3, réséquées ou non après 5 semaines de croissance tumorale et prélevés 2 semaines après résection. Les couleurs foncées (rouge = surexpression, bleu = sous-expression) représentent une différence significative entre échantillons réséqués (RES) versus non réséqués (NON RES) de la zone invasive ou angiogénique ; les couleurs claires présentent les modulations non significatives mais dont la p value < 0.15, uniquement pour la zone invasive. Data analysées par two-way ANOVA pour chaque transcrit ; 3 réplicats biologiques pour chaque condition.

De manière intéressante, on constate une augmentation de l'expression du transporteur du glucose GLUT1 après résection, ainsi que de gènes impliqués dans certaines étapes de la glycolyse (PFKFB3, GPD2) (Fig. 43 B). La résection n'a pas entraîné de modulation transcriptomique significative dans les voies oxydatives mitochondriales mais une légère tendance à la baisse de la majorité des transcrits du cycle de Krebs est observée dans la zone invasive post-résection (data non présentée). On note également une hausse de l'expression des enzymes de biosynthèse de la sérine et de la glycine, dont le pool intracellulaire est impliqué dans la synthèse d'acides aminés et protéines, de phospholipides ainsi que des bases puriques de l'ADN.

Le métabolisme du lactate quant à lui est étonnamment peu régulé au niveau des transcrits des enzymes LDH ou des transporteurs MCT, malgré la fluctuation importante de la concentration de lactate induite par la résection. En effet, nous n'avons observé qu'une légère diminution de l'expression de LDHA et une tendance vers la surexpression de MCT4 post-résection dans la zone invasive.

2. Analyse histologique dans le modèle in vivo de résection

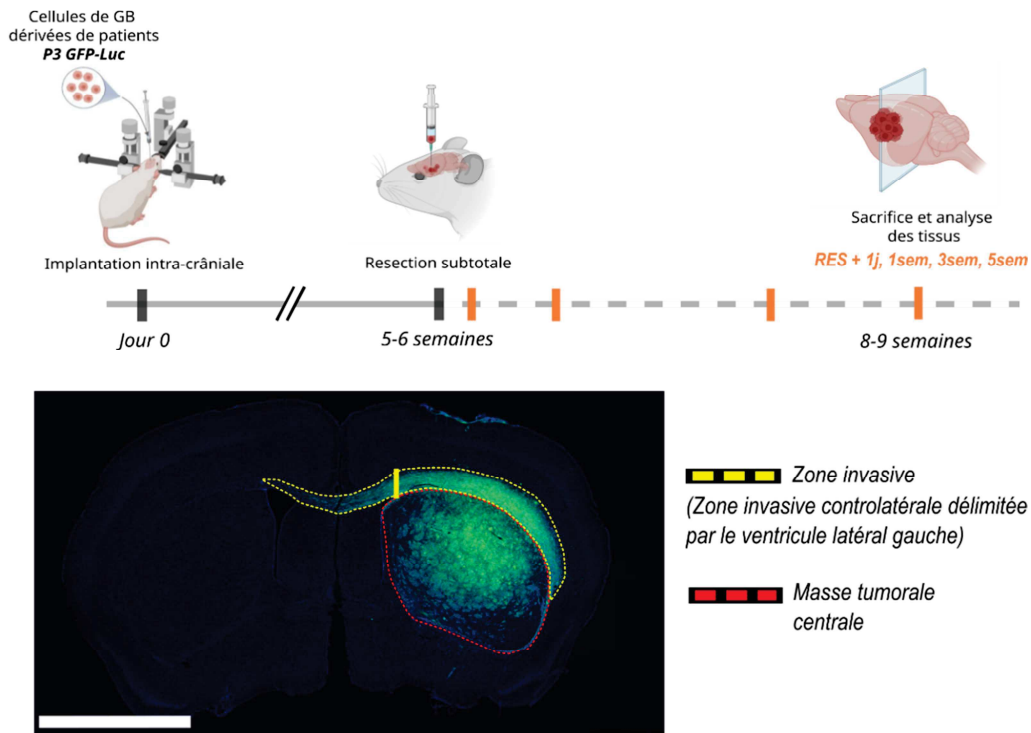


Figure 44 : Protocole d'analyse histologique.

Les échantillons sont récupérés à différents temps post-résection afin d'étudier l'évolution de la repousse tumorale : des cerveaux sont prélevés un jour, une semaine, 3 et 5 semaines après résection.

Les zones centrales (rouge) et invasives (jaune) sont découpées sur la base de repères anatomiques et histologiques. En raison de difficultés techniques dans la délimitation entre population centrale et invasive lorsque la tumeur est massive, la zone invasive controlatérale, arbitrairement délimitée à hauteur du ventricule latéral gauche, sera utilisée pour nos analyses dans la zone invasive. Echelle : 2.5mm.

En parallèle avec les données transcriptomiques, l'analyse histologique des cerveaux réséqués, réalisée suivant le schéma technique présenté en *Figure 44*, ne montre pas ou peu de modulation de l'expression de LDHA dans la tumeur résiduelle post-résection (*Fig. 45 A*). Par contre, l'analyse de la zone invasive échappant à la résection montre une augmentation franche, rapide et durable de l'expression du transporteur du lactate MCT1. Celle-ci n'est que très peu modulée dans les échantillons non réséqués, renforçant l'hypothèse d'une corrélation entre la résection et la surexpression de MCT1 (*Fig. 45 A-B*). De manière intéressante, la zone invasive des cerveaux réséqués montre plus de cellules positives au marqueur de prolifération Ki67, par rapport à condition non réséquée. Cette augmentation est observée pendant les 3 semaines suivant la résection (*Fig. 45 C*) puis semble se stabiliser, suggérant un effet pro-prolifératif dans la zone invasive lié à la résection.

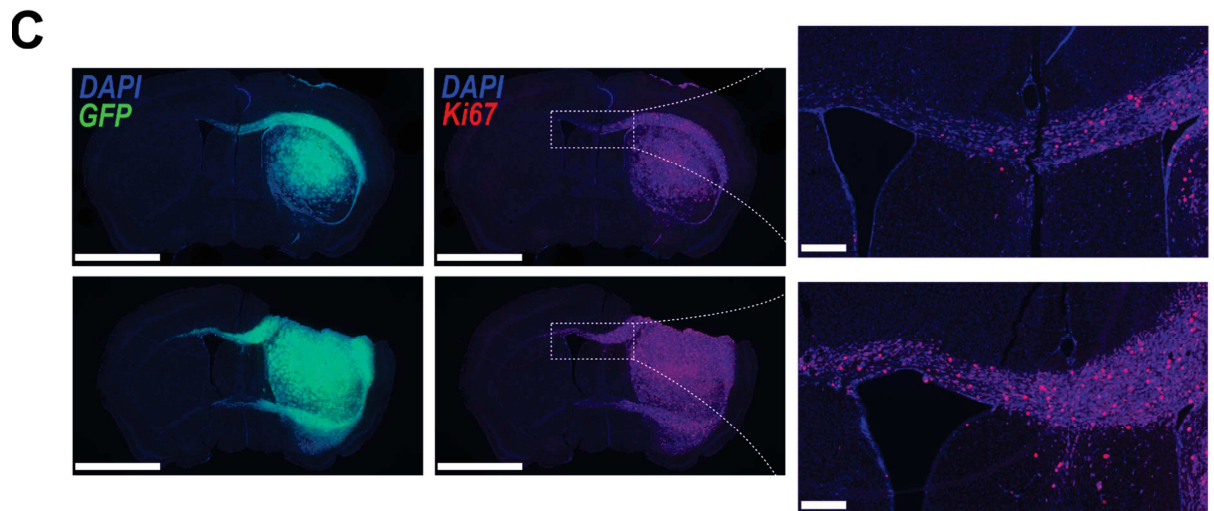
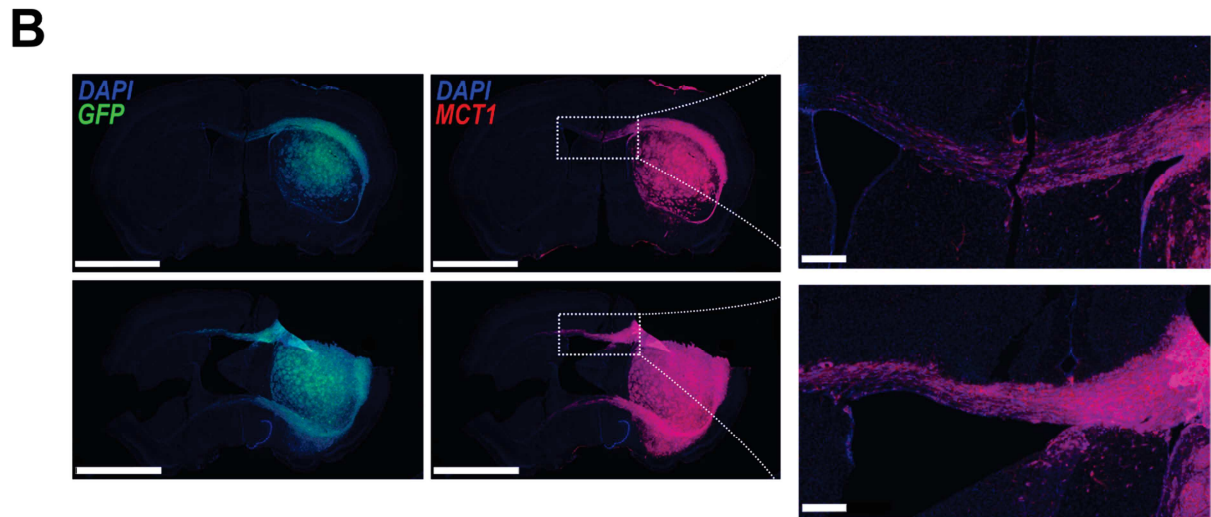
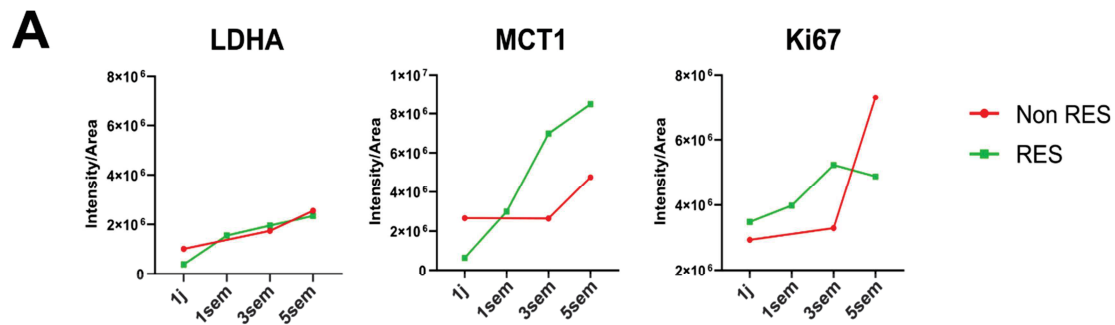


Figure 45 : Analyse immunohistologique de la zone invasive post-résection.

Immunomarquages sur coupes de cerveaux murins implantés avec des cellules P3 et réséqués. **A.** Quantification de l'expression de LDHA, MCT1 et Ki67 dans la zone invasive controlatérale d'échantillons prélevés 1 jour, 1, 3 ou 5 semaines après résection. Les données sont exprimées en intensité de fluorescence normalisée par l'aire de la zone analysée pour chaque condition. **B-C.** Immunodétection de **(B)** MCT1 (rouge) et **(C)** Ki67 (rouge) sur des cerveaux prélevés 3 semaines post-résection (panel du haut : non réséqué ; panel du bas : réséqué). Un zoom de la zone indiquée, centrée sur la zone invasive, est présenté en panel de droite. Un marquage nucléaire au DAPI (bleu) et la fluorescence des cellules P3-GFP (vert) sont imagés sur le panel de gauche. Echelle : 2.5mm et 250 μ m sur les images zoomées (7x).

C. La privation de lactate module l'activité métabolique des cellules P3 in vitro : impact sur les capacités de prolifération et invasion

Afin d'évaluer l'impact métabolique de modulations de la concentration de lactate *in vitro* sur les cellules P3, un état des lieux des concentrations intra- et extracellulaires de lactate a été réalisé en premier lieu, permettant d'étudier les flux de lactate, dans nos différentes conditions expérimentales (Fig. 46 A-D). L'analyse par chromatographie ionique des cellules P3 et leur milieu correspondant a également permis la mesure de la charge adénylique reflet de l'état énergétique cellulaire à 24h et 4 jours de privation de lactate (Fig. 47).

Un traitement au long cours (habituation d'au moins 4-7 jours) avec 10 mM de lactate induit une forte augmentation de la concentration intracellulaire (IC) en lactate dans les cellules P3 Lact 10 (Fig. 46 C), pouvant s'élever jusqu'à 60 mM après 96h d'incubation sans pour autant induire de mortalité cellulaire (data non présentée). Cette augmentation IC de lactate ne coïncide pas avec une augmentation de son excrétion puisque la modulation de la concentration extracellulaire (EC) de lactate est à la baisse par rapport aux cellules P3 wt (Fig. 46 B). Ainsi, les concentrations IC et EC de lactate dans la condition P3 Lact 10 sont en faveur d'une utilisation massive du lactate par ces cellules, même en présence de glucose.

Dès 24h de privation de lactate, la quantification de la concentration IC et EC de lactate montre un retour à la normale, à des valeurs similaires à celles observées pour les cellules contrôles P3 wt. Le pool IC de lactate visible en condition P3 Lact 10, s'élevant à presque 30 mM, est rapidement consommé et/ou excrété : la concentration IC diminue (Fig. 46 C) dès 24h de privation et l'excrétion de lactate augmente de presque 10% par rapport aux cellules toujours en présence de lactate 10 mM (Fig. 46 B). De façon intéressante, cet effet dans les cellules P3 Starv Lact 10 s'efface avec l'augmentation du temps de privation de lactate, appuyant l'hypothèse d'une production de novo de lactate dans les cellules P3 Starv Lact 10 (Fig. 46 B).

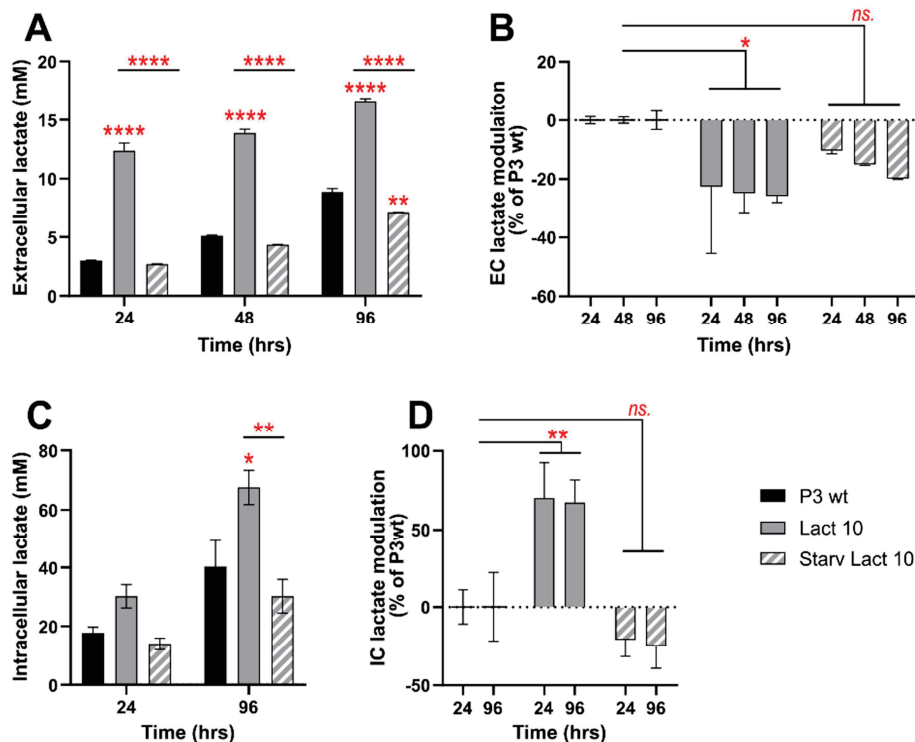


Figure 46 : Concentrations intra- et extracellulaires de lactate dans les cellules P3.

Le dosage métabolique par chromatographie ionique est réalisé en collaboration avec le Dr. Benoit Pinson de la plateforme SAM (Service d'Analyses Métaboliques, IBGC Bordeaux).

A-C. Quantification de la concentration extracellulaire (A) et intracellulaire (C) de lactate dans le milieu des cellules P3 wt, traitées avec 10 mM de lactate (P3 Lact 10) puis privées de lactate (P3 Starv Lact 10) pendant 24h, 48h ou 4 jours. **B-D.** Relative modulation de la concentration extracellulaire (B) et intracellulaire (D) de lactate par rapport à la condition contrôle (soustraction de la quantité de lactate dosée dans le milieu NB seul ou avec 10 mM de lactate sans cellules, à la concentration dosée dans les milieux en contact avec les cellules P3 wt, Lact 10 ou Starv Lact 10). N=3 réplicats biologiques ; data exprimées en mM (A-C) ou en % de la condition contrôle (moyennes \pm SEM), et analysées par two-way ANOVA ; ns. : non significatif, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, **** : $p < 0.0001$.

Ces modulations des concentrations IC et EC de lactate dans nos différentes conditions expérimentales n'ont pas montré de modulation de la concentration intracellulaire en nucléotides adényliques (ATP, ADP, AMP), ni de la charge d'énergie adénylique des cellules, imageant leur potentiel énergétique (Fig. 47).

Les résultats présentés en Figure 47 n'illustrent donc pas de différence de potentiel énergétique entre nos différentes conditions d'expérience à 24h et 96h d'incubation, mais valident une augmentation énergétique avec le temps, associée à la prolifération cellulaire.

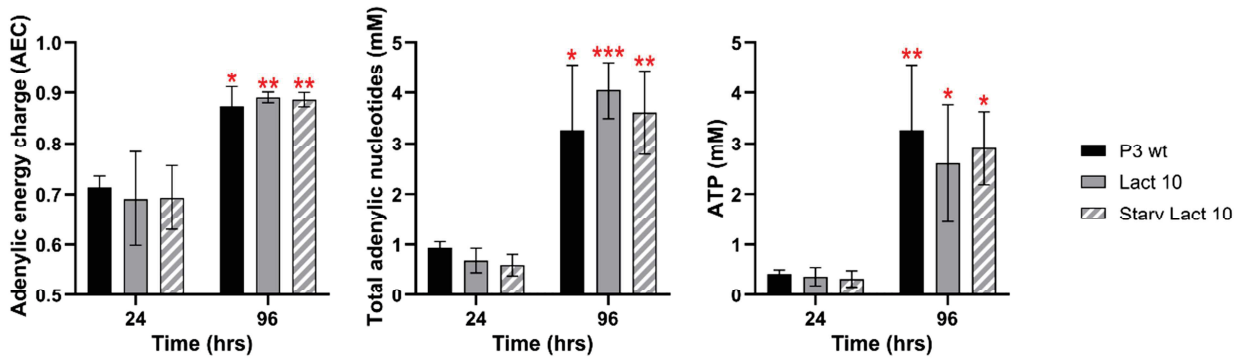


Figure 47 : Contenu adénylique des cellules P3 exposées à des fluctuations de lactate.

Gauche : Charge d'énergie adénylique dans les cellules P3 wt, P3 Lact 10 ou P3 Starv Lact 10 après 24h ou 4 jours d'incubation, calculée par la formule $AEC = ([ATP] + \frac{1}{2}[ADP])/[AXP]$. **Centre :** Somme des concentrations intracellulaires des nucléotides adényliques $[AXP] = [ATP] + [ADP] + [AMP]$. **Droite :** Concentration d'ATP intracellulaire dans les différentes conditions expérimentales. Les data sont exprimées en moyenne \pm SEM ; les statistiques présentées illustrent la comparaison de chaque condition avec son équivalent à 24h d'incubation.

1. Impact sur l'activité mitochondriale

L'analyse de l'activité mitochondriale a été réalisée par la mesure du potentiel de membrane mitochondrial (PMM) grâce à la sonde TMRM (Fig. 48).

Les cellules cultivées en lactate répondent à l'apport de substrat par l'augmentation du PMM, signe d'une activité mitochondriale stimulée. En Figure 48 A, cette augmentation de PMM s'illustre suite au changement du milieu de culture des cellules P3, par un milieu fraîchement complété en lactate, suivi par la mesure 24h plus tard du PMM de ces cellules. Par contre, la privation de lactate de ces mêmes cellules pendant 24h supprime cette stimulation mitochondriale et abaisse à nouveau le PMM à des valeurs comparables à la condition contrôle P3 wt (Fig. 48 A). Ces résultats, conjointement avec nos précédents travaux (Partie I : Symbiose métabolique dans le GB) suggèrent une alimentation directe de la mitochondrie par le lactate, stimulant son activité oxydative et la production d'énergie cellulaire. Ainsi, la privation de lactate impacte directement l'activité mitochondriale, qui se retrouve privée de son substrat principal.

À plus long terme, après 4 jours de traitement ou privation de lactate, une réduction du PMM est observée dans les deux conditions (Fig. 48 B).

Pour s'assurer que l'augmentation du PMM observée relève bien d'une stimulation de l'activité mitochondriale et non pas d'une différence de contenu ou biogenèse mitochondriale, une évaluation du contenu mitochondrial a été réalisée par l'analyse de l'expression de la protéine mitochondriale Tom20. L'expression de Tom20 ne varie pas avec l'ajout de lactate dans nos conditions expérimentales (Fig. 48C). Ainsi, la modulation du PMM induite par la complémentation puis la privation de lactate n'est pas liée à une augmentation/réduction de la quantité de mitochondries dans les cellules P3. Ceci valide bien une modulation de leur activité et non de leur nombre, à la hausse en présence de lactate puis à la baisse dès 24h de privation de lactate.

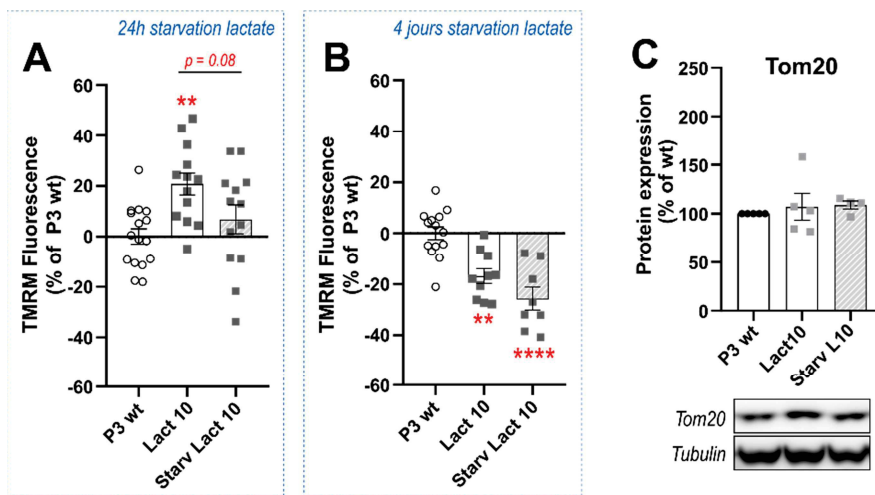


Figure 48 : Activité et contenu mitochondriaux dans les cellules P3 traitées, puis privées ou non de lactate.

A-B. Potentiel de membrane mitochondriale imagé par fluorescence de la sonde TMRM dans les cellules P3 wt, complémentées avec 10 mM lactate (Lact 10), puis privées de lactate (Starv Lact 10) pendant 24h (A) ou 4 jours (B); n=4, 2-4 réplicats par condition. **C.** Contenu mitochondrial évalué par Western Blot de la protéine mitochondriale Tom20; n=5 réplicats biologiques par condition. Data exprimées en % du contrôle (P3 wt) et analysées par one-way ANOVA; **: $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$.

La mitochondrie étant le siège principal de la production de ROS, une évaluation de leur quantité intracellulaire a été réalisée grâce à la sonde CellROX. Parallèlement à l'activité mitochondriale, la modulation de la concentration de lactate est également responsable d'une augmentation de la production de ROS cellulaires, qui est d'autant plus importante que la concentration de lactate augmente (Fig. 49 A, gauche).

Cependant, la privation de lactate à court terme (24h) de cellules P3 habituées à 10 mM de lactate entraîne une forte stimulation de production de ROS, qui est presque doublée par rapport au traitement lactate seul (Fig. 49 A, droite). Cette stimulation ne coïncide pas avec l'activité mitochondriale, réduite avec la privation de lactate (Fig. 48 A), et semble transitoire puisqu'elle est complètement abolie au 4^{ème} jour de privation de lactate (Fig. 49 B). Cette production de ROS transitoire n'altérant pas la viabilité des cellules P3 (data non présentées) suggère des mécanismes de signalisation cellulaire, à la différence d'une surproduction prolongée qui serait plutôt en faveur d'un stress oxydatif pouvant aboutir à la mort cellulaire.

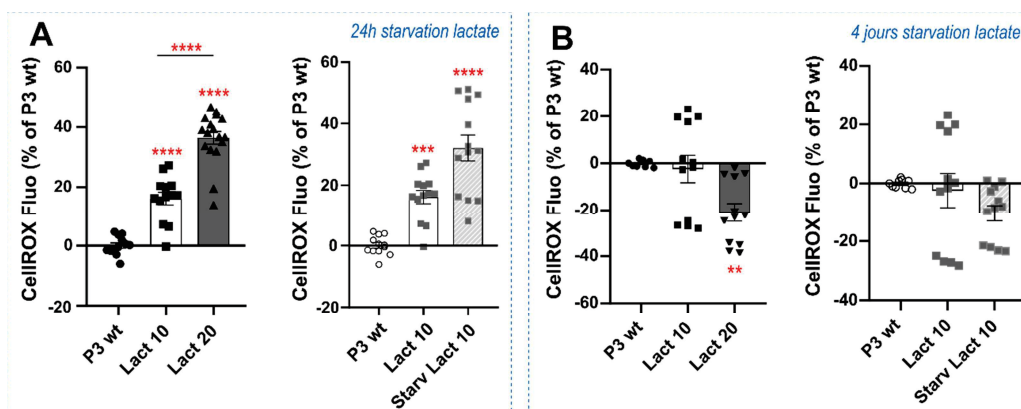


Figure 49 : Influence de la fluctuation de lactate sur la production de ROS dans les cellules P3.

Mesure de la fluorescence de la sonde CellROX imageant la production de ROS dans les cellules P3, traitées à des concentrations croissantes de lactate (schémas gauche) ou privées de lactate (schémas droite) pendant 24h (A) ou 4 jours (B); n = 3, 4-6 réplicats par condition. Data exprimées en % du contrôle (moyenne \pm SEM) et analysées par one-way ANOVA; **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.

2. Effets sur les capacités de progression du GB

De façon étonnante, les capacités pro-invasives du lactate, observées dans nos précédents travaux [126] par traitement aigu avec 10 ou 20 mM de lactate et cohérentes avec une stimulation de la synthèse énergétique mitochondriale, semblent atténuées lorsque ce traitement est réalisé au long cours (*Fig. 50 A*). Par contre, le retrait du lactate du milieu de cellules P3 préalablement habituées à un milieu complété par ce métabolite entraîne la réduction de plus de 10% de l'invasion relative de ces cellules (*Fig. 50 A*).

En parallèle, la prolifération cellulaire, analysée par l'incorporation d'EdU dans les cellules P3 ou par le suivi à plus long terme de la croissance de sphéroïdes, est altérée par un traitement lactate. En effet, une baisse rapide (dès 24h) et stable (jusqu'à 7 jours) de la prolifération cellulaire, d'environ 10-20%, est observée par rapport aux contrôles n'ayant pas reçu de lactate (*Fig. 50 B-C*).

Étonnamment, cette diminution de prolifération semble atténuée dans la condition « starvation Lactate 10 » qui tend à restaurer des capacités prolifératives comparables aux cellules P3 wt après 24h (*Fig. 50 B*) ou 48h de privation de lactate (moins de 5% de différence ; *Fig. 50 C, 48h*).

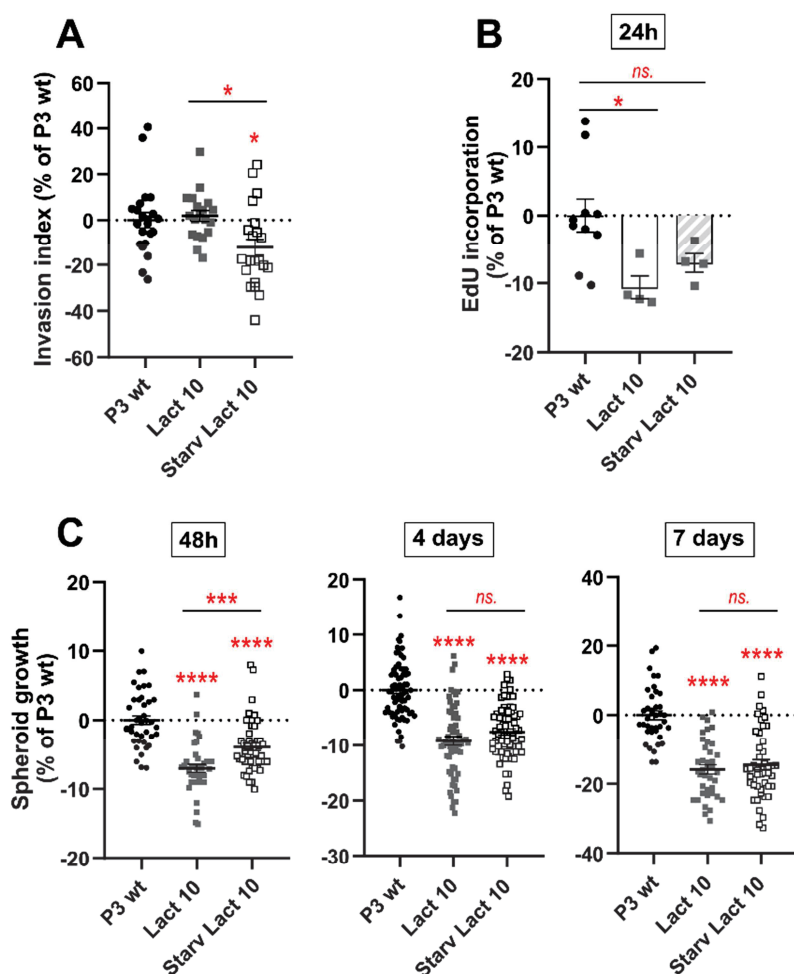


Figure 50 : Capacités invasives et prolifératives des cellules P3 soumises à des fluctuations de lactate.

A. Invasion relative de sphéroïdes P3 inclus dans un gel de collagène type I, en condition de traitement lactate 10 mM ou de privation de lactate ; n=3, 6-8 réplicats par condition.

B. Evaluation de la prolifération des cellules P3 par quantification de l'incorporation d'EdU dans les cellules P3 après 24h de retrait de lactate ; n=3, 1-4 réplicats par condition.

C. Croissance de sphéroïdes P3 wt, traités lactate 10 mM ou traités puis privés de lactate ; n=5, min 8 réplicats par condition. Data exprimées en % de la condition contrôle (moyenne \pm SEM) et analysées par one-way ANOVA ; ns. : non significatif, * : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$, **** : $p < 0.0001$.

Cette différence induite par la privation de lactate tend à s'effacer après plusieurs jours d'incubation (*Fig. 50 C, 4 et 7 jours*). La disparition de cet effet a été notamment imputée à des contraintes techniques : la culture cellulaire étant réalisée en milieu fermé, la production et l'excrétion de lactate par les cellules P3 (présentée en *Fig. 46*) tend à réaugmenter la concentration extra-cellulaire de lactate dans le milieu « *starvation* ». En outre, la croissance des sphéroïdes au-delà d'une certaine taille (500-600 μm) implique l'apparition d'un centre nécrotique et l'instauration d'une pression hypoxique importante [351], stimulant d'autant plus la production glycolytique de lactate. Ainsi après 48h, la concentration de lactate est à nouveau élevée dans le milieu, la condition « *starvation lactate* » n'est plus réellement privée de ce métabolite et les effets précoces/transitoires de cette privation de lactate tendent à s'effacer.

Conjointement, ces résultats confirment que l'approvisionnement en lactate des cellules P3 pousse ces dernières vers la stimulation d'un métabolisme mitochondrial plutôt pro-invasif et défavorisant pour la prolifération cellulaire. Au contraire, la privation secondaire de ce métabolite après habitude des cellules P3 au lactate, c'est-à-dire une fois ces modifications métaboliques bien établies, semble induire un stress transitoire de la mitochondrie, basé sur un signal ROS et relancer un phénotype tourné vers la prolifération, au détriment cette fois de l'invasion cellulaire.

3. Modulations protéiques induites par la privation de lactate

Afin d'identifier les acteurs impliqués dans ce switch phénotypique des cellules P3 en réponse aux modulations de la concentration de lactate, nous avons initié un screening protéique par western blot, ciblant volontairement le métabolisme du lactate, le métabolisme énergétique (glycolyse/OxPhos) et des marqueurs souches pouvant être reliés à la re prolifération cellulaire.

A l'image des résultats obtenus *in vivo*, l'expression des enzymes producteurs du lactate, les LDH, n'est pas modulée par la fluctuation de lactate, à court ou à plus long terme (*Fig. 51 A*). En revanche, il est intéressant de noter que le transporteur MCT1 est à nouveau retrouvé surexprimé après privation de lactate : on observe une tendance à la hausse après 24h de privation de lactate et une augmentation de facteur 2 après 4 jours, suggérant un effet s'installant à plus long terme.

L'analyse du compartiment mitochondrial n'a pas montré de franche modulation de l'expression de différents acteurs. A noter cependant, l'expression de PDHK1, un régulateur clef de l'intégration mitochondriale du pyruvate (étudié dans le projet présenté en Partie I), semble diminuer sous l'influence d'un traitement au lactate (*Fig. 51 B*), en faveur d'une

stimulation du métabolisme mitochondrial. Cette tendance à la baisse n'est pas observée dans les cellules P3 Starv L10 qui expriment des niveaux de PDHK1 comparable au contrôle. De plus, le screening de l'expression de différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale n'a montré aucune différence significative entre nos conditions expérimentales, même si l'on peut remarquer une légère hausse de l'expression des complexes I et IV dans les cellules P3 Lact 10.

En lien avec des travaux mettant en évidence une surrégulation post-résection tumorale de gènes liés au caractère souche des cellules [380], une évaluation de certains de ces gènes a été réalisée dans notre modèle. L'analyse de marqueurs souche tels que Nestin, Sox2, Oct4 ou Olig2 n'a pas montré de modulations convaincantes induite par la fluctuation de lactate (Fig. 51 C). Cependant ces résultats, du fait d'une grande variabilité et d'un faible nombre de réplicats disponibles, seront à reproduire et à compléter d'analyses fonctionnelles afin de conclure sur l'influence de la modulation de la concentration de lactate sur l'état de différenciation des cellules P3.

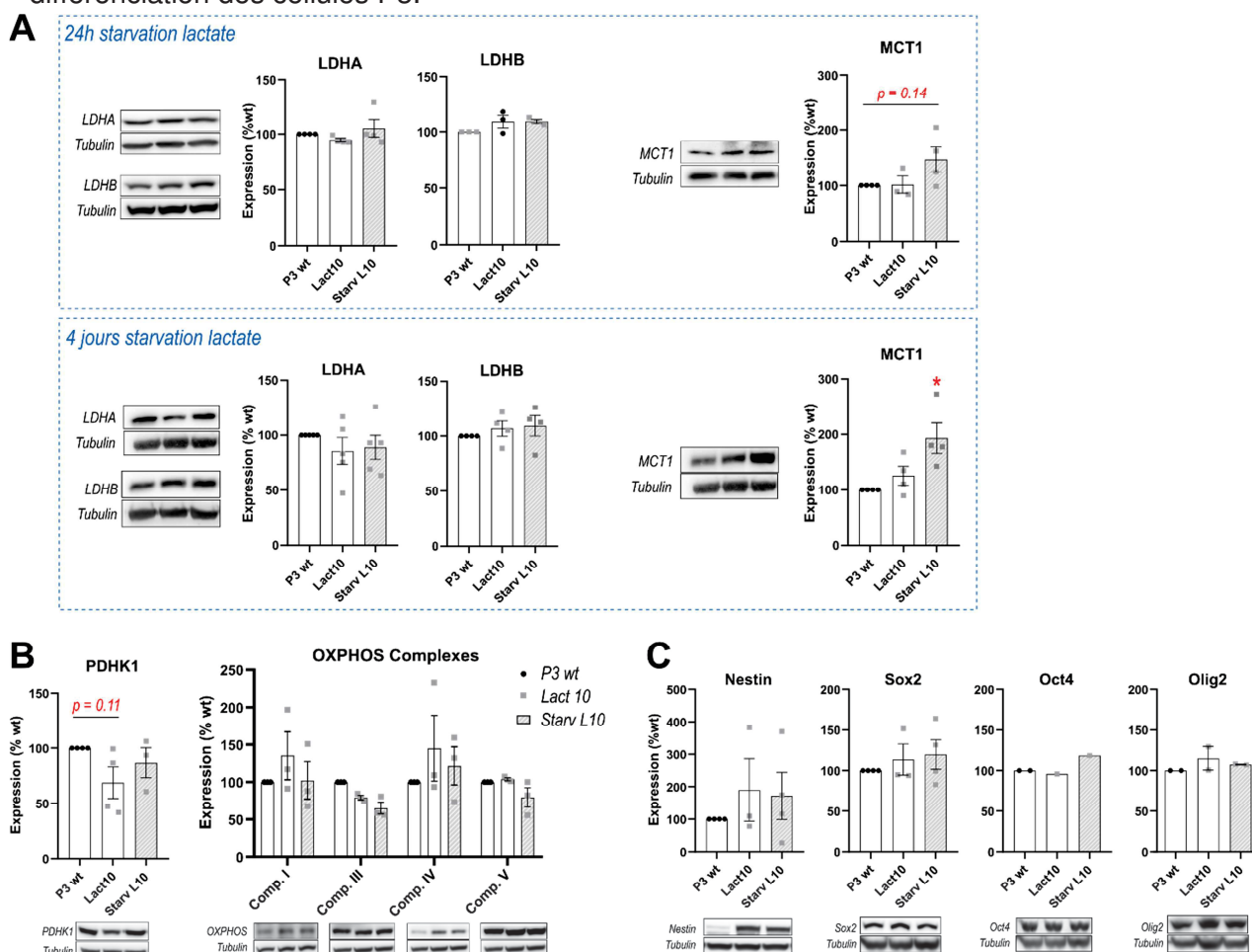


Figure 51 : Screening par Western Blot de l'expression d'acteurs métaboliques dans les cellules P3, complémentées ou privées de lactate.

Analyse par Western Blot de l'expression protéique (A) d'acteurs du métabolisme du lactate (LDHA, LDHB et MCT1) dans les cellules P3 après 24h ou 4 jours de privation de lactate, et correspondante quantification, $n=3-5$ réplicats biologiques ; (B-C) d'acteurs du métabolisme mitochondrial (PDHK1 et les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale) ou de marqueurs souche, après 24h de privation de lactate. Data exprimées en moyenne \pm SEM et analysées par one-way ANOVA ou t-test.

D. Vers une approche thérapeutique : modulation métabolique pour contrer la rechute tumorale

1. Altération de la production ou l'utilisation de lactate : le stiripentol comme thérapie complémentaire à la résection

Déjà testé dans notre modèle de tumeurs P3 *in vivo*, le stiripentol a montré des résultats encourageants chez la souris, freinant drastiquement le développement du GB et améliorant la survie des souris malades (Partie I – I, correspondante publication présentée en Annexe II [126]). Cet inhibiteur des LDH est déjà reconnu pour avoir une bonne pénétration intracérébrale, car initialement commercialisé pour un effet anti-épileptique central chez l'homme [377]. Dans le but de tester l'effet du stiripentol, et donc indirectement du métabolisme du lactate, dans la rechute des GB, nous avons introduit ce traitement dans notre modèle de résection tumorale *in vivo*.

L'administration post-résection de stiripentol aux souris réséquées et non réséquées a permis de réduire modestement la croissance tumorale *in vivo* des tumeurs P3 (Fig. 52). Par contre, l'ajout du stiripentol en traitement complémentaire de la résection n'a pas apporté de bénéfice par rapport à l'effet obtenu dans le groupe non réséqué, nous permettant de conclure à l'absence de synergie entre résection et stiripentol. Une analyse histologique en cours de réalisation pourra confirmer et préciser ces résultats.

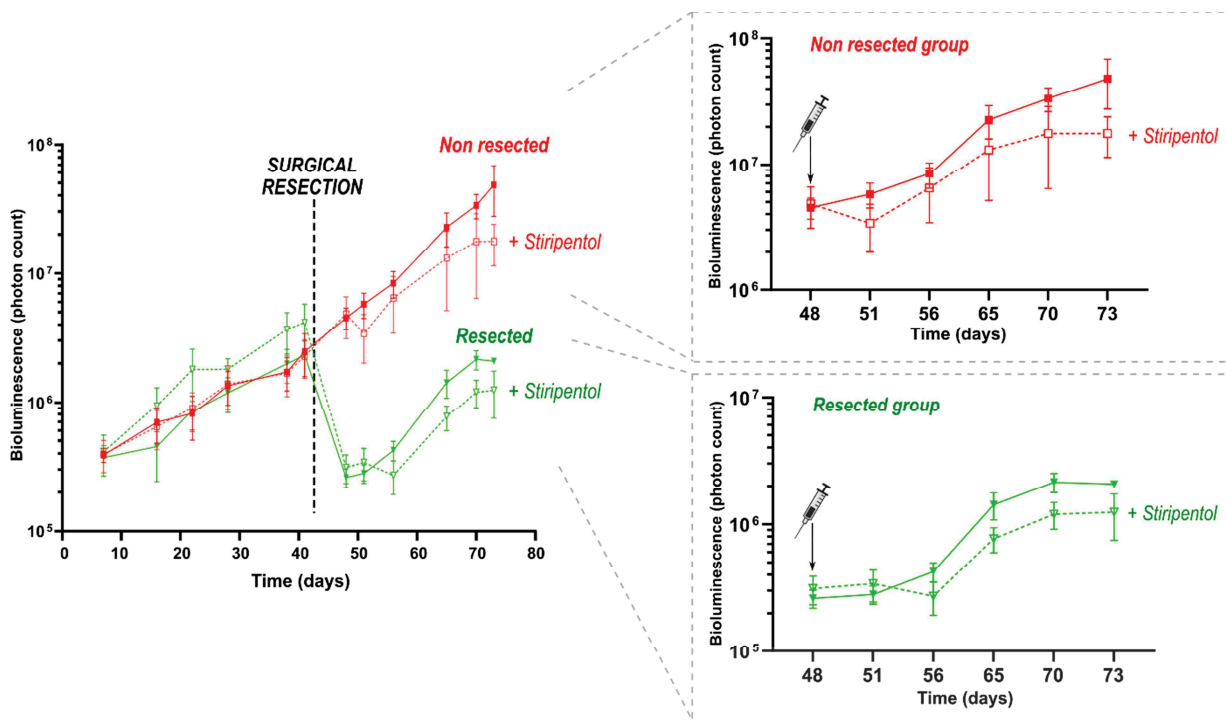


Figure 52 : Influence du Stiripentol sur l'évolution de la croissance tumorale post-résection *in vivo*.

Suivi de croissance tumorale par bioluminescence chez les souris implantées avec des cellules P3, puis réséquées et traitées avec du Stiripentol (150 mg/kg, 3 inj./sem IP) dès la première semaine post-résection. N = 4-6 souris par groupe, data présentées sous la forme moyenne \pm SEM et analysées par two-way ANOVA.

2. Traitement MitoTEMPO : inhibition de la signalisation ROS induite par la résection

Sur la base de la production de ROS observée *in vitro* lors d'une privation de lactate des cellules P3, nous émettons l'hypothèse que ces ROS activent une machinerie intracellulaire (encore à l'étude *in vitro*) permettant de moduler le programme métabolique, et par conséquent le phénotype, des cellules P3. Ainsi, afin de bloquer cette signalisation ROS, un puissant antioxydant ciblant spécifiquement les ROS mitochondriaux, le Mito-TEMPO, a été administré à des souris présentant une tumeur P3 en péri- et post-opératoire (traitement initié la veille de la résection chirurgicale puis tous les jours, y compris le jour de l'opération, garantissant son infusion cérébrale au moment de la résection).

En considérant les données récentes de bioluminescence tumorale, le traitement MitoTEMPO semble ralentir la vitesse de prolifération post-résection, mais de manière non significative au vu d'une grande variabilité interindividuelle dans le groupe non-traité (Fig. 53).

Ainsi, ces données ne nous permettent pas de conclure quant à l'efficacité du traitement MitoTEMPO *in vivo* sur la repousse tumorale du GB post-résection. Des analyses histologiques sont en cours de réalisation afin de préciser d'éventuels effets.

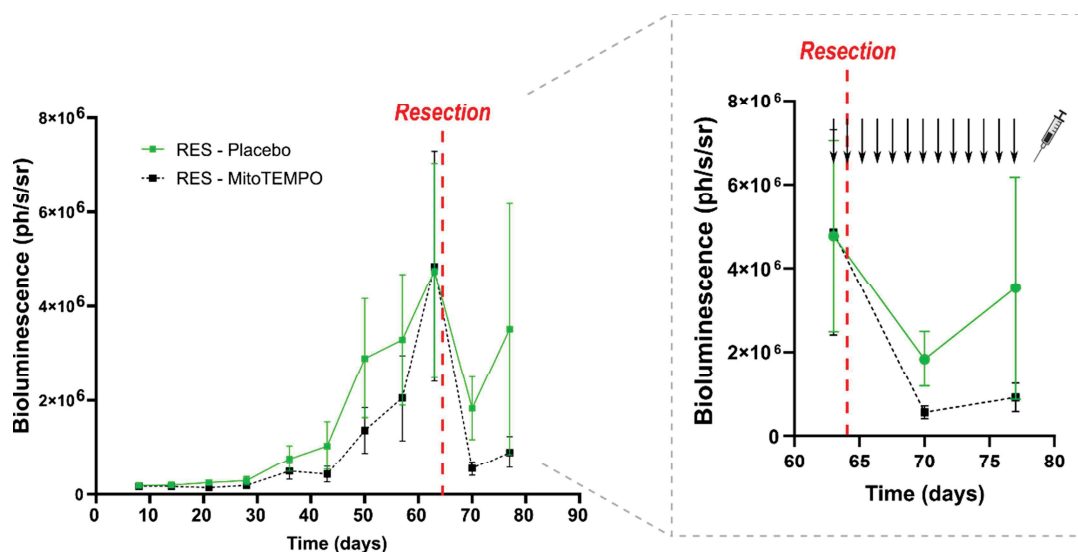


Figure 53 : Influence du traitement MitoTEMPO sur la repousse tumorale post-résection.

Suivi de croissance tumorale par bioluminescence chez les souris implantées avec des cellules P3, puis réséquées (RES). La moitié des souris reçoit un traitement MitoTEMPO (2 mg/kg/j IP), ou son véhicule (PBS), à partir de la veille de la résection puis tous les jours jusqu'au sacrifice. N = 7 souris par groupe, data présentées sous la forme moyenne ± SEM et analysées par two-way ANOVA.

DISCUSSION & CONCLUSIONS

PARTIE I : Symbiose métabolique dans le GB, le rôle central du lactate

Les glioblastomes, comme de nombreux cancers solides, reprogramment leur métabolisme pour soutenir leurs besoins prolifératifs, leur motilité ou pour s'adapter à leur microenvironnement. Cette adaptation métabolique, reconnue comme l'une des caractéristiques du cancer [94], permet en effet de soutenir la production de biomasse, l'approvisionnement énergétique et l'homéostasie intra- et extracellulaire. Le ciblage métabolique des cellules de GB apparaît donc comme une stratégie prometteuse vers l'amélioration des thérapies qui restent encore aujourd'hui relativement peu efficaces chez le patient.

A. Expression spatiale régiolocalisée des acteurs du métabolisme du lactate

Nos premiers travaux soutiennent la théorie du « Go or Grow » [381,382], selon laquelle les cellules cancéreuses, dans notre cas les cellules de GB, s'organisent en une architecture tumorale bien définie permettant des échanges mutuels entre une masse tumorale centrale tournée vers des besoins prolifératifs, et une population périphérique envahissant le parenchyme cérébral sain.

En effet, l'étude de deux régulateurs métaboliques centraux, tout à fait indépendants, les LDHs et les PDHKs, a révélé la mise en place de profils d'expression distincts entre sous-populations tumorales. La zone tumorale centrale est régie par une programmation sous le contrôle de l'hypoxie, environnement appauvri en oxygène qui se développe lorsque la masse tumorale grossit, compliquant ainsi l'accès à l'oxygène et au système vasculaire des zones tumorales centrales [346,383]. Des conditions hypoxiques permettent l'activation d'un régulateur central, le facteur HIF (et notamment HIF1 α pour *Hypoxia Inducible Factor 1 α*), contribuant au comportement des cellules malignes du GB par la promotion de l'angiogenèse, de l'invasion tumorale et du maintien des caractéristiques des cellules souches [139,140]. En outre, HIF1 α est facteur de transcription contrôlant l'expression de nombreux gènes cibles parmi lesquels une part non-négligeable est impliquée dans la régulation métabolique, comme c'est par exemple le cas de LDHA et PDHK1 retrouvé dans nos études mais également de l'hexokinase 2, de la PDH ou des transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT3 ainsi que du lactate MCT4 [330]. En effet, il est largement reconnu que l'hypoxie, via HIF1 α , module le métabolisme cellulaire vers la glycolyse [384], voie de production énergétique ne dépendant

pas de l'oxygène, et donc favorise la production de lactate et l'acidification [385], qui stimule à son tour l'invasion cellulaire [126,346].

Les cellules de la zone invasive, contrairement à celles de la masse tumorale, semblent préférer un métabolisme plus oxydatif, adapté à une production énergétique importante, soutenant leur motilité. Cette stimulation oxydative dans la zone invasive a déjà été documentée dans certains cancers, appuyée notamment par le recrutement de mitochondries *in situ* sur la bordure invasive [386] et leur soutien énergétique aux mécanismes de migration et invasion impliquant une dynamique ATP-dépendante du cytosquelette [387]. Dans le GB, des populations cellulaires hyper motiles isolées à partir de biopsies de patients ont également montré une charge mitochondriale plus importante que leurs homologues moins motiles [338]. Dans ce contexte, nos résultats, montrant une expression accrue de LDHB dans les cellules invasives de GB par rapport au centre tumoral, soutiennent la spécialisation oxydative du compartiment invasif. En effet, LDHB permet alors aux cellules de GB de métaboliser des sources carbonées plus adaptées que le glucose à l'approvisionnement rapide du métabolisme mitochondrial, comme le lactate. Notre analyse fonctionnelle de la mitochondrie dans les cellules de GB a confirmé que ce lactate, rétroconverti en pyruvate par la LDHB, peut directement alimenter le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale, et donc favoriser la production énergétique oxydative. D'autre part, ce fonctionnement oxydatif semble essentiel aux cellules invasives puisque les capacités d'invasion de cellules de GB sont totalement abolies lorsque l'on bloque la chaîne respiratoire mitochondriale avec la roténone, un inhibiteur du complexe I des OxPhos.

Nos travaux soulignent donc, au-delà du rôle de l'hypoxie et de l'acidification tumorale, l'importance centrale du lactate dans la progression du GB, qui se place comme l'un des principaux facteurs métaboliques favorisant les capacités invasives du GB.

L'expression régionalisée des isoformes LDHA et LDHB, observée dans des modèles *in vitro*, *in vivo* ou sur des biopsies de patients, vient renforcer de précédentes observations montrant une régionalisation des transporteurs du lactate MCT1 et MCT4 dans le contexte tumoral [388]. Finalement, nos travaux appuient l'hypothèse de l'établissement d'une symbiose métabolique entre la partie centrale de la tumeur, glycolytique et fortement productrice de lactate, et la zone invasive qui au contraire peut consommer ce lactate pour produire rapidement de l'énergie. Cette hypothèse forme un parallèle avec un modèle déjà établi en neurophysiologie entre les astrocytes et les neurones, le modèle *Astrocyte-Neuron Lactate shuttle* (ANLS) [29]. Dans le GB, une coopération métabolique intra-tumorale entre des cellules de GB glycolytiques et d'autres plutôt oxydatives, centrée sur des échanges de lactate, semble alors tout à fait pertinente (*Fig. 54*).

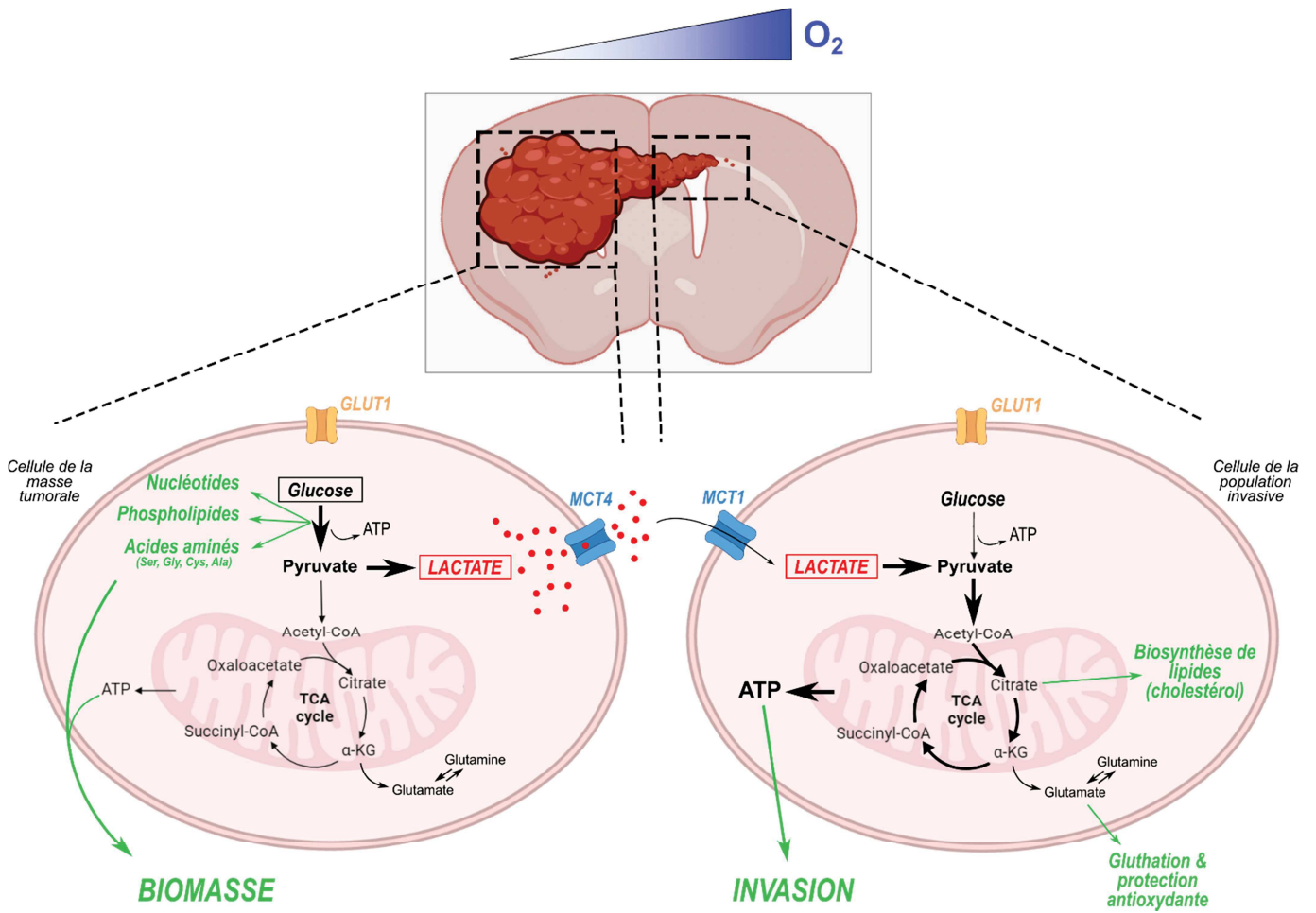


Figure 54 : Symbiose métabolique dans le GB, le rôle central du lactate dans la progression tumorale.

B. Altération du métabolisme du lactate et progression du GB

En outre, la place centrale du lactate dans le développement du GB est appuyée par l'altération de la progression globale du GB lorsqu'on déstabilise le métabolisme du lactate. La disruption directe et conjointe des différentes isoformes des LDHs, grâce à un KO génétique ou par l'action pharmacologique du stiripentol, a en effet montré un ralentissement impressionnant de la croissance et de l'invasion du cancer dans nos modèles *in vitro* et *in vivo* de GB. De manière cohérente avec l'expression différentielle des LDHA et LDHB dans les différentes sous-populations tumorales, mais aussi du fait de possibles compensations inter-isoformes, le knock-out d'une seule isoforme ne permet pas de freiner efficacement la progression du GB dans nos modèles. Étonnamment, le KO de LDHB a même montré la mise en place d'un phénotype plus agressif *in vitro* et *in vivo*. Cet effet a finalement été attribué à l'augmentation de la concentration de lactate (qui n'est plus rétroconverti par la LDHB) et de l'acidité extracellulaire *via* un cotransport protons/lactate par les MCTs, stimulant par conséquent l'invasion et la production de VEGF, et aboutissant à la mise en place de tumeurs plus invasives et angiogéniques. Finalement, un ciblage conjoint des deux isoformes est nécessaire pour abolir conjointement la production et l'utilisation du lactate, et ainsi déstabiliser la symbiose métabolique mise en place dans la tumeur de GB.

Parallèlement, le blocage des PDHKs lève l'inhibition exercée sur la PDH et permet ainsi l'intégration du pyruvate dans la mitochondrie et dans le cycle de Krebs. Dans les cellules cancéreuses qui majoritairement sur-régulent la glycolyse, par le biais d'une pression hypoxique ou par la mise en place de l'effet Warburg, l'inhibition des PDHKs montre un effet important, défavorisant les voies métaboliques glycolytiques au profit du métabolisme oxydatif. Dans le GB, le blocage de ces enzymes régulateurs a en effet montré une baisse du taux d'acidification extracellulaire corrélé à une baisse de la production de lactate, et a également permis de ralentir la progression du GB. Les effets observés *in vivo* sont cependant moins francs que pour le double-KO LDH, certainement du fait d'une simple modulation (et non d'un blocage total) du métabolisme du lactate, induite dans le cadre du blocage PDHK. Il faut néanmoins noter l'effet drastique du KO PDHK2 sur l'invasion du GB *in vitro* et *in vivo*, qui interroge sur le rôle spécifique de cette isoforme dans les processus d'invasion cellulaire et nécessitera de plus amples investigations pour décrypter les mécanismes mis en jeu dans cette interaction.

Ainsi, le métabolisme du lactate montre un rôle central dans le développement du GB et représente alors une piste prometteuse pour un ciblage thérapeutique. Comme nos premières approches pharmacologiques le démontrent, l'altération du métabolisme du lactate pourrait être une voie d'intérêt en clinique où les pistes thérapeutiques contre le GB restent encore aujourd'hui relativement pauvres et peu efficaces pour les patients.

C. Plasticité métabolique thérapie-induite : quand les cellules de GB s'adaptent pour échapper aux traitements

Si cette organisation métabolique spatiale, centrée autour d'échanges de lactate, semble être bien établie dans le GB, la théorie du « Go or Grow » se révèle finalement un peu simpliste, affirmant notamment la mutuelle exclusivité des programmes prolifératifs ou invasifs [389,390]. Plus certainement, l'importante plasticité des cellules de GB leur permet d'adapter leur phénotype entre prolifération et invasion [382,391], créant une dynamique métabolique complexe et mouvante, en fonction des signaux intercellulaires (comme le lactate) mais aussi des besoins cellulaires et de différents facteurs du microenvironnement. Dans le vaste concept de microenvironnement s'intègrent les influences des autres types cellulaires locaux autour de la cellule de GB, qu'ils soient tumoraux ou non, dérégulés ou non ; les facteurs environnementaux non-cellulaires impactant la cellule de GB, comme les constituants de la MEC, les gradients d'oxygène, de nutriments, de facteurs de croissance ; mais également, lorsque la phase thérapeutique est initiée, l'influence des traitements ciblant directement les cellules de GB. En effet, plus secondairement aux mécanismes métaboliques entrepris pour se développer, le GB tend à nouveau à moduler son métabolisme pour échapper et survivre aux traitements anticancéreux.

Cette faculté de flexibilité en réponse à la thérapie représente l'un des principaux défis actuels quant à la résistance aux traitements, expliquant secondairement les rechutes systématiques du GB. Si la communauté scientifique a longtemps considéré cette résistance aux traitements comme découlant d'une sélection de clones ou de phénotypes résistants, de nombreux travaux identifient désormais des mécanismes d'adaptation des cellules vers un phénotype plus résistant, et donc une plasticité thérapie-induite. D'autre part, très peu de nouvelles altérations génétiques ou épigénétiques ont été détectées dans les tumeurs récurrentes [276], indiquant un rôle restreint de la génétique dans la résistance thérapeutique et suggérant à nouveau un mécanisme d'adaptation de la tumeur primaire. Notamment, il a été défini que le sous-type tumoral initial, basé sur une caractérisation moléculaire et associé à un certain phénotype (voir partie Classification des GB), change chez 63% des patients lors d'une récurrence tumorale après thérapie [275] et favorise généralement un sous-type mésenchymateux plus agressif. De manière intéressante, les thérapies radio- et chimiothérapeutiques ont également montré un effet sur le statut de différenciation de cellules de GB, favorisant leur dédifférenciation et leur tumorigénicité [279], sur la promotion de leur quiescence [97], ou encore entraînant leur adaptation métabolique [392,393].

Cette plasticité thérapie-induite s'illustre également dans nos travaux par la mise en place d'adaptations métaboliques, notamment mitochondriales, permettant aux cellules de survivre malgré les traitements.

En effet, le double KO de LDHA et LDHB a montré une réorganisation du compartiment mitochondrial, sous la forme d'une augmentation de l'expression de différents complexes OxPhos, de l'augmentation de la masse mitochondriale et de la capacité maximale respiratoire. Ces effets, cohérents avec la stimulation de la biogenèse mitochondriale, illustrent une réadaptation métabolique du GB en réponse au blocage de la voie fermentaire. Également, les cellules LDHA/B KO montrent une accumulation d'intermédiaires métaboliques glycolytiques et du cycle de Krebs. Notamment, l'excédent de pyruvate n'ayant plus la possibilité d'être transformé en lactate, doit donc être intégré dans la mitochondrie, expliquant ainsi la stimulation de son activité et de sa biogenèse. La mitochondrie ne pouvant cependant pas assurer le même rythme d'oxydation du pyruvate que les LDH, une partie de cet excès de pyruvate est donc redirigé vers d'autres métabolismes. La production d'acétate à partir du pyruvate, médiée par l'action des ROS (H₂O₂) [394], semble tout à fait plausible dans les cellules LDHA/B KO, puisqu'une augmentation de l'activité mitochondriale entraîne possiblement une production de ROS et qu'une surproduction d'acétate est observée suite à l'extinction des LDHs (data non présentée dans la Partie I – I, voir Annexe II [126]). Une élégante étude de Mashimo et ses collègues a de plus montré, par le biais d'une infusion de [¹³C]acétate *in vivo* mais aussi chez le patient, que le métabolisme de l'acétate, permettant notamment la production d'acétyl-coA, participait à l'approvisionnement du cycle de Krebs dans les GB [334]. Ce métabolite pourrait alors représenter un acteur essentiel de cette adaptation métabolique thérapie-induite, qui peut d'une part assurer des fonctions propres comme l'acétylation des protéines ou participer à la lipogenèse, mais également être une source carbonée alternative en cas de nécessité ; une certaine forme de stockage énergétique pour la cellule de GB.

Le blocage des PDHKs *in vitro* a également entraîné des adaptations métaboliques au niveau mitochondrial. En effet, si un simple KO de PDHK1 ou PDHK2 n'a pas montré d'effet sur l'activité mitochondriale, l'inhibition de toutes les isoformes PDHK par l'action du dichloracétate (DCA) entraîne *in vitro* une augmentation de l'OCR (oxygen consumption rate) mesuré par Seahorse. L'analyse approfondie par oxygraphie de l'effet du DCA à plus long terme a révélé une augmentation de la respiration mitochondriale mais uniquement en conditions découplées, révélant les capacités respiratoires maximales des cellules. De plus, le DCA induit une augmentation de la sensibilité des cellules de GB à la roténone, suggérant une réorganisation des flux respiratoires de la chaîne respiratoire mitochondriale vers le complexe I qui corrèle avec une augmentation de la production de ROS. Nos résultats,

identifiant ainsi le complexe I des OxPhos comme une cible intéressante pour un cotraitement, forment un parallèle avec les travaux de Ward *et al.*, montrant un effet additif de l'inhibition du complexe I par la metformine avec un traitement DCA [395]. Cependant, les adaptations induites par l'inhibition complète des PDHKs *in vitro* dans nos modèles cellulaires de GB suggèrent une réaction de stress métabolique, imagées par une augmentation massive des ROS et une fragmentation du réseau mitochondrial, plutôt qu'une adaptation pour leur survie.

Malgré tout, même si les capacités prolifératives et invasives du GB sont largement ralenties *in vitro* par un traitement DCA, des tests de viabilité infirment une action cytotoxique dans nos modèles de GB, allant à l'encontre de précédents travaux montrant une activation apoptotique dans les cellules tumorales soumises au DCA [396,397]. De plus, le traitement *in vivo* au DCA de souris implantées avec des cellules type souche de GB n'a étonnamment montré aucun effet anti-cancer en comparaison aux souris contrôles, réduisant même au contraire la survie des souris. Cet effet, ou plutôt cette absence d'effet, pose question puisqu'il se place encore une fois en désaccord avec la littérature [396], qui a déjà permis à cette molécule de franchir la barre de la clinique pour différentes pathologies métaboliques mais aussi plus récemment pour le traitement du cancer [398], et même en évaluation dans le GB [399]. Cependant, bien que des essais de phase I et II évaluant l'effet du DCA dans le cadre du traitement des tumeurs cérébrales primaires ou récurrentes [399] aient été lancés, les données cliniques ou pré-cliniques sur l'efficacité du DCA dans le GB restent pour l'instant relativement pauvres. L'absence de concordance entre les effets *in vitro* et *in vivo* du DCA dans notre étude n'a pas fourni d'explication claire mais plusieurs hypothèses sont envisagées. Parmi elles, la possibilité d'une sous-dose cérébrale de DCA, du fait d'une biotransformation trop rapide, n'a pas été écartée par dosage direct dans le LCR mais ce désagrément est normalement évité par le biais de l'administration chronique de DCA [400]. De plus, de meilleurs systèmes de défense antioxydants *in vivo*, des cellules de GB elles-mêmes ou grâce à un appui du microenvironnement, pourraient participer à contrer de manière plus efficace les effets oxydatifs du DCA et donc expliquer son impact moindre *in vivo* en comparaison avec les résultats *in vitro*. Pour finir, l'apparition d'un potentiel effet indésirable non détecté pourrait expliquer l'altération de la survie des souris traitées au DCA ; aucun signe de neuropathie DCA-induite (effet indésirable déjà connu [401]) n'a cependant été observé.

D. Perspectives thérapeutiques

L'importance de la régulation métabolique dans le GB est notamment appuyée par l'identification, plus ou moins récente, de dérégulations métaboliques participant à son développement. On peut noter, par exemple, des régulations métaboliques par l'intermédiaire

d'oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur, ou encore des mutations spécifiques de gènes codant pour des enzymes métaboliques, comme c'est le cas de la mutation IDH désormais utilisée comme marqueur diagnostique, pronostique et prédictif de l'efficacité des traitements en place.

Finalement, l'étude des vulnérabilités métaboliques du GB a permis d'ouvrir de nouvelles pistes pour le traitement de cette pathologie dont l'éventail de thérapies proposées et leur succès thérapeutique est encore très limité. Une palette d'essais cliniques et d'études précliniques prometteurs a vu le jour ces dernières années, évaluant l'efficacité du ciblage de différentes voies métaboliques cellulaires dans le GB [402]. Cependant, aucune amélioration clinique significative n'a pour l'instant été constatée. Différentes interrogations et challenges émergent notamment de cette stratégie de ciblage métabolique. Parmi elles, la question de la spécificité de ciblage est importante. En effet, de plus en plus de travaux, y compris les nôtres, appuient la cohabitation intratumorale de programmes métaboliques différents, participant chacun à la progression du GB. Ainsi, les cellules tumorales, et notamment dans notre cas les cellules de GB, utilisent simultanément différentes voies métaboliques, ce qui questionne sur l'efficacité des approches mono-ciblées. D'autre part, ces voies métaboliques sont également communément empruntées par les cellules saines pour leur propre métabolisme et leur survie, soulevant donc la question d'éventuels effets indésirables pouvant être un problème de taille dans le contexte du SNC.

Ainsi, nos travaux et bien d'autres, du fait de l'hétérogénéité et de la plasticité des cellules de GB, suggèrent le ciblage conjoint de plusieurs voies métaboliques pour produire un effet synergique et pousser les cellules de GB vers une impasse métabolique. Notamment, dans le modèle de cellules de GB LDHA/B KO, un cotraitement avec de la phenformine, un inhibiteur du complexe I des OxPhos, a été testé *in vivo* mais n'a pas augmenté la mortalité des cellules de GB ni la survie des souris traitées (data non présentées, voir Annexe II [126]). L'augmentation de l'expression des autres complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les cellules KO pour LDHA et LDHB nous laisse notamment penser à un effet compensatoire de ces autres complexes pour maintenir l'activité mitochondriale. Un blocage conjoint des complexes I et II, à l'origine de la formation de différents supercomplexes fonctionnels de la chaîne respiratoire, ou bien de complexes plus en aval (III-V), pourrait donc être envisagé.

Cela dit, un couplage du blocage des LDHs avec d'autres thérapies, telles que l'irradiation crânienne *in vivo*, a au contraire montré un effet synergique encourageant (voir Annexe II [126]), et représente de plus une piste cohérente avec le protocole thérapeutique établi en clinique chez le patient.

PARTIE II : Adaptations métaboliques post-résection tumorale

L'hétérogénéité intratumorale du GB, ainsi que son incroyable plasticité au niveau métabolique, restent à ce jour le grand défi invalidant l'efficacité des traitements. La distribution des sous-populations tumorales, sur le plan anatomique mais aussi métabolique, est en effet affectée lors de la croissance et de l'évolution tumorale, mais également lors de la mise en place des traitements. Cette plasticité thérapie-induite, observée dans nos études dans le cadre de traitements ciblant le métabolisme du lactate, est également particulièrement problématique dans le cadre des thérapies actuellement en place chez le patient.

Ainsi, en considérant la prise en charge du GB dans sa réalité clinique, l'adaptation métabolique des cellules de GB post-résection tumorale nous a particulièrement interrogé. En effet, le diagnostic des patients atteints de GB étant souvent tardif, la mise en place du traitement est donc urgente et la résection tumorale, lorsqu'elle est possible, est presque toujours la première intervention thérapeutique. Acte traumatique et invasif pour le patient, l'exérèse de la masse tumorale induit aussi des perturbations pour la tumeur elle-même puisqu'elle désorganise complètement l'architecture morphologique et métabolique mise en place lors de la croissance du GB et soutenant sa progression. Le décryptage des mécanismes adaptatifs, notamment métaboliques, mis en jeu dans la population tumorale résiduelle après la résection de la tumeur semble alors d'un intérêt particulier pour mieux comprendre et prévenir la rechute du GB.

A. Résection tumorale et métabolisme du lactate

La résection tumorale consiste, comme son nom l'indique, en l'exérèse chirurgicale de la masse tumorale. Elle est d'un intérêt central pour le patient puisque l'étendue de cette résection a été cliniquement corrélée à une modulation de son pronostic et de sa survie globale ; amenant d'ailleurs le groupe d'étude RANO à proposer récemment une classification des patients GB basée sur la mesure de la résection tumorale [169]. Première étape du protocole de Stupp, elle est presque systématiquement et le plus rapidement possible mise en place chez le patient. Bien sûr, en cas de bénéfice/risque évalué en sa défaveur, souvent à cause de la localisation intracrânienne sensible du GB, la résection peut être retirée du protocole thérapeutique ; cependant les patients GB non-opérés sont ceux associés au plus mauvais pronostic [169].

Pourtant, et malgré la progression des techniques neurochirurgicales et le développement des exérèses « supra-maximales » [169,403], c'est-à-dire au-delà des limites de la prise de contraste sur IRM, la résection tumorale laisse derrière elle une population cellulaire du GB capable de survivre et repousser puisque le GB montre invariablement une progression secondaire, souvent encore plus agressive que la tumeur initiale. Les clichés IRM post-opératoires confirmant le retrait parfois supra-total de la tumeur, cette population résiduelle correspondrait alors aux cellules ayant envahi à distance de la tumeur principale, probablement en *single cell* ou de manière diffuse et non détectable par IRM (Fig. 55).

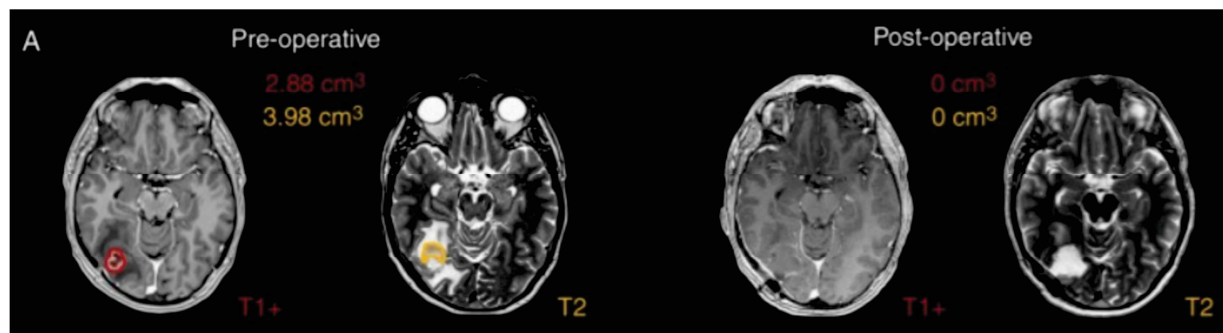


Figure 55 : Clichés IRM pondérés T1 et T2 avant et après résection tumorale de GB (d'après Karschnia et al., 2023 [169]).

Nos précédents travaux ont validé la présence d'une architecture métabolique précise dans le GB [126], identifiant la masse tumorale comme hypoxique et glycolytique, et la population invasive tournée en contraste vers un métabolisme oxydatif.

La visualisation *in situ* du lactate par imagerie spectrométrique a confirmé la surproduction de lactate dans la masse tumorale de modèles murins de GB orthotopiques, en accord avec des études basées sur l'infusion de [¹³C]glucose chez des patients atteints de GB [336]. Un retrait de cette tumeur, dont l'efficacité moyenne est évaluée dans nos modèles murins à 85%, entraîne donc nécessairement une chute de la concentration de lactate intracérébrale post-résection. En parallèle avec nos deux premiers projets, où le blocage des LDHs ou des PDHKs entraîne une baisse de la production de lactate et un conséquent remodelage métabolique, l'hypothèse d'une adaptation métabolique des cellules de GB post-résection, également liée à cette privation de lactate, semble alors tout à fait pertinente.

B. Établissement et validation de modèles *in vitro* et *in vivo* d'études pour la résection du GB

Bien que la résection tumorale du GB soit une étape clé du protocole de Stupp, le manque de modèles animaux intégrant cette étape opératoire est flagrant et constitue un réel manque pour l'étude des conséquences de la résection, du protocole Stupp complet ou plus

largement, pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques dans le GB. En effet, en considérant l'importante plasticité des cellules de GB, et la part non-négligeable de celle-ci induite par la thérapie, la mise en place de modèles se rapprochant au plus près des conditions cliniques semble indispensable.

Cependant, le développement de modèles d'études permettant de reproduire la résection tumorale intracérébrale, et la fluctuation de la concentration de lactate qu'elle entraîne, est un défi. *In vivo*, nous avons mis en place un modèle d'exérèse chirurgicale basé sur un protocole de Le Reste *et al.* [363]. Notre modèle de résection a été développé et adapté sur un modèle de souris immunodéficientes, permettant ainsi l'étude de GB issus de cellules dérivées de patients (implantées de manière orthotopique). En effet, le modèle cellulaire utilisé, cellules type souche de GB issues de patient et cultivées dans un milieu favorisant la conservation du caractère souche, reproduit plus fidèlement les caractéristiques cliniques de progression du GB (*in vitro* et *in vivo*) que les modèles de lignées cellulaires immortalisées dérivées en culture avec sérum depuis de nombreuses années, comme c'est le cas par exemple des U87-MG [114]. Pour finir, la standardisation du modèle *in vivo* de résection grâce à des techniques de bioluminescence tumorale a permis d'obtenir des échantillons *in vivo* reproductibles montrant la formation de tumeurs similaires, assurant la fiabilité de nos études par la suite.

Un modèle *in vitro*, permettant une étude mécanistique et métabolique plus simple des cellules de GB, a également été mis en place : l'habituation de cellules type souche de GB dérivées de patients à des concentrations de lactate cohérentes avec celles observées chez l'homme dans les cellules cancéreuses (10-30 mM [347]) puis leur privation totale de ce lactate, a ainsi permis de mimer *in vitro* la fluctuation de lactate associée à la résection.

C. Conséquences métaboliques et phénotypiques de la privation de lactate liée à la résection

Si un phénotype axé sur un métabolisme mitochondrial a déjà été associé par Garofano et ses collègues à un meilleur pronostic (ou du moins à un sous-type de GB moins agressif) [123], ce sont pourtant les cellules invasives, dont le métabolisme est principalement tourné vers ces voies oxydatives mitochondriales, qui échappent à la résection et semblent être à l'origine des récurrences. En effet, chez le patient, cette population tumorale résiduelle, en échappant également aux traitements radio- et chimiothérapeutiques, est systématiquement capable de basculer vers un phénotype prolifératif et de reformer une nouvelle tumeur [172]. A noter, les cellules souches de GB au sein de cette niche invasive sont particulièrement d'intérêt puisqu'elles ont montré d'importantes capacités de résistance aux thérapies, devenant ainsi les principales candidates pour expliquer les récurrences [97,98,250,392].

Notre modèle *in vitro* de fluctuation de lactate dans les cellules de GB a permis de mettre en avant une importante activité de la mitochondrie en présence de lactate, parallèlement corrélée à une forte augmentation de la concentration intracellulaire et une diminution de la concentration extracellulaire de lactate par rapport aux cellules contrôle. Ces résultats confirment, comme dans nos précédents travaux [126], une intégration préférentielle de ce lactate pour alimenter le métabolisme oxydatif. Cependant, la privation secondaire de ce lactate fait drastiquement chuter le potentiel de membrane mitochondrial jusqu'à des valeurs « contrôles » des cellules P3. Les cellules privées de lactate montrent alors, à l'inverse de celles habituées au lactate, une rapide diminution de leur concentration intracellulaire et une réaugmentation de la concentration extracellulaire de lactate, pouvant s'expliquer par une rapide consommation du lactate intracellulaire et/ou une augmentation de son excrétion.

Étonnamment, ces modulations de l'activité mitochondriale n'ont pas été associées à des modulations de la charge adénylique cellulaire, imageant le potentiel énergétique de la cellule. Cependant, la mesure à un temps précis de ce paramètre ne permet pas toujours d'apprécier les flux énergétiques cellulaires. En effet, l'AEC est à la fois le reflet de la production et de la consommation d'ATP/ADP, et ne sera donc modulée que si le rapport entre ces deux processus est altéré. En revanche, par exemple, si l'augmentation de la production d'ATP se fait parallèlement à une augmentation de sa consommation, l'AEC ne reflètera pas forcément cette stimulation métabolique. Ainsi, ces résultats ne permettent pas de conclure sur les différences de régulation des flux énergétiques entre les cellules en lactate et celles qui en sont privées.

De manière cohérente avec la littérature [404], l'augmentation de l'activité mitochondriale en présence de lactate est corrélée à une augmentation de la production de ROS. Pourtant, étonnamment en désaccord avec les variations observées d'activité mitochondriale, la suppression de l'approvisionnement en lactate a montré une augmentation encore plus importante de la production de ROS cellulaire. Cet effet, comme précédemment décrit dans les neurones [405], peut notamment être associé à un stress mitochondrial induit par la privation de leur substrat de prédilection.

Cette stimulation de la production de ROS est transitoire dans les cellules de GB privées de lactate. Ceci suggère un mécanisme de signalisation cellulaire ROS-médié plutôt qu'un stress oxydant qui, par le biais d'une stimulation ROS plus prolongée, aboutirait à l'activation de voies apoptotiques. En effet, les ROS sont associées à de nombreuses régulations intracellulaires, parmi lesquelles la stabilisation du facteur de transcription HIF1 α [406,407]. Normalement activé par l'hypoxie, le facteur HIF1 α est un régulateur métabolique majeur vers

le métabolisme glycolytique [408], et participe à promouvoir le caractère souche des cellules ainsi que leur renouvellement [409].

En opposition avec une étude de Knudsen et al. [380] illustrant une stimulation des capacités souche du GB après résection, aucune hausse de l'expression de différents marqueurs souche n'a pour l'instant été observée dans notre modèle de privation de lactate ; mais une analyse plus poussée de l'expression d'autres marqueurs (*in vitro* et *in vivo*) ainsi qu'une étude fonctionnelle est envisagée.

Par contre, un rebasculé métabolique vers la glycolyse, induit par la privation de lactate, coïncide *in vitro* avec nos résultats fonctionnels sur l'activité mitochondriale, avec la tendance à l'augmentation de la concentration de lactate extracellulaire (suggérant sa production *de novo*, ou son excrétion) ainsi qu'avec la réaugmentation de l'expression de PHDK1, régulant à la baisse l'entrée de pyruvate dans les voies oxydatives mitochondriales.

Finalement, l'ensemble de nos résultats *in vitro* sur des cellules de GB habituées à recevoir du lactate puis privées de ce dernier sont en faveur d'un switch métabolique vers la glycolyse, qui s'accorde également avec les effets observés sur les paramètres de progression du GB. En effet, si l'activation d'une signalisation HIF1 α médiée par les ROS reste encore à prouver dans notre modèle, nos travaux ont cependant montré un effet pro-prolifératif et anti-invasif associé à la privation secondaire de lactate.

Ce modèle artificiel, souhaitant mimer *in vitro* les fluctuations de lactate induites par la résection chirurgicale de la tumeur, trace ainsi les premières pistes explicatives du switch phénotypique des cellules résiduelles post-résection, à l'origine de leur repopulation et donc de la repousse du GB.

Certaines de nos hypothèses formulées à partir des résultats *in vitro* trouvent d'ailleurs des validations *in vivo*. Notamment, la relance de la prolifération dans la zone invasive est imagée par l'augmentation post-résection de l'expression du marqueur Ki67. Cette surexpression dans la zone invasive se poursuit pendant les 3 premières semaines post-résection puis chute, suggérant une repousse tumorale déjà massive permettant de restaurer les gradients de lactate initiaux, et potentiellement de réinverser le switch phénotypique pro-prolifératif. En effet, lorsque la tumeur n'est pas réséquée, le profil Ki67 dans la zone invasive montre une expression très stable et moindre dans les 3 premières semaines post-résection (groupe non réséqué mais timepoints de sacrifice identiques), qui illustre donc, au contraire du groupe réséqué, une activité de prolifération faible et constante dans la zone invasive des souris non réséquées. Cette prolifération est cependant drastiquement augmentée à la 5^{ème} semaine post-résection, du fait d'une croissance tumorale si importante qu'un débordement des cellules de l'imposante masse centrale envahit la zone qui était définie comme invasive.

Également, une analyse transcriptomique de différentes zones tumorales pré- et post-résection a permis de mettre en lumière l'augmentation de l'expression de quelques acteurs pro-glycolytiques dans les zones résiduelles post-résection, comme GLUT1, PFKFB3, PDHK2, ou encore des enzymes du métabolisme de la sérine. Une augmentation du pool intracellulaire de sérine peut parallèlement évoquer une synthèse de novo de purines, d'acides aminés et protéines [410], corrélant avec une production de biomasse.

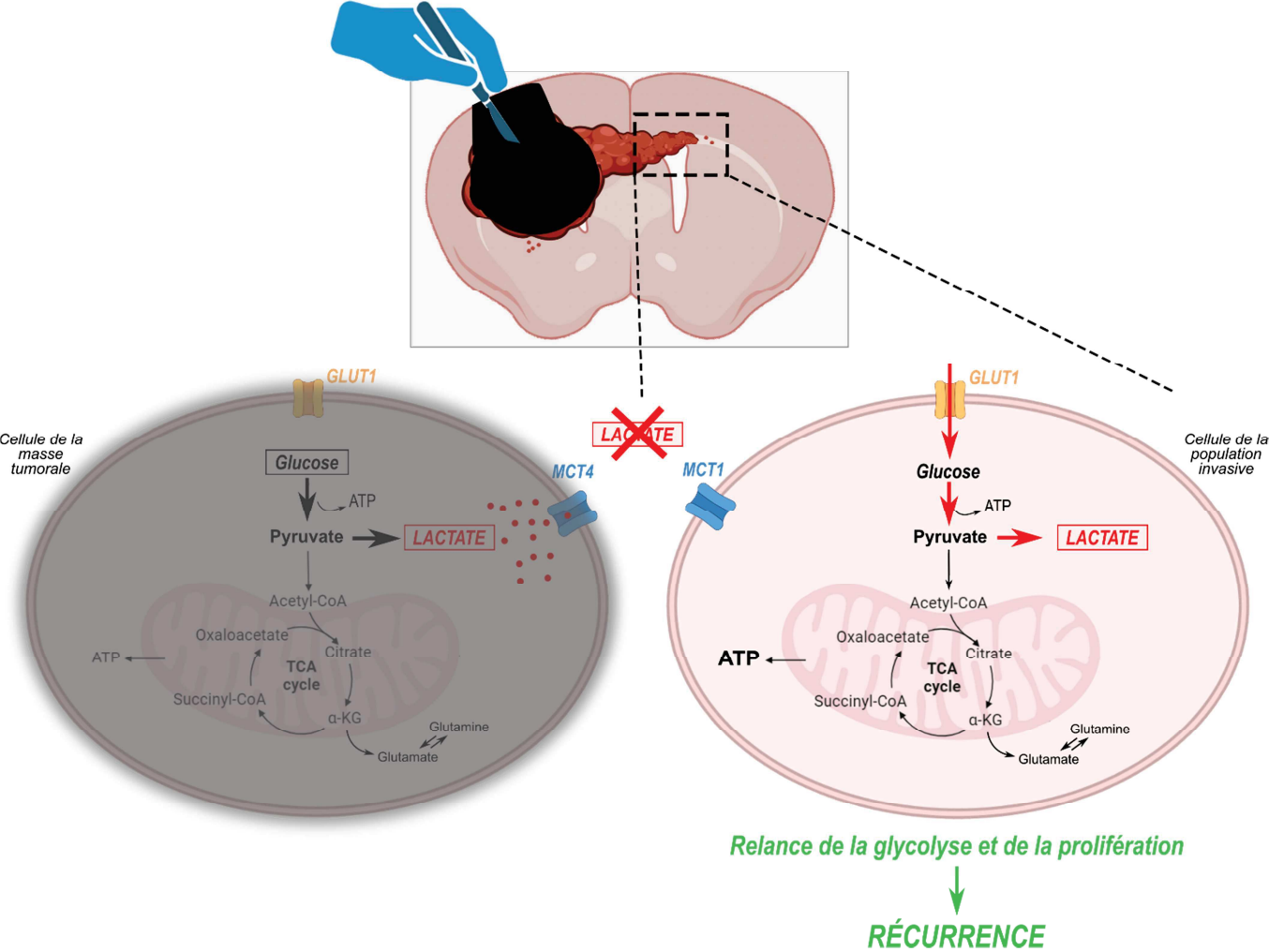


Figure 56 : Hypothèse d'un switch métabolique induit par la privation de lactate post-résection, le rôle central du lactate dans la récurrence du GB.

A notre grand étonnement, l'ensemble de ces adaptations métaboliques induites par la privation de lactate ne s'est accompagné que de faibles modulations des acteurs du métabolisme du lactate comme les LDHs. Par contre, un de ces acteurs se détache et montre une franche surexpression *in vitro* suite à la privation de lactate mais aussi *in vivo* après résection, le transporteur du lactate MCT1, rejoignant des données transcriptomiques post-résection observées dans les travaux de Knudsen *et al.* [380].

Du fait des propriétés de MCT1 plutôt tournées vers l'import de lactate [308], sa surexpression lors d'une privation de lactate *in vitro* ou *in vivo* paraît étonnante et questionne. Cet effet pourrait cependant indiquer un mécanisme réactionnel des cellules de GB qui, privées de leur substrat favori, surexpriment en cascade le transporteur MCT1 dans le but de capter plus de lactate. Également, comme déjà observé dans la littérature [411], une compensation inter-isoformes de MCT1, du fait de la faible expression de MCT4 dans les cellules de GB P3, pourrait expliquer la stimulation de son expression.

Finalement, une investigation plus poussée autour de cette surexpression de MCT1 serait nécessaire afin de décrypter si cet effet est simplement compensatoire de la fluctuation de lactate, ou s'il joue un quelconque rôle dans les adaptations métaboliques soutenant la repousse tumorale mises en évidence dans ces travaux. D'intéressantes études sur des modèles de cancer colorectal soulignent d'ailleurs un lien entre l'expression de MCT1 et la signalisation ROS via le médiateur anti-oxydant NRF2 [412], ainsi qu'avec l'activation de la voie pro-proliférative NF- κ B [413]. Une étude approfondie de cette voie de signalisation, justement connue pour son activation par les ROS [414,415], serait donc d'un intérêt particulier dans notre modèle de résection de GB.

D. Vers la mise en place de thérapies métaboliques pour prévenir la rechute du GB

Dans le but de trouver des cibles thérapeutiques qui seraient efficaces chez le patient pour prévenir ou retarder la repousse tumorale du GB, nous avons testé différentes stratégies thérapeutiques, basées sur la modulation métabolique, dans le modèle de résection *in vivo*.

L'étude d'un blocage *in vivo* post-résection du métabolisme du lactate, par l'action du stiripentol inhibant les LDHs, n'a pas permis de mettre en évidence d'effet synergique avec la résection. Ce résultat suggère un impact plus important de l'utilisation du lactate dans l'établissement de la symbiose métabolique et dans la promotion de l'invasion du GB (résultats établis dans nos premiers travaux [126]), plutôt que dans la phase de re prolifération initiant la rechute. En effet, déjà privée de lactate par la résection chirurgicale de la masse

centrale, la tumeur résiduelle de GB n'est pas plus impactée par un blocage du métabolisme du lactate, et se tourne donc très certainement vers d'autres substrats carbonés pour l'approvisionnement de son métabolisme.

Basé sur nos résultats *in vitro*, l'altération de la signalisation ROS post-résection semble une approche tout à fait prometteuse pour contrer la rechute dans le GB. L'administration de MitoTEMPO, un traitement antioxydant ciblant spécifiquement les ROS mitochondriaux, en pré- péri- et post-opératoire (début du traitement un jour avant résection, puis tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation) semble en effet induire un ralentissement de la repousse tumorale du GB. Cependant, cette tendance n'a pas pu être confirmée du fait d'une grande variabilité de bioluminescence dans le suivi de croissance tumorale de cette expérimentation. Ces résultats, très récents et préliminaires, seront donc répétés et peut-être confirmés lors d'une nouvelle expérimentation *in vivo* à venir.

E. Des limites imposées par les modèles

Si nos hypothèses de travail sont en faveur des premières explications quant à l'implication d'une régulation métabolique dans la récurrence du GB, plusieurs difficultés se sont imposées dans nos travaux, notamment à propos de nos modèles d'études.

Le modèle d'étude *in vivo* de la résection chirurgicale du GB a nécessité une mise au point fine et souhaite désormais s'approcher au plus près de la réalité clinique, en s'inspirant au mieux des résections pratiquées chez l'homme (méthode d'aspiration, chirurgie fluoroguidée). Cependant, sa réalisation est technique : des difficultés se présentent quant à la visualisation intra-opératoire de la tumeur et des structures anatomiques microscopiques, et des limites et questionnements éthiques sont imposées du fait de la fragilité du petit animal face à cette lourde procédure chirurgicale. De ce fait, la validation de l'efficacité et de la reproductibilité du modèle est difficile, bien que prérequis, avant la mise en place de toute expérimentation. Sa technicité augmente également la variabilité inter-individuelle en ce qui concerne l'efficacité de la résection et limite la possibilité de changer d'expérimentateur, favorisant donc l'apparition d'un biais expérimental technique et humain.

Dans le but de pouvoir étudier les régulations mises en place post-résection dans un modèle cellulaire pertinent en place au laboratoire (cellules de GB type souche issues de patient), le modèle de résection *in vivo* a été mis en place chez la souris sévèrement immunodéficiente RAG2/ $\gamma^{-/-}$. Ce modèle, imposant déjà des difficultés liées à une fragilité plus importante des souris par rapport à leurs homologues immunocompétentes, pose également question

puisqu'il supprime quasi totalement les réactions inflammatoires et immunitaires communément corrélées à la chirurgie de résection [416], et potentiellement, des effets métaboliques immuno-médiés.

D'autre part, chez l'homme, 4 différents paliers de résection ont été déterminés pour classer les patients atteints de GB en fonction de leur résection et sont chacun associés à un pronostic de progression différent [169] : la résection supramaximale (classe 1) définit le retrait tumoral au-delà des limites de prise de contraste à l'IRM et est associé avec le meilleur taux de survie totale ; la résection maximale (classe 2) catégorise les chirurgies retirant complètement ou quasi complètement (résidu $\leq 1\text{cm}^3$) la zone de contraste ; la résection submaximale (classe 3) rassemble les paliers subtotal ($\leq 5\text{cm}^3$) et partiel ($> 5\text{cm}^3$) ; enfin la biopsie simple (classe 4) est associée au plus mauvais taux de survie globale.

Notre modèle *in vivo* d'exérèse tumorale évalue l'étendue moyenne de résection à 85% de retrait tumoral, et se place donc en parallèle avec une résection submaximale (subtotal). En parallèle avec les données humaines, il est probable que l'impossibilité de retirer l'entière de la tumeur induise une repousse tumorale plus rapide et un pronostic plus défavorable. D'autre part, les 15% restants de tumeur pourraient également avoir une influence métabolique dans notre modèle, impliquant par exemple une diminution de l'approvisionnement en lactate mais pas sa suppression totale. L'amélioration de l'étendue de cette résection est donc à envisager mais semble difficile du fait de l'important taux de mortalité post-opératoire observé lorsque la résection est « trop » poussée. Ainsi, ce paramètre est à considérer comme une limite importante du modèle *in vivo* de résection, et les résultats obtenus sont à interpréter en parallèle de celui-ci. La réalisation d'un suivi histologique précis et à différents temps post-résection est donc essentielle pour apprécier correctement l'étendue de la résection et la part de repousse tumorale.

In vitro, le modèle de fluctuation de lactate souhaite reproduire l'étape de privation de lactate des cellules de GB résiduelles après résection. Celui-ci, comme tout modèle de culture cellulaire, reste cependant un modèle *in vitro* artificiel assez éloigné de la réalité clinique, ne pouvant notamment pas prendre en compte l'impact du microenvironnement.

D'autre part, si les cellules P3 subissent des redirections métaboliques, leur plasticité leur permet toujours de métaboliser le glucose jusqu'à la fermentation lactique dans une certaine mesure. Cette fonction est d'autant plus stimulée que les sphéroïdes de cellules P3 croissent car leur structure 3D permet la réinstauration de gradients hypoxiques pro-glycolytiques. Ainsi, l'analyse au long terme de la privation de lactate s'est révélée compliquée par la production *de novo* et l'excrétion de lactate (pour les P3 wt, 3 mM de lactate sont produits chaque jour), qui s'accumule fatalement dans les milieux fermés de culture cellulaire. Bien que les cellules

soient placées régulièrement dans un milieu frais où la concentration de lactate et autres métabolites est connue et contrôlée, des variations de ces concentrations sont inévitables, à moins d'utiliser par exemple des systèmes plus complexes de microfluidique.

Également, la concentration de glucose supplémentée dans les milieux de culture type NB, à hauteur de 25 mM, n'est pas du tout représentative de la réalité clinique où la concentration de glucose cérébrale en conditions euglycémiques varie plutôt entre 1 et 3 mM [417]. Il est donc possible que les conditions métaboliques des cellules soient impactées par cet excès de glucose dans le milieu de culture. Ainsi, l'évaluation des effets de la privation de lactate dans un milieu présentant des concentrations physiologiques de glucose est envisagée et pourrait éventuellement permettre la mise en lumière d'effets plus francs de la fluctuation de lactate, qui ne soient plus « masqués » par cet excès de glucose.

CONCLUSION GÉNÉRALE, PERSPECTIVES

Le glioblastome, cancer cérébral le plus fréquent mais aussi le plus agressif chez l'adulte, se heurte encore aujourd'hui à un échec presque systématique des thérapies conventionnelles et ciblées mises en place en clinique. Cette impasse thérapeutique est notamment attribuée à l'importante hétérogénéité et plasticité de cellules de GB, qui sous-tendent leur résistance aux thérapies et s'illustrent notamment au niveau métabolique.

En effet, de plus en plus de preuves démontrent la présence de différents phénotypes métaboliques au sein des GB, mais aussi au sein d'une seule et même tumeur. La partie centrale de la masse tumorale, soumise à des influences hypoxiques ou bien capable d'effet Warburg, surrégule la glycolyse et soutient une vitesse de prolifération intense. L'intérêt porté à la partie invasive du GB, quant à elle, a identifié son association à un métabolisme oxydatif, tourné vers la production énergétique et alimentant ainsi les forts besoins induits par la motilité cellulaire. D'autre part, ces cellules invasives échappent presque systématiquement à la résection tumorale et sont donc les principales responsables des rechutes dans le GB. Cependant, les mécanismes permettant aux cellules invasives de basculer d'un phénotype invasif vers une prolifération intense assurant la repousse de la tumeur secondaire sont encore relativement inconnus.

Ce travail s'est attaché à investiguer le rôle du lactate et son métabolisme, dans le développement du GB dans un premier temps, puis dans l'apparition des rechutes.

Il a permis de confirmer l'établissement d'une symbiose métabolique entre la zone centrale du GB et sa zone invasive, qui sont chacune tournées vers un programme métabolique soutenant leur fonctionnalité, et sont interconnectées par des échanges de lactate. Si la cohabitation intratumorale de différents programmes métaboliques est désormais relativement admise, l'identification d'une régionalisation spatiale de différents acteurs métaboliques dans le GB est plutôt novatrice.

Secondement, ce travail a également montré un rôle central du lactate dans les processus de récurrence tumorale. En tant que facteur déclencheur, ce lactate, ou plutôt la privation de ce lactate, semble impliqué dans un switch métabolique de la population tumorale résiduelle après résection, celle-là même qui est responsable des rechutes. Le décryptage des mécanismes sous-jacents à ce switch métabolique représente alors une piste intéressante vers l'identification de vulnérabilités métaboliques pour la prévention ou le traitement des rechutes du GB.

Conjointement avec la littérature actuelle, ces résultats nous poussent alors à reconsidérer la tumeur de GB non plus comme une entité globale, mais plutôt comme un ensemble de différentes sous-entités, où règnent régionalement des programmes métaboliques majoritaires mais pas uniformes. Repenser le GB, en considérant ces différentes sous-populations tumorales et leur plasticité respective, pourra alors peut-être permettre d'identifier de nouvelles cibles à l'interface de ces populations, et d'améliorer ainsi les stratégies thérapeutiques cliniques. Une approche de ciblage couplé de différentes voies métaboliques, conjointement ou non avec les thérapies standards, pourrait notamment permettre d'élargir l'impact des traitements et de pallier les résistances thérapeutiques actuelles du GB.

RÉFÉRENCES

1. Kandel ER, Koester JD, Mack SH, Siegelbaum SA. In: Principles of Neural Science, 6e [Internet]. 6^e éd. New York, NY: McGraw Hill Professional, 2021; 2021. p. 1760. Disponible sur: accessbiomedicalsscience.mhmedical.com/content.aspx?aid=1180370208
2. Raichle ME. A brief history of human brain mapping. *Trends Neurosci.* févr 2009;32(2):118-26.
3. Haas L. Hans Berger (1873–1941), Richard Caton (1842–1926), and electroencephalography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* janv 2003;74(1):9.
4. Bandettini PA. What's new in neuroimaging methods? *Ann N Y Acad Sci.* mars 2009;1156:260-93.
5. Yarkoni T, Poldrack RA, Nichols TE, Van Essen DC, Wager TD. Large-scale automated synthesis of human functional neuroimaging data. *Nat Methods.* 26 juin 2011;8(8):665-70.
6. Fox MD, Raichle ME. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. *Nat Rev Neurosci.* sept 2007;8(9):700-11.
7. Glasser MF, Coalson TS, Robinson EC, Hacker CD, Harwell J, Yacoub E, et al. A multi-modal parcellation of human cerebral cortex. *Nature.* 11 août 2016;536(7615):171-8.
8. Pessoa L. On the relationship between emotion and cognition. *Nat Rev Neurosci.* févr 2008;9(2):148-58.
9. Rudolph S, Badura A, Lutz S, Pathak SS, Thieme A, Verpeut JL, et al. Cognitive-Affective Functions of the Cerebellum. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 8 nov 2023;43(45):7554-64.
10. De Zeeuw CI, Lisberger SG, Raymond JL. Diversity and dynamism in the cerebellum. *Nat Neurosci.* févr 2021;24(2):160-7.
11. Ran C, Boettcher JC, Kaye JA, Gallori CE, Liberles SD. A brainstem map for visceral sensations. *Nature.* sept 2022;609(7926):320-6.
12. Kreitzer AC, Malenka RC. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron.* 26 nov 2008;60(4):543-54.
13. Gogolla N. The insular cortex. *Curr Biol CB.* 19 juin 2017;27(12):R580-6.
14. Fields RD. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci.* juill 2008;31(7):361-70.
15. Pereda AE. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci.* avr 2014;15(4):250-63.
16. Jabeen S, Thirumalai V. The interplay between electrical and chemical synaptogenesis. *J Neurophysiol.* 1 oct 2018;120(4):1914-22.
17. Galarreta M, Hestrin S. Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nat Rev Neurosci.* juin 2001;2(6):425-33.
18. Bennett MVL, Zukin RS. Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron.* 19 févr 2004;41(4):495-511.
19. Südhof TC. Towards an Understanding of Synapse Formation. *Neuron.* 24 oct 2018;100(2):276-93.
20. Südhof TC. The cell biology of synapse formation. *J Cell Biol.* 4 juin 2021;220(7):e202103052.
21. Choquet D, Triller A. The dynamic synapse. *Neuron.* 30 oct 2013;80(3):691-703.
22. Nusser Z. Creating diverse synapses from the same molecules. *Curr Opin Neurobiol.* août 2018;51:8-15.
23. DeFelipe J. From the connectome to the synaptome: an epic love story. *Science.* 26 nov 2010;330(6008):1198-201.
24. Verkhratsky A, Ho MS, Zorec R, Parpura V. The Concept of Neuroglia. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1175:1-13.
25. Andriezen WL. The Neuroglia Elements in the Human Brain. *Br Med J.* 29 juill 1893;2(1700):227-30.
26. Falcone C. Evolution of astrocytes: From invertebrates to vertebrates. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:931311.
27. Kugler EC, Greenwood J, MacDonald RB. The « Neuro-Glial-Vascular » Unit: The Role of Glia in Neurovascular Unit Formation and Dysfunction. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:732820.
28. Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia.* juill 2010;58(9):1094-103.

29. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 oct 1994;91(22):10625-9.
30. Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, et al. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci*. 1998;20(4-5):291-9.
31. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. août 2009;32(8):421-31.
32. Philips T, Rothstein JD. Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. *J Clin Invest*. 1 sept 2017;127(9):3271-80.
33. Möbius W, Nave KA, Werner HB. Electron microscopy of myelin: Structure preservation by high-pressure freezing. *Brain Res*. 15 juin 2016;1641:92-100.
34. Aggarwal S, Yurlova L, Simons M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol*. oct 2011;21(10):585-93.
35. Wigley R, Butt AM. Integration of NG2-glia (synantocytes) into the neuroglial network. *Neuron Glia Biol*. mai 2009;5(1-2):21-8.
36. Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci*. janv 2009;10(1):9-22.
37. Gibson EM, Purger D, Mount CW, Goldstein AK, Lin GL, Wood LS, et al. Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science*. 2 mai 2014;344(6183):1252304.
38. Robinson SR, Noone DF, O'Dowd BS. Ependymocytes and supra-ependymal axons in rat brain contain glutamate. *Glia*. août 1996;17(4):345-8.
39. Lun MP, Monuki ES, Lehtinen MK. Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nat Rev Neurosci*. août 2015;16(8):445-57.
40. Mrdjen D, Pavlovic A, Hartmann FJ, Schreiner B, Utz SG, Leung BP, et al. High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease. *Immunity*. 20 févr 2018;48(2):380-395.e6.
41. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. 9 sept 2011;333(6048):1456-8.
42. Schafer DP, Stevens B. Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. oct 2015;7(10):a020545.
43. Umpierre AD, Wu LJ. How microglia sense and regulate neuronal activity. *Glia*. juill 2021;69(7):1637-53.
44. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 26 janv 2017;541(7638):481-7.
45. Shinozaki Y, Shibata K, Yoshida K, Shigetomi E, Gachet C, Ikenaka K, et al. Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y1 Receptor Downregulation. *Cell Rep*. 9 mai 2017;19(6):1151-64.
46. Daubon T, Hemadou A, Romero Garmendia I, Saleh M. Glioblastoma Immune Landscape and the Potential of New Immunotherapies. *Front Immunol*. 2020;11:585616.
47. Klemm F, Maas RR, Bowman RL, Kornete M, Soukup K, Nassiri S, et al. Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells. *Cell*. 25 juin 2020;181(7):1643-1660.e17.
48. Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I. Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*. 17 mai 2018;173(5):1073-81.
49. Mildenerberger W, Stifter SA, Greter M. Diversity and function of brain-associated macrophages. *Curr Opin Immunol*. juin 2022;76:102181.
50. Shipley FB, Dani N, Xu H, Deister C, Cui J, Head JP, et al. Tracking Calcium Dynamics and Immune Surveillance at the Choroid Plexus Blood-Cerebrospinal Fluid Interface. *Neuron*. 25 nov 2020;108(4):623-639.e10.

51. Ostrom QT, Francis SS, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2021;21(12):68.
52. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Colonna M, Dantony E, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Volume 1 : Tumeurs solides : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. *Santé Publique Fr.* juill 2019;Volume 1 : Tumeurs solides:372p.
53. Baldi I, Huchet A, Bauchet L, Loiseau H. [Epidemiology of glioblastoma]. *Neurochirurgie.* déc 2010;56(6):433-40.
54. Loiseau H, Huchet A, Rué M, Cowppli-Bony A, Baldi I. Épidémiologie des tumeurs cérébrales primitives. *Rev Neurol (Paris).* 1 août 2009;165(8):650-70.
55. Provost D, Cantagrel A, Lebailly P, Jaffré A, Loyant V, Loiseau H, et al. Brain tumours and exposure to pesticides: a case-control study in southwestern France. *Occup Environ Med.* août 2007;64(8):509-14.
56. Sadetzki S, Chetrit A, Freedman L, Stovall M, Modan B, Novikov I. Long-term follow-up for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis. *Radiat Res.* avr 2005;163(4):424-32.
57. Baan R, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *Lancet Oncol.* juill 2011;12(7):624-6.
58. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol Zurich Switz.* juill 1993;3(3):255-68.
59. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl).* 1 août 2007;114(2):97-109.
60. 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.
61. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncol.* 29 juin 2021;23(8):1231-51.
62. 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.
63. van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJB, Kros JM, Kouwenhoven MCM, Delattre JY, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 janv 2013;31(3):344-50.
64. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med.* 19 févr 2009;360(8):765-73.
65. 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.
66. Han S, Liu Y, Cai SJ, Qian M, Ding J, Larion M, et al. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br J Cancer.* 26 mai 2020;122(11):1580-9.
67. Waitkus MS, Pirozzi CJ, Moure CJ, Diplas BH, Hansen LJ, Carpenter AB, et al. Adaptive Evolution of the GDH2 Allosteric Domain Promotes Gliomagenesis by Resolving IDH1R132H-Induced Metabolic Liabilities. *Cancer Res.* 1 janv 2018;78(1):36-50.
68. Grassian AR, Parker SJ, Davidson SM, Divakaruni AS, Green CR, Zhang X, et al. IDH1 mutations alter citric acid cycle metabolism and increase dependence on oxidative mitochondrial metabolism. *Cancer Res.* 15 juin 2014;74(12):3317-31.
69. 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.

70. Gilbert MR, Liu Y, Neltner J, Pu H, Morris A, Sunkara M, et al. Autophagy and oxidative stress in gliomas with IDH1 mutations. *Acta Neuropathol (Berl)*. févr 2014;127(2):221-33.
71. Cai SJ, Liu Y, Han S, Yang C. Brusatol, an NRF2 inhibitor for future cancer therapeutic. *Cell Biosci*. 2019;9:45.
72. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. 15 févr 2012;483(7390):474-8.
73. Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkissoon S, et al. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*. 15 févr 2012;483(7390):484-8.
74. Wang G, Sai K, Gong F, Yang Q, Chen F, Lin J. Mutation of isocitrate dehydrogenase 1 induces glioma cell proliferation via nuclear factor- κ B activation in a hypoxia-inducible factor 1- α dependent manner. *Mol Med Rep*. mai 2014;9(5):1799-805.
75. Liu XY, Gerges N, Korshunov A, Sabha N, Khuong-Quang DA, Fontebasso AM, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol (Berl)*. nov 2012;124(5):615-25.
76. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 23 oct 2008;455(7216):1061-8.
77. Babikir H, Wang L, Shamardani K, Catalan F, Sudhir S, Aghi MK, et al. ATRX regulates glial identity and the tumor microenvironment in IDH-mutant glioma. *Genome Biol*. 11 nov 2021;22(1):311.
78. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*. 22 août 1997;90(4):785-95.
79. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med*. 25 juin 2015;372(26):2499-508.
80. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 avr 2013;110(15):6021-6.
81. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 25 juin 2010;141(7):1117-34.
82. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 17 mai 2001;411(6835):355-65.
83. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 27 juin 2002;417(6892):949-54.
84. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. août 2009;9(8):550-62.
85. Han S, Wang PF, Cai HQ, Wan JH, Li SW, Lin ZH, et al. Alterations in the RTK/Ras/PI3K/AKT pathway serve as potential biomarkers for immunotherapy outcome of diffuse gliomas. *Aging*. 8 juin 2021;13(11):15444-58.
86. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*. 10 oct 2013;155(2):462-77.
87. Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC. Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1995;51:167-223.
88. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 9 nov 2000;343(19):1350-4.
89. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res*. 15 févr 1999;59(4):793-7.
90. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 10 mars 2005;352(10):997-1003.

91. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro-Oncol.* 30 oct 2020;22(12 Suppl 2):iv1-96.
92. Cowppli-Bony A, Delafosse P, Lacour B, Baldi I, Lecoffre-Bernard C, Lafay L, et al. Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018 - Système nerveux central - Glioblastomes. *Boulogne-Billancourt Inst Natl Cancer.* déc 2020;10p.
93. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* janv 2022;12(1):31-46.
94. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4 mars 2011;144(5):646-74.
95. Lah TT, Novak M, Breznik B. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. *Semin Cancer Biol.* févr 2020;60:262-73.
96. Markwell SM, Ross JL, Olson CL, Brat DJ. Necrotic reshaping of the glioma microenvironment drives disease progression. *Acta Neuropathol (Berl).* mars 2022;143(3):291-310.
97. Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature.* 23 août 2012;488(7412):522-6.
98. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 7 déc 2006;444(7120):756-60.
99. Seker-Polat F, Pinarbasi Degirmenci N, Solaroglu I, Bagci-Onder T. Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Cancers.* 17 janv 2022;14(2):443.
100. Scherer HJ. Structural Development in Gliomas. *Am J Cancer.* 1938;Volume 34(Issue 3):333-51.
101. Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci.* juill 2014;15(7):455-65.
102. Gritsenko PG, Ilina O, Friedl P. Interstitial guidance of cancer invasion. *J Pathol.* janv 2012;226(2):185-99.
103. Watkins S, Robel S, Kimbrough IF, Robert SM, Ellis-Davies G, Sontheimer H. Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nat Commun.* 19 juin 2014;5:4196.
104. Winkler F, Kienast Y, Fuhrmann M, Von Baumgarten L, Burgold S, Mitteregger G, et al. Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. *Glia.* sept 2009;57(12):1306-15.
105. Kwiatkowska A, Symons M. Signaling determinants of glioma cell invasion. *Adv Exp Med Biol.* 2013;986:121-41.
106. Mentlein R, Hattermann K, Held-Feindt J. Lost in disruption: role of proteases in glioma invasion and progression. *Biochim Biophys Acta.* avr 2012;1825(2):178-85.
107. Lucio-Eterovic AK, Piao Y, de Groot JF. Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 juill 2009;15(14):4589-99.
108. Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, et al. An integrative model of cellular states, plasticity and genetics for glioblastoma. *Cell.* 8 août 2019;178(4):835-849.e21.
109. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 19 janv 2010;17(1):98-110.
110. Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell.* 10 juill 2017;32(1):42-56.e6.
111. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science.* 20 juin 2014;344(6190):1396-401.
112. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SGM, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 mars 2013;110(10):4009-14.

113. Couturier CP, Ayyadhury S, Le PU, Nadaf J, Monlong J, Riva G, et al. Single-cell RNA-seq reveals that glioblastoma recapitulates a normal neurodevelopmental hierarchy. *Nat Commun.* 8 juill 2020;11(1):3406.
114. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell.* mai 2006;9(5):391-403.
115. 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.
116. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 1 oct 2004;64(19):7011-21.
117. Hadjipanayis CG, Van Meir EG. Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy. *J Mol Med Berl Ger.* avr 2009;87(4):363-74.
118. Liu C, Sage JC, Miller MR, Verhaak RGW, Hippenmeyer S, Vogel H, et al. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell.* 22 juill 2011;146(2):209-21.
119. Dietrich J, Imitola J, Kesari S. Mechanisms of Disease: the role of stem cells in the biology and treatment of gliomas. *Nat Clin Pract Oncol.* juill 2008;5(7):393-404.
120. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* mars 2006;9(3):157-73.
121. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncol.* janv 1999;1(1):44-51.
122. Huse JT, Phillips HS, Brennan CW. Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos. *Glia.* août 2011;59(8):1190-9.
123. Garofano L, Migliozi S, Oh YT, D'Angelo F, Najac RD, Ko A, et al. Pathway-based classification of glioblastoma uncovers a mitochondrial subtype with therapeutic vulnerabilities. *Nat Cancer.* févr 2021;2(2):141-56.
124. Gimple RC, Bhargava S, Dixit D, Rich JN. Glioblastoma stem cells: lessons from the tumor hierarchy in a lethal cancer. *Genes Dev.* 1 juin 2019;33(11-12):591-609.
125. Agnihotri S, Zadeh G. Metabolic reprogramming in glioblastoma: the influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions. *Neuro-Oncol.* févr 2016;18(2):160-72.
126. Guyon J, Fernandez-Moncada I, Larrieu CM, Bouchez CL, Pagano Zottola AC, Galvis J, et al. Lactate dehydrogenases promote glioblastoma growth and invasion via a metabolic symbiosis. *EMBO Mol Med.* 7 déc 2022;14(12):e15343.
127. Yabo YA, Niclou SP, Golebiewska A. Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 4 mai 2022;24(5):669-82.
128. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 26 sept 2008;321(5897):1807-12.
129. Uddin MS, Mamun AA, Alghamdi BS, Tewari D, Jeandet P, Sarwar MS, et al. Epigenetics of glioblastoma multiforme: From molecular mechanisms to therapeutic approaches. *Semin Cancer Biol.* août 2022;83:100-20.
130. Puchalski RB, Shah N, Miller J, Dalley R, Nomura SR, Yoon JG, et al. An anatomic transcriptional atlas of human glioblastoma. *Science.* 11 mai 2018;360(6389):660-3.
131. Hambardzumyan D, Bergers G. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends Cancer.* déc 2015;1(4):252-65.
132. Barthel L, Hadamitzky M, Dammann P, Schedlowski M, Sure U, Thakur BK, et al. Glioma: molecular signature and crossroads with tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev.* mars 2022;41(1):53-75.
133. Comba A, Faisal SM, Varela ML, Hollon T, Al-Holou WN, Umemura Y, et al. Uncovering Spatiotemporal Heterogeneity of High-Grade Gliomas: From Disease Biology to Therapeutic Implications. *Front Oncol.* 2021;11:703764.

134. Lamano JB, Lamano JB, Li YD, DiDomenico JD, Choy W, Veliceasa D, et al. Glioblastoma-Derived IL6 Induces Immunosuppressive Peripheral Myeloid Cell PD-L1 and Promotes Tumor Growth. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 juin 2019;25(12):3643-57.
135. Pore N, Liu S, Haas-Kogan DA, O'Rourke DM, Maity A. PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal VEGF promoter. *Cancer Res.* 1 janv 2003;63(1):236-41.
136. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* janv 2007;11(1):69-82.
137. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* juin 2007;26(2):225-39.
138. Evans SM, Judy KD, Dunphy I, Jenkins WT, Nelson PT, Collins R, et al. Comparative measurements of hypoxia in human brain tumors using needle electrodes and EF5 binding. *Cancer Res.* 1 mars 2004;64(5):1886-92.
139. Domènech M, Hernández A, Plaja A, Martínez-Balibrea E, Balañà C. Hypoxia: The Cornerstone of Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 22 nov 2021;22(22):12608.
140. Colwell N, Larion M, Giles AJ, Seldomridge AN, Sizdahkhani S, Gilbert MR, et al. Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro-Oncol.* 1 juill 2017;19(7):887-96.
141. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene.* 4 févr 2010;29(5):625-34.
142. Bar EE, Lin A, Mahairaki V, Matsui W, Eberhart CG. Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol.* sept 2010;177(3):1491-502.
143. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α . *Oncogene.* 12 nov 2009;28(45):3949-59.
144. Ortensi B, Setti M, Osti D, Pelicci G. Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem Cell Res Ther.* 28 févr 2013;4(1):18.
145. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 15 avr 2003;21(8):1624-36.
146. Lauko A, Lo A, Ahluwalia MS, Lathia JD. Cancer cell heterogeneity & plasticity in glioblastoma and brain tumors. *Semin Cancer Biol.* juill 2022;82:162-75.
147. Gimple RC, Yang K, Halbert ME, Agnihotri S, Rich JN. Brain cancer stem cells: resilience through adaptive plasticity and hierarchical heterogeneity. *Nat Rev Cancer.* sept 2022;22(9):497-514.
148. Dirkse A, Golebiewska A, Buder T, Nazarov PV, Muller A, Poovathingal S, et al. Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat Commun.* 16 avr 2019;10(1):1787.
149. Safa AR, Saadatzadeh MR, Cohen-Gadol AA, Pollok KE, Bijangi-Vishehsaraei K. Glioblastoma stem cells (GSCs) epigenetic plasticity and interconversion between differentiated non-GSCs and GSCs. *Genes Dis.* juin 2015;2(2):152-63.
150. Broekman ML, Maas SLN, Abels ER, Mempel TR, Krichevsky AM, Breakefield XO. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat Rev Neurol.* août 2018;14(8):482-95.
151. Venkatesh HS. The neural regulation of cancer. *Science.* 22 nov 2019;366(6468):965-965.
152. Osswald M, Jung E, Sahm F, Solecki G, Venkataramani V, Blaes J, et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature.* 3 déc 2015;528(7580):93-8.
153. Weil S, Osswald M, Solecki G, Grosch J, Jung E, Lemke D, et al. Tumor microtubules convey resistance to surgical lesions and chemotherapy in gliomas. *Neuro-Oncol.* 1 oct 2017;19(10):1316-26.

154. Venkataramani V, Tanev DI, Strahle C, Studier-Fischer A, Fankhauser L, Kessler T, et al. Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature*. sept 2019;573(7775):532-8.
155. Venkatesh HS, Morishita W, Geraghty AC, Silverbush D, Gillespie SM, Arzt M, et al. Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature*. sept 2019;573(7775):539-45.
156. Venkatesh HS, Johung TB, Caretti V, Noll A, Tang Y, Nagaraja S, et al. Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion. *Cell*. 7 mai 2015;161(4):803-16.
157. Venkataramani V, Yang Y, Schubert MC, Reyhan E, Tetzlaff SK, Wißmann N, et al. Glioblastoma hijacks neuronal mechanisms for brain invasion. *Cell*. 4 août 2022;185(16):2899-2917.e31.
158. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*. janv 2010;119(1):7-35.
159. Linnerbauer M, Rothhammer V. Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. *Front Immunol*. 2020;11:573256.
160. Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ. Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron*. 25 nov 2020;108(4):608-22.
161. Lee HG, Wheeler MA, Quintana FJ. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nat Rev Drug Discov*. mai 2022;21(5):339-58.
162. Perelroizen R, Philosof B, Budick-Harmelin N, Chernobylsky T, Ron A, Katzir R, et al. Astrocyte immunometabolic regulation of the tumour microenvironment drives glioblastoma pathogenicity. *Brain J Neurol*. 14 sept 2022;145(9):3288-307.
163. Watson DC, Bayik D, Storevik S, Moreino SS, Sprowls SA, Han J, et al. GAP43-dependent mitochondria transfer from astrocytes enhances glioblastoma tumorigenicity. *Nat Cancer*. mai 2023;4(5):648-64.
164. Wang J, Xu SL, Duan JJ, Yi L, Guo YF, Shi Y, et al. Invasion of white matter tracts by glioma stem cells is regulated by a NOTCH1-SOX2 positive-feedback loop. *Nat Neurosci*. janv 2019;22(1):91-105.
165. Giese A, Kluwe L, Laube B, Meissner H, Berens ME, Westphal M. Migration of human glioma cells on myelin. *Neurosurgery*. avr 1996;38(4):755-64.
166. Hide T, Shibahara I, Kumabe T. Novel concept of the border niche: glioblastoma cells use oligodendrocytes progenitor cells (GAOs) and microglia to acquire stem cell-like features. *Brain Tumor Pathol*. avr 2019;36(2):63-73.
167. McKinnon C, Nandhabalan M, Murray SA, Plaha P. Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management. *BMJ*. 14 juill 2021;374:n1560.
168. Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA*. 6 nov 2013;310(17):1842-50.
169. Karschnia P, Young JS, Dono A, Häni L, Sciortino T, Bruno F, et al. Prognostic validation of a new classification system for extent of resection in glioblastoma: A report of the RANO resect group. *Neuro-Oncol*. 12 août 2022;25(5):940-54.
170. Karschnia P, Dono A, Young JS, Juenger ST, Teske N, Häni L, et al. Prognostic evaluation of re-resection for recurrent glioblastoma using the novel RANO classification for extent of resection: A report of the RANO resect group. *Neuro-Oncol*. 5 sept 2023;25(9):1672-85.
171. 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.
172. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. mai 2009;10(5):459-66.
173. Pessina F, Navarria P, Cozzi L, Ascolese AM, Simonelli M, Santoro A, et al. Maximize surgical resection beyond contrast-enhancing boundaries in newly diagnosed glioblastoma multiforme: is it useful and safe? A single institution retrospective experience. *J Neurooncol*. oct 2017;135(1):129-39.

174. Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg.* juill 2011;115(1):3-8.
175. Molinaro AM, Hervey-Jumper S, Morshed RA, Young J, Han SJ, Chunduru P, et al. Association of Maximal Extent of Resection of Contrast-Enhanced and Non-Contrast-Enhanced Tumor With Survival Within Molecular Subgroups of Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma. *JAMA Oncol.* avr 2020;6(4):495-503.
176. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* mai 2006;7(5):392-401.
177. Stummer W, Tonn JC, Mehdorn HM, Nestler U, Franz K, Goetz C, et al. Counterbalancing risks and gains from extended resections in malignant glioma surgery: a supplemental analysis from the randomized 5-aminolevulinic acid glioma resection study. *Clinical article. J Neurosurg.* mars 2011;114(3):613-23.
178. Gerritsen JKW, Arends L, Klimek M, Dirven CMF, Vincent AJPE. Impact of intraoperative stimulation mapping on high-grade glioma surgery outcome: a meta-analysis. *Acta Neurochir (Wien).* janv 2019;161(1):99-107.
179. Fu D, Calvo JA, Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer.* 12 janv 2012;12(2):104-20.
180. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 19 déc 2017;318(23):2306-16.
181. Greenhalgh J, Weston J, Dundar Y, Nevitt SJ, Marson AG. Antiepileptic drugs as prophylaxis for postcraniotomy seizures. *Cochrane Database Syst Rev.* 23 mai 2018;2018(5):CD007286.
182. Roth P, Pace A, Le Rhun E, Weller M, Ay C, Cohen-Jonathan Moyal E, et al. Neurological and vascular complications of primary and secondary brain tumours: EANO-ESMO Clinical Practice Guidelines for prophylaxis, diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* févr 2021;32(2):171-82.
183. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Sotti G, Frezza G, Amistà P, et al. Recurrence pattern after temozolomide concomitant with and adjuvant to radiotherapy in newly diagnosed patients with glioblastoma: correlation With MGMT promoter methylation status. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 mars 2009;27(8):1275-9.
184. Campos B, Olsen LR, Urup T, Poulsen HS. A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. *Oncogene.* 10 nov 2016;35(45):5819-25.
185. Taal W, Brandsma D, de Bruin HG, Bromberg JE, Swaak-Kragten AT, Smitt PAES, et al. Incidence of early pseudo-progression in a cohort of malignant glioma patients treated with chemoirradiation with temozolomide. *Cancer.* 15 juill 2008;113(2):405-10.
186. 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.
187. Wen PY, van den Bent M, Youssef G, Cloughesy TF, Ellingson BM, Weller M, et al. RANO 2.0: Update to the Response Assessment in Neuro-Oncology Criteria for High- and Low-Grade Gliomas in Adults. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 nov 2023;41(33):5187-99.
188. Wick W, Gorlia T, Bendszus M, Taphoorn M, Sahm F, Harting I, et al. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med.* 16 nov 2017;377(20):1954-63.
189. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(3):170-86.
190. Perry JR, Bélanger K, Mason WP, Fulton D, Kavan P, Easaw J, et al. Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 avr 2010;28(12):2051-7.

191. von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*. 15 déc 2016;524(18):3865-95.
192. Maier-Hein KH, Neher PF, Houde JC, Côté MA, Garyfallidis E, Zhong J, et al. The challenge of mapping the human connectome based on diffusion tractography. *Nat Commun*. 7 nov 2017;8(1):1349.
193. Jbabdi S, Sotiropoulos SN, Haber SN, Van Essen DC, Behrens TE. Measuring macroscopic brain connections in vivo. *Nat Neurosci*. nov 2015;18(11):1546-55.
194. Elam JS, Glasser MF, Harms MP, Sotiropoulos SN, Andersson JLR, Burgess GC, et al. The Human Connectome Project: A retrospective. *NeuroImage*. 1 déc 2021;244:118543.
195. Lichtman JW, Denk W. The big and the small: challenges of imaging the brain's circuits. *Science*. 4 nov 2011;334(6056):618-23.
196. Kolb B, Whishaw IQ. Brain plasticity and behavior. *Annu Rev Psychol*. 1998;49:43-64.
197. Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci*. juin 2007;8(6):481-8.
198. Holtmaat A, Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*. sept 2009;10(9):647-58.
199. Kolb B, Gibb R. Searching for the principles of brain plasticity and behavior. *Cortex J Devoted Study Nerv Syst Behav*. sept 2014;58:251-60.
200. Clarke DD, Sokoloff L. Circulation and Energy Metabolism of the Brain. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects 6th edition* [Internet]. Lippincott-Raven; 1999 [cité 4 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20413/>
201. Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D, Constantin G. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. mars 2018;135(3):311-36.
202. Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*. 19 nov 2015;163(5):1064-78.
203. Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 24 janv 2008;57(2):178-201.
204. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*. 3 avr 2014;508(7494):55-60.
205. Sagare AP, Bell RD, Zhao Z, Ma Q, Winkler EA, Ramanathan A, et al. Pericyte loss influences Alzheimer-like neurodegeneration in mice. *Nat Commun*. 2013;4:2932.
206. Lee SW, Kim WJ, Choi YK, Song HS, Son MJ, Gelman IH, et al. SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med*. juill 2003;9(7):900-6.
207. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*. déc 2013;19(12):1584-96.
208. Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, et al. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature*. 16 mai 2012;485(7399):512-6.
209. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 19 mai 2011;473(7347):298-307.
210. Plate KH, Scholz A, Dumont DJ. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathol (Berl)*. déc 2012;124(6):763-75.
211. García-Gómez P, Valiente M. Vascular co-option in brain metastasis. *Angiogenesis*. févr 2020;23(1):3-8.
212. Leten C, Struys T, Dresselaers T, Himmelreich U. In vivo and ex vivo assessment of the blood brain barrier integrity in different glioblastoma animal models. *J Neurooncol*. sept 2014;119(2):297-306.
213. Cao Y, Sundgren PC, Tsien CI, Chenevert TT, Junck L. Physiologic and metabolic magnetic resonance imaging in gliomas. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 mars 2006;24(8):1228-35.
214. Sarkaria JN, Hu LS, Parney IF, Pafundi DH, Brinkmann DH, Laack NN, et al. Is the blood-brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro-Oncol*. 22 janv 2018;20(2):184-91.

215. Lockman PR, Mittapalli RK, Taskar KS, Rudraraju V, Gril B, Bohn KA, et al. Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 déc 2010;16(23):5664-78.
216. Oberoi RK, Parrish KE, Sio TT, Mittapalli RK, Elmquist WF, Sarkaria JN. Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood–brain barrier to treat glioblastoma. *Neuro-Oncol.* janv 2016;18(1):27-36.
217. Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer.* janv 2020;20(1):26-41.
218. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncol.* avr 2003;5(2):79-88.
219. Westphal M, Ram Z, Riddle V, Hilt D, Bortey E, Executive Committee of the Gliadel Study Group. Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta Neurochir (Wien).* mars 2006;148(3):269-75; discussion 275.
220. Drappatz J, Brenner A, Wong ET, Eichler A, Schiff D, Groves MD, et al. Phase I study of GRN1005 in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 mars 2013;19(6):1567-76.
221. Agarwal S, Manchanda P, Vogelbaum MA, Ohlfest JR, Elmquist WF. Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: findings in an orthotopic rat xenograft model of glioma. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* janv 2013;41(1):33-9.
222. Kuppens IELM, Witteveen EO, Jewell RC, Radema SA, Paul EM, Mangum SG, et al. A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 juin 2007;13(11):3276-85.
223. Westphal M, Ylä-Herttuala S, Martin J, Warnke P, Menei P, Eckland D, et al. Adenovirus-mediated gene therapy with sitimagene ceradenovec followed by intravenous ganciclovir for patients with operable high-grade glioma (ASPECT): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* août 2013;14(9):823-33.
224. Teng F, Tsien CI, Lawrence TS, Cao Y. Blood-tumor barrier opening changes in brain metastases from pre to one-month post radiation therapy. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* oct 2017;125(1):89-93.
225. Sun T, Zhang Y, Power C, Alexander PM, Sutton JT, Aryal M, et al. Closed-loop control of targeted ultrasound drug delivery across the blood-brain/tumor barriers in a rat glioma model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 nov 2017;114(48):E10281-90.
226. Beier CP, Schmid C, Gorlia T, Kleinletzenberger C, Beier D, Grauer O, et al. RNOP-09: pegylated liposomal doxorubicine and prolonged temozolomide in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma--a phase II study. *BMC Cancer.* 2 sept 2009;9:308.
227. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 oct 2009;27(28):4733-40.
228. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 20 févr 2014;370(8):709-22.
229. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 20 févr 2014;370(8):699-708.
230. Yang Z, Hackshaw A, Feng Q, Fu X, Zhang Y, Mao C, et al. Comparison of gefitinib, erlotinib and afatinib in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Int J Cancer.* 15 juin 2017;140(12):2805-19.
231. Clarke JL, Molinaro AM, Phillips JJ, Butowski NA, Chang SM, Perry A, et al. A single-institution phase II trial of radiation, temozolomide, erlotinib, and bevacizumab for initial treatment of glioblastoma. *Neuro-Oncol.* juill 2014;16(7):984-90.

232. Reardon DA, Nabors LB, Mason WP, Perry JR, Shapiro W, Kavan P, et al. Phase I/randomized phase II study of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, with or without protracted temozolomide in adults with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* mars 2015;17(3):430-9.
233. Sepúlveda-Sánchez JM, Vaz MÁ, Balañá C, Gil-Gil M, Reynés G, Gallego Ó, et al. Phase II trial of dacomitinib, a pan-human EGFR tyrosine kinase inhibitor, in recurrent glioblastoma patients with EGFR amplification. *Neuro-Oncol.* 19 oct 2017;19(11):1522-31.
234. Lassman AB, Pugh SL, Gilbert MR, Aldape KD, Geinoz S, Beumer JH, et al. Phase 2 trial of dasatinib in target-selected patients with recurrent glioblastoma (RTOG 0627). *Neuro-Oncol.* juill 2015;17(7):992-8.
235. Cruz Da Silva E, Mercier MC, Etienne-Selloum N, Dontenwill M, Choulier L. A Systematic Review of Glioblastoma-Targeted Therapies in Phases II, III, IV Clinical Trials. *Cancers.* 9 avr 2021;13(8):1795.
236. Westphal M, Heese O, Steinbach JP, Schnell O, Schackert G, Mehdorn M, et al. A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. mars 2015;51(4):522-32.
237. Hasselbalch B, Lassen U, Hansen S, Holmberg M, Sørensen M, Kosteljanetz M, et al. Cetuximab, bevacizumab, and irinotecan for patients with primary glioblastoma and progression after radiation therapy and temozolomide: a phase II trial. *Neuro-Oncol.* mai 2010;12(5):508-16.
238. Wick W, Gorlia T, Bady P, Platten M, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, et al. Phase II Study of Radiotherapy and Temozolimus 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.
239. Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Friedman AH, Herndon JE, et al. Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol.* janv 2010;96(2):219-30.
240. Chinnaiyan P, Won M, Wen PY, Rojiani AM, Werner-Wasik M, Shih HA, et al. A randomized phase II study of everolimus in combination with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma: results of NRG Oncology RTOG 0913. *Neuro-Oncol.* 9 avr 2018;20(5):666-73.
241. Wen PY, Touat M, Alexander BM, Mellingshoff IK, Ramkissoon S, McCluskey CS, et al. Buparlisib in Patients With Recurrent Glioblastoma Harboring Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Activation: An Open-Label, Multicenter, Multi-Arm, Phase II Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 mars 2019;37(9):741-50.
242. Pitz MW, Eisenhauer EA, MacNeil MV, Thiessen B, Easaw JC, Macdonald DR, et al. Phase II study of PX-866 in recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* sept 2015;17(9):1270-4.
243. Wick W, Puduvalli VK, Chamberlain MC, van den Bent MJ, Carpentier AF, Cher LM, et al. Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 mars 2010;28(7):1168-74.
244. Hainsworth JD, Ervin T, Friedman E, Priego V, Murphy PB, Clark BL, et al. Concurrent radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide and sorafenib in the first-line treatment of patients with glioblastoma multiforme. *Cancer.* 1 août 2010;116(15):3663-9.
245. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* janv 2010;10(1):9-22.
246. Platten M, Wick W, Wild-Bode C, Aulwurm S, Dichgans J, Weller M. Transforming growth factors beta(1) (TGF-beta(1)) and TGF-beta(2) promote glioma cell migration via Up-regulation of alpha(V)beta(3) integrin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 16 févr 2000;268(2):607-11.
247. Zhu Z, Mesci P, Bernatchez JA, Gimple RC, Wang X, Schafer ST, et al. Zika Virus Targets Glioblastoma Stem Cells through a SOX2-Integrin $\alpha\beta 5$ Axis. *Cell Stem Cell.* 6 févr 2020;26(2):187-204.e10.
248. Malric L, Monferran S, Delmas C, Arnauduc F, Dahan P, Boyrie S, et al. Inhibiting Integrin $\beta 8$ to Differentiate and Radiosensitize Glioblastoma-Initiating Cells. *Mol Cancer Res MCR.* févr 2019;17(2):384-97.

249. Lathia JD, Gallagher J, Heddleston JM, Wang J, Eyler CE, Macswords J, et al. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell*. 7 mai 2010;6(5):421-32.
250. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CLL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev*. 15 juin 2015;29(12):1203-17.
251. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK, et al. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. sept 2014;15(10):1100-8.
252. Nabors LB, Fink KL, Mikkelsen T, Grujicic D, Tarnawski R, Nam DH, et al. Two cilengitide regimens in combination with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma and unmethylated MGMT gene promoter: results of the open-label, controlled, randomized phase II CORE study. *Neuro-Oncol*. mai 2015;17(5):708-17.
253. Shaim H, Shanley M, Basar R, Daher M, Gumin J, Zamler DB, et al. Targeting the α integrin/TGF- β axis improves natural killer cell function against glioblastoma stem cells. *J Clin Invest*. 15 juill 2021;131(14):e142116.
254. Segura-Collar B, Hiller-Vallina S, de Dios O, Caamaño-Moreno M, Mondejar-Ruescas L, Sepulveda-Sanchez JM, et al. Advanced immunotherapies for glioblastoma: tumor neoantigen vaccines in combination with immunomodulators. *Acta Neuropathol Commun*. 10 mai 2023;11(1):79.
255. Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annu Rev Pathol*. 24 janv 2021;16:223-49.
256. Brown NF, Ng SM, Brooks C, Coutts T, Holmes J, Roberts C, et al. A phase II open label, randomised study of ipilimumab with temozolomide versus temozolomide alone after surgery and chemoradiotherapy in patients with recently diagnosed glioblastoma: the Ipi-Glio trial protocol. *BMC Cancer*. 12 mars 2020;20(1):198.
257. Lim M, Weller M, Idbaih A, Steinbach J, Finocchiaro G, Raval RR, et al. Phase III trial of chemoradiotherapy with temozolomide plus nivolumab or placebo for newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter. *Neuro-Oncol*. 2 nov 2022;24(11):1935-49.
258. Omuro A, Brandes AA, Carpentier AF, Idbaih A, Reardon DA, Cloughesy T, et al. Radiotherapy combined with nivolumab or temozolomide for newly diagnosed glioblastoma with unmethylated MGMT promoter: An international randomized phase III trial. *Neuro-Oncol*. 5 janv 2023;25(1):123-34.
259. Reardon DA, Brandes AA, Omuro A, Mulholland P, Lim M, Wick A, et al. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 1 juill 2020;6(7):1003-10.
260. Omuro A, Vlahovic G, Lim M, Sahebjam S, Baehring J, Cloughesy T, et al. Nivolumab with or without ipilimumab in patients with recurrent glioblastoma: results from exploratory phase I cohorts of CheckMate 143. *Neuro-Oncol*. 9 avr 2018;20(5):674-86.
261. June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science*. 23 mars 2018;359(6382):1361-5.
262. Hong M, Clubb JD, Chen YY. Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy. *Cancer Cell*. 12 oct 2020;38(4):473-88.
263. Sampson JH, Gunn MD, Fecci PE, Ashley DM. Brain immunology and immunotherapy in brain tumours. *Nat Rev Cancer*. janv 2020;20(1):12-25.
264. Brown CE, Badie B, Barish ME, Weng L, Ostberg JR, Chang WC, et al. Bioactivity and Safety of IL13R α 2-Redirected Chimeric Antigen Receptor CD8⁺ T Cells in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 sept 2015;21(18):4062-72.
265. O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJD, et al. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med*. 19 juill 2017;9(399):eaaa0984.

266. Ahmed N, Brawley V, Hegde M, Bielałowicz K, Kalra M, Landi D, et al. HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *JAMA Oncol.* 1 août 2017;3(8):1094-101.
267. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med.* 29 déc 2016;375(26):2561-9.
268. Migliorini D, Dietrich PY, Stupp R, Linette GP, Posey AD, June CH. CAR T-Cell Therapies in Glioblastoma: A First Look. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 févr 2018;24(3):535-40.
269. Weller M, Roth P, Preusser M, Wick W, Reardon DA, Platten M, et al. Vaccine-based immunotherapeutic approaches to gliomas and beyond. *Nat Rev Neurol.* juin 2017;13(6):363-74.
270. Rampling R, Peoples S, Mulholland PJ, James A, Al-Salihi O, Twelves CJ, et al. A Cancer Research UK First Time in Human Phase I Trial of IMA950 (Novel Multi-peptide Therapeutic Vaccine) in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 oct 2016;22(19):4776-85.
271. Keskin DB, Anandappa AJ, Sun J, Tirosh I, Mathewson ND, Li S, et al. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature.* janv 2019;565(7738):234-9.
272. Hilf N, Kuttruff-Coqui S, Frenzel K, Bukur V, Stevanović S, Gouttefangeas C, et al. Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature.* janv 2019;565(7738):240-5.
273. Kirson ED, Dbaly V, Tovaryš F, Vymazal J, Soustiel JF, Itzhaki A, et al. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 juin 2007;104(24):10152-7.
274. Kim J, Lee IH, Cho HJ, Park CK, Jung YS, Kim Y, et al. Spatiotemporal Evolution of the Primary Glioblastoma Genome. *Cancer Cell.* 14 sept 2015;28(3):318-28.
275. Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DIS, Zairis S, et al. Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat Genet.* juill 2016;48(7):768-76.
276. Barthel FP, Johnson KC, Varn FS, Moskalik AD, Tanner G, Kocakavuk E, et al. Longitudinal molecular trajectories of diffuse glioma in adults. *Nature.* déc 2019;576(7785):112-20.
277. Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, Grogan PT, Lamont JD, Decker PA, et al. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts. *Neuro-Oncol.* juin 2009;11(3):281-91.
278. Jeon HY, Ham SW, Kim JK, Jin X, Lee SY, Shin YJ, et al. Ly6G⁺ inflammatory cells enable the conversion of cancer cells to cancer stem cells in an irradiated glioblastoma model. *Cell Death Differ.* oct 2019;26(10):2139-56.
279. Dahan P, Martinez Gala J, Delmas C, Monferran S, Malric L, Zentkowski D, et al. Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. *Cell Death Dis.* 27 nov 2014;5(11):e1543.
280. Jeon HY, Kim JK, Ham SW, Oh SY, Kim J, Park JB, et al. Irradiation induces glioblastoma cell senescence and senescence-associated secretory phenotype. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* mai 2016;37(5):5857-67.
281. Xie R, Kessler T, Grosch J, Hai L, Venkataramani V, Huang L, et al. Tumor cell network integration in glioma represents a stemness feature. *Neuro-Oncol.* 5 mai 2021;23(5):757-69.
282. Joseph JV, Magaut CR, Storevik S, Geraldo LH, Mathivet T, Latif MA, et al. TGF- β promotes microtubule formation in glioblastoma through thrombospondin 1. *Neuro-Oncol.* 20 sept 2021;24(4):541-53.
283. Valcourt JR, Lemons JMS, Haley EM, Kojima M, Demuren OO, Collier HA. Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle Georget Tex.* 1 mai 2012;11(9):1680-96.
284. Chandel NS. Metabolism of Proliferating Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10 janv 2021;13(10):a040618.
285. Chandel NS. Glycolysis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* mai 2021;13(5):a040535.
286. Deng D, Yan N. GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters. *Protein Sci Publ Protein Soc.* mars 2016;25(3):546-58.

287. TeSlaa T, Ralser M, Fan J, Rabinowitz JD. The pentose phosphate pathway in health and disease. *Nat Metab.* août 2023;5(8):1275-89.
288. Chiaradonna F, Ricciardiello F, Palorini R. The Nutrient-Sensing Hexosamine Biosynthetic Pathway as the Hub of Cancer Metabolic Rewiring. *Cells.* 2 juin 2018;7(6):53.
289. Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer.* août 2013;13(8):572-83.
290. Luengo A, Li Z, Gui DY, Sullivan LB, Zagorulya M, Do BT, et al. Increased demand for NAD⁺ relative to ATP drives aerobic glycolysis. *Mol Cell.* 18 févr 2021;81(4):691-707.e6.
291. Dawson AG. Oxidation of cytosolic NADH formed during aerobic metabolism in mammalian cells. *Trends Biochem Sci.* 1 août 1979;4(8):171-6.
292. Chandel NS. Mitochondria. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 mars 2021;13(3):a040543.
293. Mitchell P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature.* juill 1961;191(4784):144-8.
294. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun.* 3 janv 2020;11(1):102.
295. Bonvento G, Bolaños JP. Astrocyte-neuron metabolic cooperation shapes brain activity. *Cell Metab.* 3 août 2021;33(8):1546-64.
296. Almeida A, Almeida J, Bolaños JP, Moncada S. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 déc 2001;98(26):15294-9.
297. Almeida A, Moncada S, Bolaños JP. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol.* janv 2004;6(1):45-51.
298. Zuend M, Saab AS, Wyss MT, Ferrari KD, Hösli L, Looser ZJ, et al. Arousal-induced cortical activity triggers lactate release from astrocytes. *Nat Metab.* févr 2020;2(2):179-91.
299. Lerchundi R, Fernández-Moncada I, Contreras-Baeza Y, Sotelo-Hitschfeld T, Mächler P, Wyss MT, et al. NH₄⁺ triggers the release of astrocytic lactate via mitochondrial pyruvate shunting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 sept 2015;112(35):11090-5.
300. Bouzier-Sore AK, Voisin P, Canioni P, Magistretti PJ, Pellerin L. Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* nov 2003;23(11):1298-306.
301. Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernández E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol.* juin 2009;11(6):747-52.
302. Wu A, Lee D, Xiong WC. Lactate Metabolism, Signaling, and Function in Brain Development, Synaptic Plasticity, Angiogenesis, and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 29 août 2023;24(17):13398.
303. Magistretti PJ, Allaman I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat Rev Neurosci.* avr 2018;19(4):235-49.
304. Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ. Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* nov 1996;16(6):1079-89.
305. Laughton JD, Bittar P, Charnay Y, Pellerin L, Kovari E, Magistretti PJ, et al. Metabolic compartmentalization in the human cortex and hippocampus: evidence for a cell- and region-specific localization of lactate dehydrogenase 5 and pyruvate dehydrogenase. *BMC Neurosci.* 23 mai 2007;8:35.
306. Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life.* janv 2012;64(1):1-9.
307. Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Bröer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J.* 15 août 2000;350 Pt 1(Pt 1):219-27.

308. Pérez-Escuredo J, Van Hée VF, Sboarina M, Falces J, Payen VL, Pellerin L, et al. Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer. *Biochim Biophys Acta*. oct 2016;1863(10):2481-97.
309. Rosafio K, Pellerin L. Oxygen tension controls the expression of the monocarboxylate transporter MCT4 in cultured mouse cortical astrocytes via a hypoxia-inducible factor-1 α -mediated transcriptional regulation. *Glia*. mars 2014;62(3):477-90.
310. Pellerin L, Magistretti PJ. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab*. juill 2012;32(7):1152-66.
311. Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*. 4 mars 2011;144(5):810-23.
312. Newman LA, Korol DL, Gold PE. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PloS One*. 2011;6(12):e28427.
313. Lauritzen KH, Morland C, Puchades M, Holm-Hansen S, Hagelin EM, Lauritzen F, et al. Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism. *Cereb Cortex N Y N 1991*. oct 2014;24(10):2784-95.
314. Bozzo L, Puyal J, Chatton JY. Lactate modulates the activity of primary cortical neurons through a receptor-mediated pathway. *PloS One*. 2013;8(8):e71721.
315. Zhang D, Tang Z, Huang H, Zhou G, Cui C, Weng Y, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature*. oct 2019;574(7779):575-80.
316. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. juin 2006;97(6):1634-58.
317. Mattson MP, Liu D. Energetics and oxidative stress in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med*. 2002;2(2):215-31.
318. Bell KFS, Al-Mubarak B, Martel MA, McKay S, Wheelan N, Hasel P, et al. Neuronal development is promoted by weakened intrinsic antioxidant defences due to epigenetic repression of Nrf2. *Nat Commun*. 13 mai 2015;6:7066.
319. Jimenez-Blasco D, Santofimia-Castaño P, Gonzalez A, Almeida A, Bolaños JP. Astrocyte NMDA receptors' activity sustains neuronal survival through a Cdk5-Nrf2 pathway. *Cell Death Differ*. nov 2015;22(11):1877-89.
320. Ben-Yoseph O, Boxer PA, Ross BD. Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *J Neurochem*. juin 1996;66(6):2329-37.
321. Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15 janv 1999;19(2):562-9.
322. Bolaños JP. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *J Neurochem*. oct 2016;139(Suppl Suppl 2):115-25.
323. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 24 févr 1956;123(3191):309-14.
324. 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.
325. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res*. 1 juin 2004;64(11):3892-9.
326. 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.
327. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*. 1 mars 2009;23(5):537-48.
328. Dang CV, Le A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 nov 2009;15(21):6479-83.
329. Garnier D, Renoult O, Alves-Guerra MC, Paris F, Pecqueur C. Glioblastoma Stem-Like Cells, Metabolic Strategy to Kill a Challenging Target. *Front Oncol*. 6 mars 2019;9:118.
330. Kierans SJ, Taylor CT. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J Physiol*. janv 2021;599(1):23-37.

331. Kathagen A, Schulte A, Balcke G, Phillips HS, Martens T, Matschke J, et al. Hypoxia and oxygenation induce a metabolic switch between pentose phosphate pathway and glycolysis in glioma stem-like cells. *Acta Neuropathol (Berl)*. nov 2013;126(5):763-80.
332. Ahmad F, Dixit D, Sharma V, Kumar A, Joshi SD, Sarkar C, et al. Nrf2-driven TERT regulates pentose phosphate pathway in glioblastoma. *Cell Death Dis*. 5 mai 2016;7(5):e2213.
333. Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T, Cho S, Baek H, Yang XL, 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.
334. 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.
335. Lin H, Patel S, Affleck VS, Wilson I, Turnbull DM, Joshi AR, et al. Fatty acid oxidation is required for the respiration and proliferation of malignant glioma cells. *Neuro-Oncol*. janv 2017;19(1):43-54.
336. Maher EA, Marin-Valencia I, Bachoo RM, Mashimo T, Raisanen J, Hatanpaa KJ, et al. Metabolism of [U-13C]glucose in Human Brain Tumors In Vivo. *NMR Biomed*. nov 2012;25(11):1234-44.
337. Hoang-Minh LB, Siebzehnrubl FA, Yang C, Suzuki-Hatano S, Dajac K, Loche T, et al. Infiltrative and drug-resistant slow-cycling cells support metabolic heterogeneity in glioblastoma. *EMBO J*. 3 déc 2018;37(23):e98772.
338. Saurty-Seerunghen MS, Daubon T, Bellenger L, Delaunay V, Castro G, Guyon J, et al. Glioblastoma cell motility depends on enhanced oxidative stress coupled with mobilization of a sulfurtransferase. *Cell Death Dis*. 30 oct 2022;13(10):913.
339. Feng SW, Chang PC, Chen HY, Hueng DY, Li YF, Huang SM. Exploring the Mechanism of Adjuvant Treatment of Glioblastoma Using Temozolomide and Metformin. *Int J Mol Sci*. 25 juill 2022;23(15):8171.
340. Yang SH, Li S, Lu G, Xue H, Kim DH, Zhu JJ, et al. Metformin treatment reduces temozolomide resistance of glioblastoma cells. *Oncotarget*. 29 nov 2016;7(48):78787-803.
341. Würth R, Pattarozzi A, Gatti M, Bajetto A, Corsaro A, Parodi A, et al. Metformin selectively affects human glioblastoma tumor-initiating cell viability: A role for metformin-induced inhibition of Akt. *Cell Cycle Georget Tex*. 1 janv 2013;12(1):145-56.
342. 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.
343. Tardito S, Oudin A, Ahmed SU, Fack F, Keunen O, Zheng L, et al. Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nat Cell Biol*. déc 2015;17(12):1556-68.
344. Rosati A, Poliani PL, Todeschini A, Cominelli M, Medicina D, Cenzato M, et al. Glutamine synthetase expression as a valuable marker of epilepsy and longer survival in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncol*. mai 2013;15(5):618-25.
345. Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res*. 15 août 2001;61(16):6020-4.
346. Corbet C, Feron O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nat Rev Cancer*. oct 2017;17(10):577-93.
347. de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol*. 2019;9:1143.
348. Guyon J, Chouleur T, Bikfalvi A, Daubon T. Glioblastoma Patient-Derived Cell Lines: Generation of Nonadherent Cellular Models from Brain Tumors. In: Seano G, éditeur. *Brain Tumors* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2021. p. 105-17. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0856-2_5

349. Hsia T, Small JL, Yekula A, Batool SM, Escobedo AK, Ekanayake E, et al. Systematic Review of Photodynamic Therapy in Gliomas. *Cancers*. 1 août 2023;15(15):3918.
350. Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Toselli M, Biella G, et al. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol*. sept 2005;3(9):e283.
351. Guyon J, Andrique L, Pujol N, Røslund GV, Recher G, Bikfalvi A, et al. A 3D Spheroid Model for Glioblastoma. *J Vis Exp JoVE*. 9 avr 2020;(158).
352. Hubert CG, Rivera M, Spangler LC, Wu Q, Mack SC, Prager BC, et al. A Three-Dimensional Organoid Culture System Derived from Human Glioblastomas Recapitulates the Hypoxic Gradients and Cancer Stem Cell Heterogeneity of Tumors Found In Vivo. *Cancer Res*. 15 avr 2016;76(8):2465-77.
353. Caragher S, Chalmers AJ, Gomez-Roman N. Glioblastoma's Next Top Model: Novel Culture Systems for Brain Cancer Radiotherapy Research. *Cancers*. 4 janv 2019;11(1):44.
354. Lenting K, Verhaak R, Ter Laan M, Wesseling P, Leenders W. Glioma: experimental models and reality. *Acta Neuropathol (Berl)*. févr 2017;133(2):263-82.
355. Bougnaud S, Golebiewska A, Oudin A, Keunen O, Harter PN, Mäder L, et al. Molecular crosstalk between tumour and brain parenchyma instructs histopathological features in glioblastoma. *Oncotarget*. 31 mai 2016;7(22):31955-71.
356. Pontén J, Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1968;74(4):465-86.
357. Westermarck B, Pontén J, Hugosson R. Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]*. nov 1973;81(6):791-805.
358. Allen M, Bjerke M, Edlund H, Nelander S, Westermarck B. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Sci Transl Med*. 31 août 2016;8(354):354re3.
359. Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, et al. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet*. 29 janv 2010;6(1):e1000832.
360. Torsvik A, Stieber D, Enger PØ, Golebiewska A, Molven A, Svendsen A, et al. U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. *Cancer Med*. août 2014;3(4):812-24.
361. Wang J, Miletic H, Sakariassen PØ, Huszthy PC, Jacobsen H, Brekkå N, et al. A reproducible brain tumour model established from human glioblastoma biopsies. *BMC Cancer*. 29 déc 2009;9:465.
362. Claes A, Schuurin J, Boots-Sprenger S, Hendriks-Cornelissen S, Dekkers M, van der Kogel AJ, et al. Phenotypic and genotypic characterization of orthotopic human glioma models and its relevance for the study of anti-glioma therapy. *Brain Pathol Zurich Switz*. juill 2008;18(3):423-33.
363. Le Reste PJ, Pineau R, Voutetakis K, Samal J, Jégou G, Lhomond S, et al. Local intracerebral inhibition of IRE1 by MKC8866 sensitizes glioblastoma to irradiation/chemotherapy in vivo. *Cancer Lett*. 1 déc 2020;494:73-83.
364. Bouchez CL, Daubon T, Mourier A. NADH-independent enzymatic assay to quantify extracellular and intracellular L-lactate levels. *STAR Protoc*. 17 juin 2022;3(2):101403.
365. Ceschin J, Saint-Marc C, Laporte J, Labriet A, Philippe C, Moenner M, et al. Identification of yeast and human 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside (AICAr) transporters. *J Biol Chem*. 13 juin 2014;289(24):16844-54.
366. Pinson B, Moenner M, Saint-Marc C, Granger-Farbos A, Daignan-Fornier B. On-demand utilization of phosphoribosyl pyrophosphate by downstream anabolic pathways. *J Biol Chem*. août 2023;299(8):105011.
367. Atkinson DE. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*. nov 1968;7(11):4030-4.
368. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*. nov 2004;4(11):891-9.
369. Altenberg B, Greulich KO. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*. déc 2004;84(6):1014-20.

370. Lv J, Zhou Z, Wang J, Yu H, Lu H, Yuan B, et al. Prognostic Value of Lactate Dehydrogenase Expression in Different Cancers: A Meta-Analysis. *Am J Med Sci.* déc 2019;358(6):412-21.
371. 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.
372. Xie H, Hanai JI, Ren JG, 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.
373. Goetze K, Walenta S, Ksiazkiewicz M, Kunz-Schughart LA, Mueller-Klieser W. Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int J Oncol.* août 2011;39(2):453-63.
374. Rizwan A, Serganova I, Khanin R, Karabeber H, Ni X, Thakur S, et al. Relationships between LDH-A, lactate, and metastases in 4T1 breast tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 sept 2013;19(18):5158-69.
375. Baumann F, Leukel P, Doerfelt A, Beier CP, Dettmer K, Oefner PJ, et al. Lactate promotes glioma migration by TGF-beta2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. *Neuro-Oncol.* août 2009;11(4):368-80.
376. Fack F, Espedal H, Keunen O, Golebiewska A, Obad N, Harter PN, et al. Bevacizumab treatment induces metabolic adaptation toward anaerobic metabolism in glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl).* janv 2015;129(1):115-31.
377. Sada N, Lee S, Katsu T, Otsuki T, Inoue T. Epilepsy treatment. Targeting LDH enzymes with a stiripentol analog to treat epilepsy. *Science.* 20 mars 2015;347(6228):1362-7.
378. Dupuy F, Tabariès S, Andrzejewski S, Dong Z, Blagih J, Annis MG, et al. PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metab.* 6 oct 2015;22(4):577-89.
379. Stacpoole PW. Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1 nov 2017;109(11).
380. Knudsen AM, Halle B, Cédile O, Burton M, Baun C, Thisgaard H, et al. Surgical resection of glioblastomas induces pleiotrophin-mediated self-renewal of glioblastoma stem cells in recurrent tumors. *Neuro-Oncol.* 29 déc 2021;24(7):1074-87.
381. Hara A, Kanayama T, Noguchi K, Niwa A, Miyai M, Kawaguchi M, et al. Treatment Strategies Based on Histological Targets against Invasive and Resistant Glioblastoma. *J Oncol.* 20 juin 2019;2019:2964783.
382. Xie Q, Mittal S, Berens ME. Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. *Neuro-Oncol.* déc 2014;16(12):1575-84.
383. Zheng Y, Carrillo-Perez F, Pizurica M, Heiland DH, Gevaert O. Spatial cellular architecture predicts prognosis in glioblastoma. *Nat Commun.* 11 juill 2023;14(1):4122.
384. Nagao A, Kobayashi M, Koyasu S, Chow CCT, Harada H. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *Int J Mol Sci.* 9 janv 2019;20(2):238.
385. Wicks EE, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest.* 1 juin 2022;132(11):e159839.
386. Cunniff B, McKenzie AJ, Heintz NH, Howe AK. AMPK activity regulates trafficking of mitochondria to the leading edge during cell migration and matrix invasion. *Mol Biol Cell.* 1 sept 2016;27(17):2662-74.
387. Parlani M, Jorgez C, Friedl P. Plasticity of cancer invasion and energy metabolism. *Trends Cell Biol.* 1 mai 2023;33(5):388-402.
388. Allen E, Miéville P, Warren CM, Saghafinia S, Li L, Peng MW, et al. Metabolic Symbiosis Enables Adaptive Resistance to Anti-angiogenic Therapy that Is Dependent on mTOR Signaling. *Cell Rep.* 10 mai 2016;15(6):1144-60.
389. Dhruv HD, McDonough Winslow WS, Armstrong B, Tuncali S, Eschbacher J, Kislin K, et al. Reciprocal Activation of Transcription Factors Underlies the Dichotomy between Proliferation and Invasion of Glioma Cells. *PLoS ONE.* 15 août 2013;8(8):e72134.

390. Kathagen-Buhmann A, Schulte A, Weller J, Holz M, Herold-Mende C, Glass R, et al. Glycolysis and the pentose phosphate pathway are differentially associated with the dichotomous regulation of glioblastoma cell migration versus proliferation. *Neuro-Oncol.* sept 2016;18(9):1219-29.
391. Gao CF, Xie Q, Su YL, Koeman J, Khoo SK, Gustafson M, et al. Proliferation and invasion: plasticity in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 juill 2005;102(30):10528-33.
392. Wu Y, Song Y, Wang R, Wang T. Molecular mechanisms of tumor resistance to radiotherapy. *Mol Cancer.* 15 juin 2023;22(1):96.
393. Tiek DM, Rone JD, Graham GT, Pannkuk EL, Haddad BR, Riggins RB. Alterations in Cell Motility, Proliferation, and Metabolism in Novel Models of Acquired Temozolomide Resistant Glioblastoma. *Sci Rep.* 8 mai 2018;8(1):7222.
394. Liu X, Cooper DE, Cluntun AA, Warmoes MO, Zhao S, Reid MA, et al. Acetate Production from Glucose and Coupling to Mitochondrial Metabolism in Mammals. *Cell.* 4 oct 2018;175(2):502-513.e13.
395. Ward NP, Poff AM, Koutnik AP, D'Agostino DP. Complex I inhibition augments dichloroacetate cytotoxicity through enhancing oxidative stress in VM-M3 glioblastoma cells. *PLoS One.* 2017;12(6):e0180061.
396. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med.* 12 mai 2010;2(31):31ra34.
397. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell.* janv 2007;11(1):37-51.
398. James MO, Jahn SC, Zhong G, Smeltz MG, Hu Z, Stacpoole PW. Therapeutic applications of dichloroacetate and the role of glutathione transferase zeta-1. *Pharmacol Ther.* févr 2017;170:166-80.
399. Dunbar EM, Coats BS, Shroads AL, Langae T, Lew A, Forder JR, et al. Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors. *Invest New Drugs.* juin 2014;32(3):452-64.
400. Shroads AL, Langae T, Coats BS, Kurtz TL, Bullock JR, Weithorn D, et al. Human polymorphisms in the glutathione transferase zeta 1/maleylacetoacetate isomerase gene influence the toxicokinetics of dichloroacetate. *J Clin Pharmacol.* juin 2012;52(6):837-49.
401. Stacpoole PW, Martyniuk CJ, James MO, Calcutt NA. Dichloroacetate-induced peripheral neuropathy. *Int Rev Neurobiol.* 2019;145:211-38.
402. Bernhard C, Reita D, Martin S, Entz-Werle N, Dontenwill M. Glioblastoma Metabolism: Insights and Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci.* 23 mai 2023;24(11):9137.
403. Esquenazi Y, Friedman E, Liu Z, Zhu JJ, Hsu S, Tandon N. The Survival Advantage of « Supratotal » Resection of Glioblastoma Using Selective Cortical Mapping and the Subpial Technique. *Neurosurgery.* 1 août 2017;81(2):275-88.
404. Palma FR, Gantner BN, Sakiyama MJ, Kayzuka C, Shukla S, Lacchini R, et al. ROS production by mitochondria: function or dysfunction? *Oncogene.* janv 2024;43(5):295-303.
405. Jimenez-Blasco D, Busquets-Garcia A, Hebert-Chatelain E, Serrat R, Vicente-Gutierrez C, Ioannidou C, et al. Glucose metabolism links astroglial mitochondria to cannabinoid effects. *Nature.* juill 2020;583(7817):603-8.
406. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29 sept 1998;95(20):11715-20.
407. Patten DA, Lafleur VN, Robitaille GA, Chan DA, Giaccia AJ, Richard DE. Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species. *Mol Biol Cell.* 15 sept 2010;21(18):3247-57.
408. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 23 sept 1994;269(38):23757-63.

409. Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med.* janv 2013;17(1):30-54.
410. Mattaini KR, Sullivan MR, Vander Heiden MG. The importance of serine metabolism in cancer. *J Cell Biol.* 25 juill 2016;214(3):249-57.
411. Marchiq I, Le Floch R, Roux D, Simon MP, Pouyssegur J. Genetic disruption of lactate/H⁺ symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin. *Cancer Res.* 1 janv 2015;75(1):171-80.
412. Diehl K, Dinges LA, Helm O, Ammar N, Plundrich D, Arlt A, et al. Nuclear factor E2-related factor-2 has a differential impact on MCT1 and MCT4 lactate carrier expression in colonic epithelial cells: a condition favoring metabolic symbiosis between colorectal cancer and stromal cells. *Oncogene.* 4 janv 2018;37(1):39-51.
413. Borthakur A, Saksena S, Gill RK, Alrefai WA, Ramaswamy K, Dudeja PK. Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: involvement of NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem.* 1 avr 2008;103(5):1452-63.
414. Nakajima S, Kitamura M. Bidirectional regulation of NF-κB by reactive oxygen species: a role of unfolded protein response. *Free Radic Biol Med.* déc 2013;65:162-74.
415. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 10 avr 1997;336(15):1066-71.
416. Ellingson BM, Chung C, Pope WB, Boxerman JL, Kaufmann TJ. Pseudoprogression, radionecrosis, inflammation or true tumor progression? Challenges associated with glioblastoma response assessment in an evolving therapeutic landscape. *J Neurooncol.* sept 2017;134(3):495-504.
417. Ritter S. Monitoring and Maintenance of Brain Glucose Supply: Importance of Hindbrain Catecholamine Neurons in This Multifaceted Task. In: Harris RBS, éditeur. *Appetite and Food Intake: Central Control* [Internet]. 2nd éd. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2017 [cité 25 févr 2024]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453140/>

ANNEXES

Annexe I : *Critères RANO d'évaluation de la progression des gliomes de haut grade*

Annexe II : *Lactate dehydrogenases promote glioblastoma growth and invasion via a metabolic symbiosis.*

Guyon J, Fernandez-Moncada I, **Larrieu CM**, Bouchez CL, Pagano Zottola AC, Galvis J, Chouleur T, Burban A, Joseph K, Ravi VM, Espedal H, Røsland GV, Daher B, Barre A, Dartigues B, Karkar S, Rudewicz J, Romero-Garmendia I, Klink B, Grützmann K, Derieppe MA, Molinié T, Obad N, Léon C, Seano G, Miletic H, Heiland DH, Marsicano G, Nikolski M, Bjerkvig R, Bikfalvi A, Daubon T.

EMBO Mol Med. 2022 Dec 7;14(12):e15343. doi: 10.15252/emmm.202115343. Epub 2022 Oct 24. PMID: 36278433; PMCID: PMC9728051.

ANNEXE I : Critères RANO d'évaluation de la progression des gliomes de haut grade

TABLE 1. Response Criteria for Enhancing Tumors

CR
CR requires all the following criteria compared with the baseline scan:
(1) Complete disappearance of all enhancing measurable, nonmeasurable, and nontarget disease sustained for at least 4 weeks
(2) No new lesions
(3) Patient must be off corticosteroids or on physiologic replacement doses only
(4) Stable or improved clinically
In the absence of a scan confirming durability of response for at least 4 weeks later, this response will be considered only SD. Patients with nonmeasurable disease only at baseline cannot have CR; the best response possible is SD
PR
PR requires all the following criteria compared with the baseline scan:
(1) $\geq 50\%$ decrease in the sum of products of perpendicular diameters, or $\geq 65\%$ decrease in total volume, of all measurable enhancing target lesions sustained for at least 4 weeks
(2) No new lesions
(3) No progression of nonmeasurable enhancing disease ^a or nontarget lesions ^b (see legend below)
(4) Patient must be on a corticosteroid dose not greater than the dose at the time of baseline scan
(5) Stable or improved clinically
In the absence of a scan confirming durability of response for at least 4 weeks later, this response will be considered only SD. Patients with nonmeasurable disease only at baseline cannot have PR; the best response possible is SD
SD
SD occurs if the patient does not qualify for CR, PR, or PD (see next section) and requires
(1) Stable area(s) of enhancing target lesions on imaging
(2) No new lesions
(3) No progression of nonmeasurable disease ^a or nontarget lesions ^b (see legend below)
(4) Patients must be on a corticosteroid dose that is not greater than the dose at the time of baseline scan. In the event that the corticosteroid dose was increased for new symptoms and signs without confirmation of disease progression on neuroimaging, and subsequent follow-up imaging shows that this increase in corticosteroids was required because of disease progression, the last scan considered to show SD will be the scan obtained when the corticosteroid dose was equivalent to the baseline dose
(5) Stable or improved clinically
PD
Progression is defined by any of the following compared with baseline or best response after initiation of therapy if there has been a reduction from baseline:
(1) $\geq 25\%$ increase in sum of the products of perpendicular diameters, or $\geq 40\%$ increase in total volume of enhancing target lesions, on stable or increasing doses of corticosteroids
If confirmation scans are required (within 12 weeks of completion of radiotherapy and at other time points in studies of agents associated with a high incidence of pseudoprogression), then at least two sequential scans separated by ≥ 4 weeks both exhibiting $\geq 25\%$ increase in sum of products of perpendicular diameters or $\geq 40\%$ increase in total volume of enhancing lesions compared with the most recent previous scan will be required. If the second scan at least 4 weeks later exhibits SD or PR/CR, the previous scan showing preliminary PD is noted as pseudoprogression and the patient should continue on therapy (Data Supplement, Fig S3A). The original MRI showing preliminary PD or the second scan, depending on which scan has the smallest sum of the products of the perpendicular diameters or volume, will serve as the baseline for future comparison
(2) Appearance of a new lesion. In the case where the baseline or best response demonstrates no measurable enhancing disease (visible or not visible), then any new measurable (≥ 10 mm \times 10 mm) enhancing lesions are considered PD. If there is uncertainty regarding progression, the patient may continue on treatment and remain under close observation (eg, re-evaluated at 4-week intervals). If subsequent evaluations confirm progression, the date of progression should be backdated to the time point at which this concern for progression was first raised
If confirmation scans are required, any new measurable (≥ 10 mm \times 10 mm) enhancing lesions should not be immediately considered PD, but instead should be added to the sum of bidimensional products or total volume representing the entire enhancing tumor burden. The new lesion will be considered PD if confirmed by a subsequent scan ≥ 4 weeks later exhibiting $\geq 25\%$ increase in sum of products of perpendicular diameters or $\geq 40\%$ increase in total volume of enhancing lesions relative to the scan first illustrating new measurable disease. If the second scan at least 4 weeks later exhibits SD, CR, PR, or becomes nonmeasurable, the initial scan is noted as pseudoprogression, and the patient should continue on therapy until a second increase in tumor size is observed
(3) Appearance of definite leptomeningeal disease
(4) Clear progression of nonmeasurable lesions (increase in bidirectional diameters by at least 5 \times 5 mm to $\geq 10 \times 10$ mm ^a ; see legend below)
(5) Unequivocal progression of existing nontarget lesions ^b (see legend below)
(6) Definite clinical deterioration not attributable to decrease in corticosteroid dose or other causes apart from the tumor
(7) Failure to return for evaluation as a result of death or deteriorating condition should also be considered as progression unless caused by documented nonrelated disorders
Increase in corticosteroid dose alone, in the absence of clinical deterioration related to tumor, will not be used as a determinant of progression. Patients with stable imaging studies whose corticosteroid dose was increased for reasons other than clinical deterioration related to tumor do not qualify for SD or PD. They should be observed closely. If their corticosteroid dose can be reduced back to baseline, they will be considered as having SD; if further clinical deterioration related to tumor becomes apparent, they will be considered to have progression. The date of progression should be the first time point at which corticosteroid increase was necessary

Abbreviations: CR, complete response; MRI, magnetic resonance imaging; PD, progressive disease; PR, partial response; SD, stable disease.

^aProgression of nonmeasurable lesions requires increase in bidirectional diameters by at least 5 \times 5 mm to $\geq 10 \times 10$ mm. This should be added to the sum of the target lesions. The designation of overall progression requires $\geq 25\%$ increase in sum of products of perpendicular diameters or $\geq 40\%$ increase in volume of the target lesions and the progressing nonmeasurable lesion(s).

^bProgression of nontarget lesions requires $\geq 25\%$ increase in sum of products of perpendicular diameters or $\geq 40\%$ increase in volume of the lesion(s). This should be added to the sum of the target lesions. The designation of overall progression requires $\geq 25\%$ increase in sum of products of perpendicular diameters or $\geq 40\%$ increase in volume of the target lesions and the progressing nontarget lesion(s). The designation of overall progression based solely on progression in nontarget disease in the face of SD or PR of target disease is uncommon.

SOURCE
DATATRANSPARENT
PROCESSOPEN
ACCESS

Lactate dehydrogenases promote glioblastoma growth and invasion via a metabolic symbiosis

Joris Guyon¹ , Ignacio Fernandez-Moncada^{2,†}, Claire M Larrieu^{3,†} , Cyrielle L Bouchez^{3,†}, Antonio C Pagano Zottola^{3,†}, Johanna Galvis^{3,4}, Tiffanie Chouleur¹ , Audrey Burban³, Kevin Joseph^{5,6,7,8,9} , Vidhya M Ravi^{5,6,7,8,9,10} , Heidi Espedal¹¹ , Gro Vatne Røsland³ , Boutaina Daher³, Aurélien Barre⁴, Benjamin Dartigues⁴, Slim Karkar⁴ , Justine Rudewicz⁴, Irati Romero-Garmendia³, Barbara Klink^{12,13,14} , Konrad Grützmann¹⁴, Marie-Alix Derieppe¹⁵, Thibaut Molinié³, Nina Obad¹¹, Céline Léon¹, Giorgio Seano¹⁶, Hrvoje Miletic^{11,17}, Dieter Henrik Heiland^{5,6,7,8,18}, Giovanni Marsicano², Macha Nikolski^{3,4} , Rolf Bjerkvig¹¹ , Andreas Bikfalvi^{1,*} & Thomas Daubon^{1,3,**}

Abstract

Lactate is a central metabolite in brain physiology but also contributes to tumor development. Glioblastoma (GB) is the most common and malignant primary brain tumor in adults, recognized by angiogenic and invasive growth, in addition to its altered metabolism. We show herein that lactate fuels GB anaplerosis by replenishing the tricarboxylic acid (TCA) cycle in absence of glucose. Lactate dehydrogenases (LDHA and LDHB), which we found spatially expressed in GB tissues, catalyze the interconversion of pyruvate and lactate. However, ablation of both LDH isoforms, but not only one, led to a reduction in tumor growth and an increase in mouse survival. Comparative transcriptomics and metabolomics revealed metabolic rewiring involving high oxidative phosphorylation (OXPHOS) in the LDHA/B KO group which sensitized tumors to cranial irradiation, thus improving mouse survival. When mice were treated with the antiepileptic drug stiripentol, which targets LDH activity, tumor growth decreased. Our findings unveil the

complex metabolic network in which both LDHA and LDHB are integrated and show that the combined inhibition of LDHA and LDHB strongly sensitizes GB to therapy.

Keywords antiepileptic drug; energy metabolism; glioblastoma; invasion; lactate dehydrogenases

Subject Categories Cancer; Metabolism

DOI 10.15252/emmm.202115343 | Received 26 October 2021 | Revised 26 September 2022 | Accepted 27 September 2022 | Published online 24 October 2022

EMBO Mol Med (2022) 14: e15343

Introduction

Glioblastoma (GB) is the most common malignant primary brain tumor in adults. The recently updated WHO classification integrates morphologic and genomic data, and classifies GB into a

1 University Bordeaux, INSERM U1312, BRIC, Pessac, France
2 University Bordeaux, INSERM, U1215 Neurocentre Magendie, Bordeaux, France
3 University Bordeaux, CNRS, IBGC, UMR 5095, Bordeaux, France
4 Bordeaux Bioinformatic Center CBIB, University of Bordeaux, Bordeaux, France
5 Microenvironment and Immunology Research Laboratory, Medical Center, University of Freiburg, Freiburg, Germany
6 Department of Neurosurgery, Medical Center, University of Freiburg, Freiburg, Germany
7 Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany
8 Translational NeuroOncology Research Group, Medical Center, University of Freiburg, Freiburg, Germany
9 Center of Advanced Surgical Tissue Analysis (CAST), University of Freiburg, Freiburg, Germany
10 Freiburg Institute for Advanced Studies (FRIAS), University of Freiburg, Freiburg, Germany
11 NorLux Neuro-Oncology, Department of Biomedicine, University of Bergen, Bergen, Norway
12 Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg, Luxembourg
13 German Cancer Consortium (DKTK), Dresden, Germany
14 Core Unit for Molecular Tumor Diagnostics (CMTD), National Center for Tumor Diseases (NCT), Dresden, Germany
15 Animal Facility, University Bordeaux, Pessac, France
16 Institut Curie, INSERM U1021, CNRS UMR3347, Tumor Microenvironment Lab, University Paris-Saclay, Orsay, France
17 Department of Pathology, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway
18 German Cancer Consortium (DKTK), partner site Freiburg, Freiburg, Germany
*Corresponding author. (Lead author). Tel: +33556999066; E-mail: thomas.daubon@u-bordeaux.fr
**Corresponding author. Tel: +33540008703; E-mail: andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr
†These authors contributed equally to this work

histologically and genetically defined group consisting of isocitrate-dehydrogenase (IDH)-wild-type diffuse astrocytomas with TERT promoter mutation, or EGFR gene amplification, or +7/–10 chromosomal copy number changes (Louis *et al*, 2021). Major hallmarks of GB are high proliferation rate, pronounced angiogenesis, and local invasion (Giese *et al*, 2003). Glioblastoma is a highly heterogeneous tumor that exhibits astrocytic, oligodendrocytic, neural progenitor, and mesenchymal features (Nefel *et al*, 2019). The current treatment of GB consists in surgical tumor resection, followed by concomitant radio-chemotherapy (Stupp *et al*, 2005). However, this strategy invariably leads to tumor recurrence due to the inability to fully eradicate invasive cells and results in a poor prognosis (Vollmann-Zwerenz *et al*, 2020). This highlights the need for alternative therapeutic targets to improve tumor management and treatment. Glioblastoma invasion makes use of three types of brain structures: blood vessels, white matter tracts, and the interstitial space (Scherer, 1940). Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) expression induced by hypoxia or following anti-angiogenic treatment significantly impacts GB invasion (Daubon *et al*, 2019b) and metabolism (Fack *et al*, 2015).

Unlike non-neoplastic cells that often rely on mitochondrial oxidative phosphorylation (also known as “mitochondrial respiration”) to produce energy, a common property of cancer cells is enhanced glucose metabolism (Gatenby & Gillies, 2004). Under hypoxic pressure, cells commonly switch to a highly glycolytic metabolism and produce lactate. Under aerobic conditions, tumor cells can maintain this glycolytic metabolism, particularity known as the Warburg effect (Warburg, 1956), which is an efficient way to increase biomass production and therefore maintain a high proliferation rate and promote invasion (Gatenby & Gillies, 2004; Liberti & Locasale, 2016). Production of lactate, an end-product of glycolysis, is catalyzed by lactate dehydrogenase (LDH), a tetrameric enzyme composed of two subunits, LDHA and LDHB, encoded by separate genes. In the human body, LDH exists in five different isozymes composed of four subunits, LDH1 is composed of only LDHB subunits, LDH5 of LDHA subunits, LDH2/3/4 are heterotetramers of both LDHA and LDHB (Drent *et al*, 1996). Depending on the lactate/pyruvate flux, LDHA and LDHB both catalyze the conversion of pyruvate into lactate or its retroconversion, both reactions being coupled to oxidoreduction of NAD⁺/NADH. This leads to increased lactate production (for LDHA) and consumption (for LDHB). Lactate and protons are then extruded from cells by monocarboxylate transporters (MCTs). Other subunits of LDH exist, such as LDHC and LDHD, but they are not highly expressed in brain tissue when compared to LDHA and LDHB (Bittar *et al*, 1996).

Many cancers display high LDHA levels (Altenberg & Greulich, 2004), which is associated with poor patient survival (Koukourakis *et al*, 2003, 2005). Several pre-clinical studies have demonstrated that LDHA inhibition shows anti-proliferative effects (Sheng *et al*, 2012; Xie *et al*, 2014). One proposed explanation is that LDHA inhibition induces mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production and oxidative damage (Fantin *et al*, 2006; Le *et al*, 2010; Sheng *et al*, 2012). Moreover, several studies have shown that LDHA activity and lactate secretion promote invasion and metastasis (Goetze *et al*, 2011; Rizwan *et al*, 2013). Lactate has also been linked to *in vitro* migration of GB cells (Baumann *et al*, 2009; Colen *et al*, 2011; Seliger *et al*, 2013). LDHA has indeed been found at GB invasive borders of antiangiogenic-treated tumors (Fack *et al*, 2015).

IDH-mutated gliomas, which are of better prognosis than IDH1wt gliomas, express lower levels of LDHA (Chesnelong *et al*, 2014). Of note, LDHB has not yet been explored in the GB context, unlike in uterine cancer where LDHB activity modulates autophagy (Brisson *et al*, 2016). However, no study to date has examined the role of both LDHA/LDHB in the development and invasiveness of GB. We, therefore, aimed to study the impact of LDHA and LDHB activity in GB development using patient-derived GB stem-like cells cultured as spheroids to maintain parental DNA genotype and phenotype while implanted into rodents (Wang *et al*, 2009).

We show herein that LDHA and LDHB expressions are spatially restricted in a GB stem-like cell model (in invasive spheroids and *in vivo*) but also in patient samples, by analyzing spatial transcriptomics data (Ravi *et al*, 2022). GB stem-like cells starved from carbon sources and fed with lactate can compensate for the absence of glucose to sustain the TCA cycle thus driving proliferation and invasion. Individual CRISPR-Cas9 LDHA or LDHB knock-outs have limited effects on glioblastoma development, while major biological adaptations are observed in double LDHA/B KO cells. Even under low O₂ concentration, double LDHA/B KO cells still rely on TCA and mitochondrial respiration to support tumor growth, which could be further inhibited by irradiation. Finally, treatment with stiripentol (Diacomit®, Biocodex)—a known antiepileptic drug that also blocks LDH activity (Sada *et al*, 2015)—inhibits lactate production and decreases GB invasion and growth. Collectively, these results demonstrate a central role of LDHA and LDHB, which are regionally expressed, and lactate production in supporting GB energy metabolism which in turn has a major impact on GB invasion and growth.

Results

Expression of LDHA and LDHB isoforms is restricted to specific GB areas

We have previously reported regional expression of genes and proteins such as TSP1 in GB (Daubon *et al*, 2019a, 2019b). Here, a regional expression of the lactate dehydrogenase isoforms was first analyzed in spheroids invading a three-dimensional (3D) collagen matrix, structures which recapitulate GB regional heterogeneity via oxygenation gradient (Guyon *et al*, 2020). Invasive tumor spheroids from P3 stem-like cells were included in paraffin and LDHA and LDHB expressions were analyzed in coronal sections (Fig 1A). LDHA was found highly expressed in the central hypoxic area but also in some single invasive cells, while LDHB was highly expressed at spheroid borders and invasive areas (Fig 1B). Of note, only a few cells expressed both enzymes. Then, a regional expression of the LDHs was analyzed in a patient-derived xenograft mouse model by immunohistochemistry, using the same P3 stem-like cells. Notably, LDHA was found to be expressed mainly in the central hypoxic area of the tumor (Fig 1C; Appendix Fig S1A), colocalized with carbonic anhydrase IX (CAIX or CA9; Appendix Fig S1B), and some cells invading the corpus callosum (CC), while LDHB was prevalently expressed in peripheral tumor areas and cells invading the CC (Fig 1C). Thus, LDHA and LDHB had a distinct spatially restricted expression pattern in the tumor core but were found both expressed in invasive cells (Fig 1C; Appendix Fig S1A). By using a recently published database on spatial transcriptomics (Ravi *et al*, 2022), we

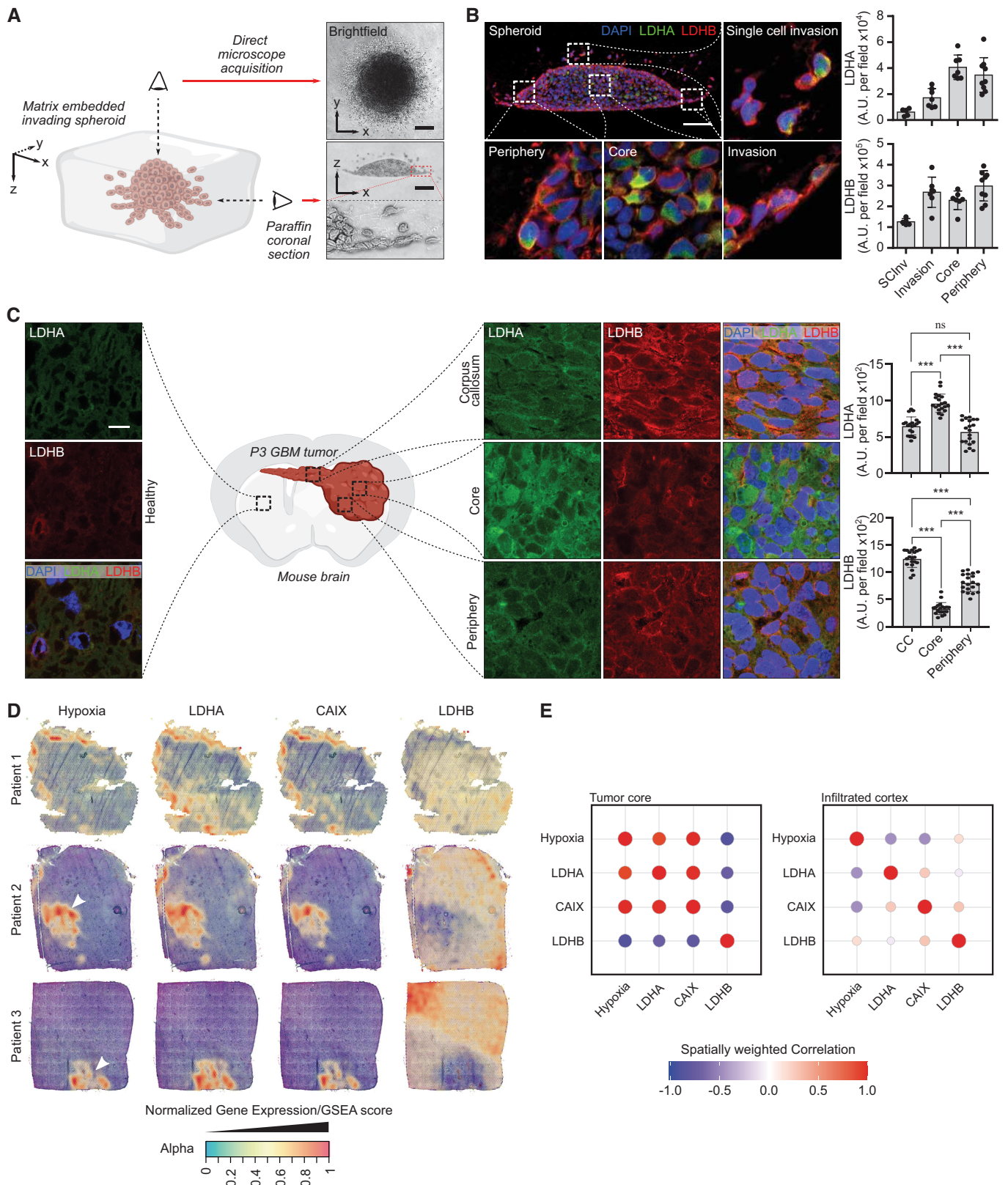


Figure 1.

Figure 1. Regional expression of lactate dehydrogenases A and B in glioblastoma.

- A Left, 3D representation of an invading P3 spheroid embedded in a collagen I matrix. Right, upper view: brightfield microscope image, lower view: coronal section of an invading spheroid. Scale bar: 100 μ m.
- B Coronal section of a P3 spheroid embedded with paraffin and stained with DAPI (blue), LDHA (green), and LDHB (red). Magnification boxes show different areas as depicted in the main image. Quantification of LDHA and LDHB staining was performed on the spheroid areas as indicated in the graphs. Scale bar: 100 μ m. Data are represented as mean \pm s.d. (5–8 fields per area of interest, one representative spheroid of three independent invading spheroids).
- C Coronal section of P3 tumors in a mouse brain, embedded with paraffin and stained with DAPI (blue), LDHA (green), and LDHB (red). Magnification shows areas as depicted in the central illustration. Quantification of LDHA and LDHB staining was performed on the tumor areas as indicated in the graphs. Scale bar: 15 μ m. Data are represented as mean \pm s.d. (20 fields per area of interest, one representative brain of two independently implanted mouse brains) and analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. LDHA: CC vs. Core, $P < 0.0001$; CC vs. Periphery, $P = 0.18$; Core vs. Periphery, $P < 0.0001$. LDHB: CC vs. Core, $P < 0.0001$; CC vs. Periphery, $P < 0.0001$; Core vs. Periphery, $P < 0.0001$.
- D Surface plots of the expression of *LDHA*, *LDHB*, *CA9*, and gene set enrichment for hypoxia, in various stRNA samples (patients 1–3). The transparency of the spots is indicative of the expression/enrichment for the genes, with an additional layer of color based on expression/enrichment.
- E Spatially weighted correlation analysis of *LDHA*, *LDHB*, *CAIX*, and gene set enrichment for hypoxia, separated between the tumor core and the infiltrating areas.
- Source data are available online for this figure.

analyzed the local expression of LDHA, LDHB, CAIX, or hypoxia signature in three different patient samples. LDHA and CAIX expression were restricted to the hypoxic core, and in some invasive cells (Fig 1D and E), LDHB was only expressed in invasive areas (Fig 1D and E). These spatial transcriptomics data strictly confirmed our results on the P3 tumor model.

In silico analysis on a single-cell RNAseq database from invasive and central GB areas demonstrated a similar pattern, with preferential expression of *LDHA* in the central area and *LDHB* in the peripheral area albeit mRNA of both enzymes was found in a portion of invasive tumor cells (Appendix Fig S2A). When using data extracted from the IVYGAP database, distinct regional *LDHA* and *LDHB* expressions were observed, as well as a positive correlation between *LDHA* and the hypoxic transcription factor *HIF1A* in invasive and microvascular areas (Appendix Fig S2B). On the contrary, *LDHB* and *HIF1A* expressions did not correlate (Appendix Fig S2B). When analyzed in the GB-Tissue Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset, *LDHA* was found to be a marker of poor prognosis. *LDHB* expression was, on the contrary, linked to a favorable prognosis (Appendix Fig S2C). The same tendency was observed when the expression of *LDHA* and *LDHB* was analyzed in low-grade gliomas (Appendix Fig S2D). In summary, *LDHA* and *LDHB* expressions were spatially restricted to hypoxic or peripheral areas respectively, with a mixed pattern in invasive cells.

Lactate modulates GB invasion by fueling energy metabolism pathways

In physiological conditions, brain tissue is exposed to low levels of oxygen, that is physiological hypoxia which ranges from 0.5 to 7% O_2 depending on the distance from blood vessels (Sakadžić *et al*, 2010). Local O_2 concentration can be even lower in brain tumors, reaching around 0.1% O_2 in the core area. We, therefore, investigated whether stem-like cells (P3 or BL13 cells) in culture express LDHA and/or LDHB, and whether the expression of these enzymes can be modified by incubating cells at 0.1% O_2 . We observed that LDHA expression was upregulated after 48 h under hypoxic conditions (3 \times fold induction at 72 h), while LDHB expression did not change (Fig 2A for P3 cells and Fig EV1A for BL13 cells). Lactate production was also increased under hypoxia at 0.1% O_2 , correlating with higher LDHA activity in P3 and BL13 cells (Fig 2B–D and Fig EV1B–D). Lactate has been reported to sustain tumor growth via

monocarboxylate transporters (MCT1/4) (Allen *et al*, 2016). We then tested the effect of lactate on tumor cell proliferation and invasion. To test a lactate-induced cytotoxic effect, lactate was added to the medium of P3 cells, and cytotoxicity was measured. Lactate concentrations starting at 30 mM induced cytotoxicity at 24 h (Fig EV1E). The effect of non-cytotoxic lactate concentrations was then tested and spheroid growth and invasion were measured. Spheroid growth was significantly inhibited by 20 mM lactate (Fig 2E), while cell invasion increased in the presence of lactate from 10 mM onwards (Fig 2F). Lactate treatment also induced changes in cell morphology, promoting an elongated cell shape, reminiscent of a mesenchymal phenotype (Fig EV1F). In absence of glucose, lactate by itself increased cell invasion (Fig 2G). To rule out the effect of acidification, we tested cell invasion at the same pH of lactate treatment (pH 6.8) by using HCl, and no effect was observed (Fig 2G). Moreover, rotenone, a respiratory chain complex I inhibitor, completely blocked lactate-induced invasion, suggesting that lactate is fueling mitochondria activity to promote invasion (Fig 2G). Pyruvate, the main LDH substrate, was then tested in invasion experiments, and invasion rates were increased in comparison to control conditions but remained lower than under lactate stimulation (Figs EV1G and 2G). Of note, the respiration capacity of P3 cells was similar in a complete medium, with glucose or lactate (Fig 2H). Lactate consumption by GB mitochondrial activity was followed by [$^{13}C_3$] lactate infusion in glucose-starved P3 cells, wherein labeled TCA intermediates (citrate, oxoglutarate, malate) and amino acids (alanine, glutamate, glutamine) were detected in the endometabolome but also in the exometabolome after 1 h (Figs 2I and EV2). The intracellular abundance of lactate and pyruvate was found unchanged during the experiment (Figs 2I and EV2), but the amount of [$^{13}C_3$] lactate and [$^{13}C_3$] pyruvate immediately reached their maximum level (Fig EV2). The appearance of [$^{13}C_2$] citrate from the beginning indicated a fast reaction from acetyl-CoA, and higher isotopologues increased quickly after, thus indicating an active TCA cycle (Fig EV2). We challenged malate–aspartate shuttle (MAS) by using cycloserine as MAS inhibitor (MacDonald, 1995). This led to slight modifications of aspartate, glutamine, and glutamate concentrations at 4 h of treatment without impacting extracellular concentrations of glutamine (Appendix Fig S3). Main changes were observed for alanine labeling in endo- and exometabolome (Appendix Fig S3). These results shed light on the pathways involved in lactate metabolism of GB cells and are a direct

demonstration that lactate is used as an energy source via the TCA cycle. Almost no labeling of amino acids not associated with the TCA cycle or gluconeogenesis was observed (not included in the analysis).

Double LDHA/B KO impairs *in vitro* and *in vivo* GB growth and invasion

We then decided to investigate the LDH function via knockout (KO). We transduced P3 and BL13 cells with lentiviral CRISPR-Cas9 constructs to fully abolish LDHA and/or LDHB expressions (sgControl, sgLDHA, sgLDHB, and sgLDHA/B). KO was validated by Western blot in single LDHA or LDHB KO cells, and in double LDHA/B KO cells at 21 or 0.1% O₂ (Figs 3A and EV3A). Next, we performed functional experiments to further validate the KO strategy. Lactate secretion was only abolished on double LDHA/B KO cells, but was increased in LDHB KO when compared to the control (Fig 3B). LDHA activity was absent in LDHA KO and double LDHA/B KO cells but no differences were observed between control and LDHB KO

cells (Fig EV3B). LDHB activity was not detected in LDHB or LDHA/B KO cells and slightly decreased in LDHA KO cells (Fig EV3C). Next, we stably transduced P3 cells with the lactate-sensitive FRET biosensor to detect intracellular lactate levels (Fig EV3D; San Martín et al, 2013). Basal lactate concentrations were higher in control, LDHA, or LDHB KO cells than in double LDHA/B KO cells (Fig 6C). Adding oxamate a potent LDH inhibitor that also induces lactate efflux by MCT trans-acceleration (Contreras-Baeza et al, 2019), followed by a MCT blocker cocktail (diclofenac and AR-C155858) unveil that basal lactate concentrations were higher in control, LDHA, or LDHB KO cells compared to double LDHA/B KO cells (Fig 3C). Spheroid growth was then monitored over 1 week at 1% O₂ and showed that double LDHA/B KO strongly reduced spheroid growth, unlike LDHA KO, which moderately decreased spheroid growth and LDHB KO, which had no effect (Fig 3D, left panel). This was associated with a strong ethidium homodimer-1 staining to visualize apoptotic events (Fig 3D, right panel). This cell death signature was also supported by high Annexin-V staining in double KO cells detected by cytometry (Fig EV3E).

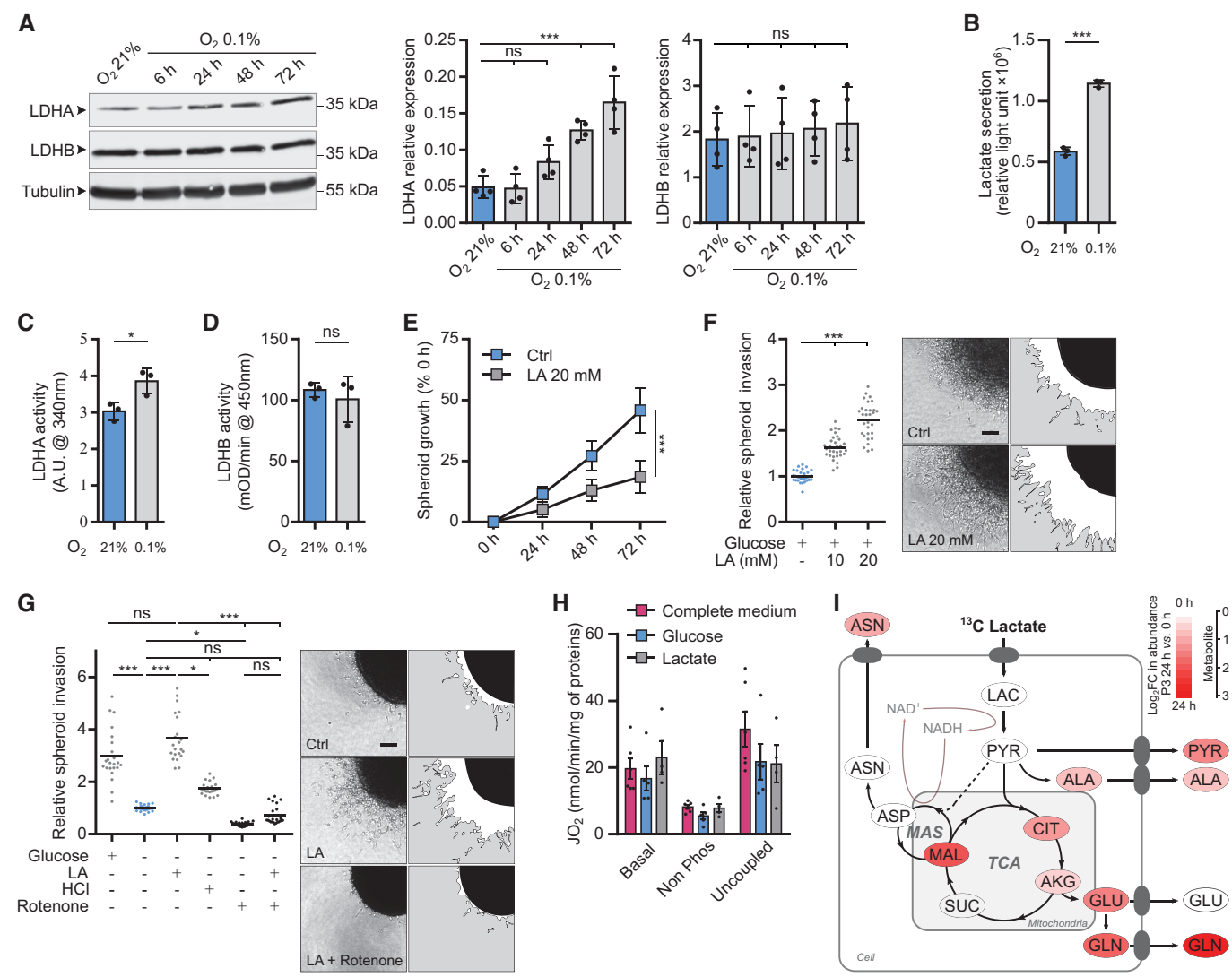


Figure 2.

Figure 2. Hypoxia-driven lactate fuels the TCA cycle and drives cell invasion.

- A Western blot analysis of LDHA and LDHB from P3 cells upon exposure to 21% or 0.1% O₂ for 6, 24, 48, and 72 h. The graphs represent densitometry quantification of immunoblots normalized to tubulin ($n = 4$ independent experiments). Data are represented as mean \pm s.d. and analyzed using one-Way ANOVA following Dunnett's multiple comparisons tests. LDHA: O₂ 21% vs. O₂ 0.1% 6 h, $P > 0.99$; O₂ 21% vs. O₂ 0.1% 24 h, $P = 0.15$; O₂ 21% vs. O₂ 0.1% 48 h, $P = 0.0009$; O₂ 21% vs. O₂ 0.1% 72 h, $P < 0.0001$. LDHB: O₂ 21% vs. O₂ 0.1% 6 h, $P > 0.99$; O₂ 21% vs. O₂ 0.1% 24 h, $P > 0.99$; O₂ 21% vs. O₂ 0.1% 48 h, $P = 0.97$; O₂ 21% vs. O₂ 0.1% 72 h, $P = 0.88$.
- B Lactate secretion of P3 cells exposed to 21 or 0.1% O₂ was measured with a bioluminescent assay using a pro-luciferin reductase substrate converted to luciferin in the presence of NADH ($n = 3$ independent experiments). Data are represented as mean \pm s.d. and analyzed using unpaired t-test: $P < 0.0001$.
- C Enzymatic assays for the activity of LDHA in P3 cells ($n = 3$ independent experiments). Data are represented as mean \pm s.d. and analyzed using unpaired t-test: $P = 0.03$.
- D Enzymatic assays for the activity of immune-captured LDHB in P3 cells ($n = 3$ independent experiments). Data are represented as mean \pm s.d. and analyzed using unpaired t-test: $P = 0.54$.
- E P3 spheroid growth was recorded over 72 h during incubation with or without 20 mM lactate. Area of spheroids was measured at 0, 24, 48, and 72 h, and growth is represented as a percentage of spheroid area compared to time 0 ($n = 3$ independent experiments, one experiment including 9–10 spheroids per condition). Data are represented as mean \pm s.d., and growth at 72 h is analyzed using unpaired t-test: $P < 0.0001$.
- F P3 spheroid invasion in collagen I gel incubated 24 h at 21% O₂ and incubated with 10 or 20 mM lactate (LA). Invasion rate is expressed as a fold change to the control ($n = 4$ independent experiments, one experiment including 6–8 spheroids per condition). Data are represented as mean and analyzed using Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test: Control vs. LA 10 mM, $P < 0.0001$; Control vs. LA 20 mM, $P < 0.0001$; LA 10 mM vs. LA 20 mM, $P = 0.0009$. Images of representative invasive spheroids in each condition. Scale bar: 100 μ m.
- G P3 spheroid invasion in collagen I gel incubated 24 h at 0.1% O₂ and incubated with 20 mM lactate, 20 μ M rotenone, and 1.5 mM HCL. Invasion rate is expressed as a fold change of the control ($n = 4$ independent experiments, one experiment including 6–8 spheroids per condition). Data are represented as mean and analyzed using Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons tests: Control vs. Control + Glucose, $P < 0.0001$; Control vs. LA, $P < 0.0001$; Control vs. HCL, $P = 0.11$; Control vs. Rotenone, $P = 0.01$; Control vs. Rotenone + LA, $P > 0.99$; Control + Glucose vs. LA, $P > 0.99$; LA vs. HCL, $P = 0.02$; LA vs. Rotenone, $P < 0.0001$; LA vs. Rotenone + LA, $P < 0.0001$. Images of representative invasive spheroids in each condition. Scale bar: 100 μ m.
- H P3 cell mass-specific respiration obtained by oxygraphy analysis. Cells were cultured in (i) complete medium or in medium without glucose and pyruvate supplemented with either (ii) 10 mM glucose or (iii) 20 mM lactate ($n =$ at least four independent experiments). Data are represented as mean \pm s.e.m. and analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test (no statistical difference between conditions, $P \in [0.6; 0.9999]$). JO₂ Basal: baseline mitochondrial respiration (oxygen consumption rate), JO₂ non-phosphorylating (non-phos): minimal respiratory capacity, and JO₂ uncoupled: maximal respiratory capacity.
- I Metabolic changes of central carbon metabolism on P3 cells infused with [¹³C₃] lactate for 24 h. Metabolites are labeled with a colored oval whose color corresponds to log₂ fold changes between 24 h and 0 h (red, increase in 24 h) ($n = 3$ independent cell dishes). AKG, alpha-ketoglutarate; ALA, alanine; ASN, asparagine; ASP, aspartate; CIT, citrate; GLN, glutamine; GLU, glutamate; LAC, lactate; MAL, malate; MAS, Malate–Aspartate Shuttle; PYR, pyruvate; SUC, succinate; TCA, TriCarboxylic Acid cycle. See also Appendix Figs S4 and S5.

Source data are available online for this figure.

The invasion capacity was analyzed in all cell lines, and a moderate but significant decrease in invasion was observed in LDHA KO in both P3 (Fig 3E) and BL13 cells (Fig EV3F). Nevertheless, LDHB KO P3 but not LDHB KO BL13 cells had higher invasive capacities (Figs 3E and EV3F). For LDHA/B KO cells, under 0.1% O₂, the invasive ability dropped by 75% for P3 cells (Fig 3E) and 50% for BL13 cells (Fig EV3F).

Spheroids from single and double LDHA/B KO cells were injected into immunodeficient mice to evaluate *in vivo* tumor development and survival. No histopathological differences between control and single LDH KO (LDHA KO or LDHB KO) tumors were observed (Fig 3F). However, double LDHA/B KO tumors were much smaller and less invasive than control tumors (Fig 3G), which correlated with an increase in mouse survival in both, the P3 (Fig 3H) and the BL13 model (Fig EV3G).

Only a small but significant increase in mouse survival was observed in the LDHA KO group, and, surprisingly, a drastic decrease in survival in the LDHB KO group (Fig 3H); the latter was most likely due to hemorrhages at the tumor site. Vascular endothelial growth factor (VEGF), the main inducer of neoangiogenesis by tumor cells, was quantified by ELISA, and an increase was only observed in LDHB KO cells (Fig EV3H), correlating with higher vascular coverage in LDHB KO tumor (Fig EV3I). The VEGF inhibitor bevacizumab (bev) was then injected in mice bearing single or double LDHA/LDHB KO P3 tumors to reverse this phenotype. An increase in survival was observed when mice implanted with LDHB KO tumors were treated with bev, reaching a similar survival curve

to control animals (Fig EV3J). Increased survival was also seen in mice with double LDHA/B KO tumors, while no difference was observed in mice with control or LDHA KO tumors (Fig EV3J).

Metabolic switch in double LDHA/B KO cells under hypoxia delineates vulnerabilities

To trace metabolic fluxes at 0.1% O₂, cells were starved and infused with [¹³C₆] glucose for 24 or 48 h. Principal component analysis (PCA) of endometabolome, defining global regulation of intracellular metabolites, showed that the metabolism of double LDHA/B KO cells switched after 48 h at 0.1% O₂ when compared to control or single KO tumors (Fig 4A). Exometabolome of double LDHA/B KO cells strongly differed from other cells by a decrease in glucose consumption and an absence of lactate production (Fig 4B). In addition, pyruvate and its incompletely catabolized derivatives (acetate and formate) were only secreted in double LDHA/B KO cells (Fig 4B).

RNA sequencing was then performed on the same cells under 21% or 0.1% O₂ and confronted with metabolomics data. Metabolograms were used to integrate transcriptomics and metabolomics data as previously described (Hakimi *et al*, 2016). The changes of each metabolite/transcript pair were determined, and average metabolome/transcriptome variations of metabolic pathways were visualized by comparing two conditions (Fig 4C). Based on global results shown above (Fig 4A), metabolograms were built by analyzing total metabolite abundances in P3 control cells at 21% or 0.1% O₂ (Fig 4C, left panels; Appendix Fig S4), and compared to P3

double LDHA/B KO cells at 21% (Fig 4C, middle panels; Appendix Fig S4) or 0.1% O₂ (Fig 4C, right panels, and Appendix Fig S4). When changes in consensus gene expression were analyzed, differences in glycolysis or TCA cycle for all comparisons were seen, but only negligible variations for amino acid synthesis (Fig 4C). Significant variations in the metabolites were observed for most of the comparisons (Fig 4C). For P3 control cells, the majority of transcripts related to glycolysis increased in expression at 0.1% O₂ when compared to 21% O₂ (18 up, 12 down). In contrast, the majority of metabolites significantly decreased at 0.1% O₂ (0 up, 4 down; Fig 4C, left panels). Metabolograms were heterogeneous when comparing changes between P3 control and double LDHA/B KO cells at (1) 21% and (2) at 0.1% O₂ (Fig 4C, middle and right panels). P3 double LDHA/B KO cells had a strongly modified metabolism, as seen by the increase in all metabolites and transcripts related to glycolysis and oxidative phosphorylation, particularly under 0.1% O₂ (Fig 4C).

Since metabolograms are based on the total metabolite abundances, metabolite abundance was calculated after [¹³C₆] glucose labeling using the fractional contribution and was incorporated into the central pathway of the carbon metabolic network map obtained from previous comparisons (Fig 4C). To explore the relationship between transcriptomic and metabolomic data, transcript levels of

metabolism-related genes were incorporated into the central carbon metabolic network pathway map (Figs 4D and EV4A and B). P3 control cells incubated 48 h under 0.1% O₂ showed a global increase in glycolytic enzyme expression with a concomitant reduction of related metabolites (Fig EV4A). At 21% O₂, the difference between P3 double LDHA/B KO versus control cells was non-significant (Fig EV4B). Under 0.1% O₂, most [¹³C₆] metabolites from the glycolytic and oxidative phosphorylation pathways accumulated in double KO LDHA/B cells compared to control cells (Fig 4D). Fourteen transcripts from the glycolytic pathway (HK1, HK2, GPI, PFKB3, PFKB4, ALDOC, TPI1, PGK1, ENO1, ENO2, and PKM) and the Krebs cycle (ACO2, SUCLG1, and SDHB) were upregulated, while six were downregulated (GAPDHS, LDHA, LDHB, DLAT, SDHD, CS; Fig 4D). These findings indicate that, under hypoxia, double LDHA/B KO deregulates cell metabolism at multiple levels. Global transcripts were increased in P3 control cells incubated at 0.1% O₂ when compared to 21% O₂ (Appendix Fig S5, upper panels; Fig EV5), impacting metabolism and, in particular, glycolysis (HK2, ENO1, ENO2, GAPDH, PKM, LDHA). At 21% O₂, major biological pathways are related to membrane and organelle dynamics during cell division and cell cycle regulation; on the contrary, in more unfavorable conditions at 0.1% O₂, pathways are involved in low oxygen adaptation and maintenance of energy production

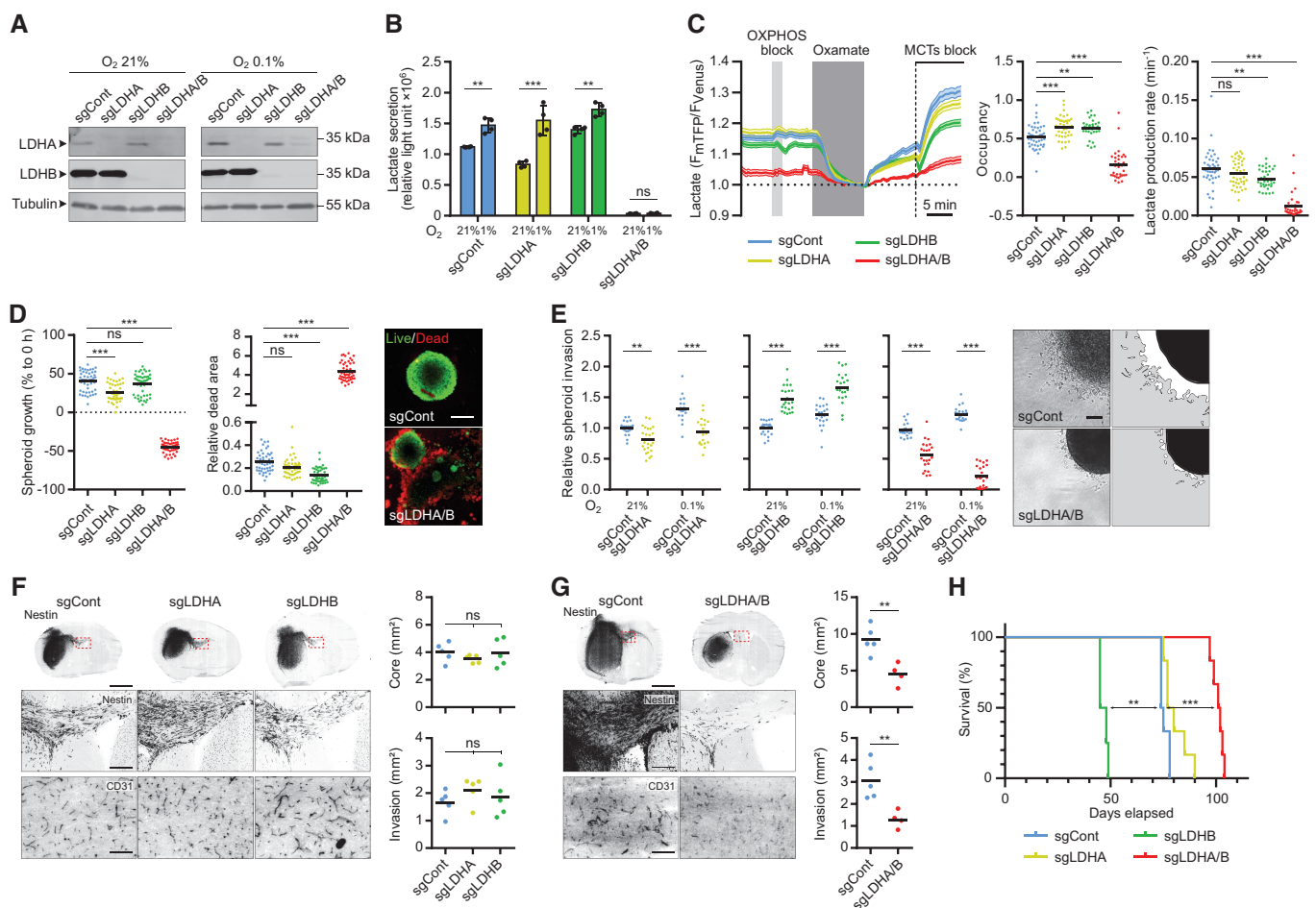


Figure 3.

Figure 3. Double knockout of LDHA and LDHB impairs GB lactate metabolism, cell viability, and invasion.

- A Western blot analysis of LDHA and LDHB expression in P3 cells transduced with CRISPR-Cas9 lentiviral vectors with scramble sequence (sgControl) or against LDHA (sgLDHA), LDHB (sgLDHB) or both (sgLDHA/B). Knockout (KO) cells were exposed to 21% or 1% O₂ for 48 h.
- B Lactate secretion of P3 cells KO for LDHA, LDHB, or both, exposed to 21% or 1% (n = 4 independent experiments). Data are represented as mean ± s.d. and analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test: sgCont 21% vs. sgCont 1%, P = 0.002; sgLDHA 21% vs. sgLDHA 1%, P < 0.0001; sgLDHB 21% vs. sgLDHB 1%, P = 0.004; sgLDHA/B 21% vs. sgLDHA/B 1%, P > 0.99; sgCont/sgLDHA/sgLDHB vs. sgLDHA/B, P < 0.0001.
- C Intracellular lactate level analyzed with a fluorescent biosensor in P3 cells (control, KO for LDHA, LDHB, or both). *Left*, lactate level monitored in basal condition, followed by sequential exposure to OXPHOS block (5 mM sodium azide), 6 mM oxamate, and MCTs blockers (1 μM AR-C1558585 + 1 mM diclofenac). The response to oxamate and MCTs blockers was used to determine, *Middle*, the basal lactate level (expressed as biosensor occupancy) and, *Right*, the lactate production rate (n = 4, 33–44 cells analyzed per condition). Data are represented as mean ± s.e.m. (*Left*) or as mean (*Middle and Right*) and analyzed using one-way ANOVA following Tukey's multiple comparisons test. Occupancy: sgCont vs. sgLDHA, P = 0.001; sgCont vs. sgLDHB, P = 0.005; sgCont vs. sgLDHA/B, P < 0.0001. Lactate production: sgCont vs. sgLDHA, P = 0.32; sgCont vs. sgLDHB, P = 0.01; sgCont vs. sgLDHA/B, P < 0.0001. See [Materials and Methods](#) for analysis details and see also [Fig EV3D](#).
- D *Left*: P3 spheroid growth recorded over 1 week at 1% O₂ (n = 3 independent experiments, one experiment including 16 spheroids per condition). Data are represented as mean and analyzed using Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. Spheroid growth: sgCont vs. sgLDHA, P = 0.0003; sgCont vs. sgLDHB, P = 0.78; sgCont vs. sgLDHA/B, P < 0.0001. Dead area: sgCont vs. sgLDHA, P = 0.19; sgCont vs. sgLDHB, P < 0.0001; sgCont vs. sgLDHA/B, P < 0.0001. *Right*: Viability of spheroids at 1 week, incubated with calcein (green) or ethidium homodimer-1 (red). Scale bar: 200 μm.
- E P3 spheroid invasion in collagen I gel, incubated 24 h at 21% or 0.1% O₂. Invasion rate is expressed as fold change from controls (n = 4 independent experiments, one experiment including 6–8 spheroids per condition). Data are represented as mean and analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test: sgCont 21% vs. sgLDHA 21%, P = 0.003; sgCont 0.1% vs. sgLDHA 0.1%, P < 0.0001; sgCont 21% vs. sgLDHB 21%, P < 0.0001; sgCont 0.1% vs. sgLDHB 0.1%, P < 0.0001; sgCont 21% vs. sgLDHA/B 21%, P < 0.0001; sgCont 0.1% vs. sgLDHA/B 0.1%, P < 0.0001. Images of representative of control or LDHA/B KO spheroids. Scale bar: 100 μm.
- F, G A first cohort of mice was sacrificed when one mouse reached a limit point, brains were extracted, snap-frozen in liquid nitrogen, sliced, and stained. For the second cohort, each mouse was sacrificed when it reached a limit point allowing the draw of survival curves. *Left*: Immunofluorescence staining of Nestin (*top and middle*) and CD31 (*bottom*) of control and LDHA/B KO P3 tumor section. Scale bars: 2 mm (*top*), 250 μm (*middle*) and 100 μm (*bottom*). *Right*: Graphs represent tumor core and invasion area of control and LDHA/B KO P3 tumors in mm² (n = 5 mice per group, average of 5–6 sections per tumor). Data are represented as mean. For (F), data are analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. Core: sgCont vs. sgLDHA, P = 0.48; sgCont vs. sgLDHB, P = 0.99. Invasion: sgCont vs. sgLDHA, P = 0.40; sgCont vs. sgLDHB, P = 0.81. For G, data are analyzed using unpaired t-test. Core: sgCont vs. sgLDHA/B, P = 0.005. Invasion: sgCont vs. sgLDHA/B, P = 0.01.
- H Kaplan–Meier survival curves of xenotransplanted mice with P3 cells KO for LDHA (yellow), LDHB (green), LDHA/B (red), or control (blue) (n = 8 mice per group). Data are analyzed using Log-rank (Mantel–Cox) test: sgCont vs. sgLDHA, P = 0.06; sgCont vs. sgLDHB, P = 0.001; sgCont vs. sgLDHA/B, P = 0.0007.

Source data are available online for this figure.

(Appendix Fig S5, upper panels; Fig EV5). Hypoxic stress has decreased the nucleotide pool (Hisanaga *et al*, 1986). Indeed, the abundance of nucleotides was lower while isotopologue contribution was enriched, suggesting a continuous but limited nucleotide synthesis (Appendix Fig S6). Under 0.1% O₂, the transcription profiles were more enriched in double LDHA/B KO cells when compared to P3 sgControl cells (Appendix Fig S5, lower panels; Fig EV5). This was also seen at 21% O₂ (Appendix Fig S5, middle panels, Fig EV5). The differences in the amount and isotopologue contribution between control and double KO LDHA/B cells were less pronounced at 21% O₂. In hypoxia, the abundance of nucleotide monophosphates (AMP, GMP, and UMP) was also higher in

double KO LDHA/B cells (Appendix Fig S6). The fractional contribution of purines and pyrimidines mainly consisted of *m* + 5 labeling in double KO LDHA/B cells, whereas *m* + 5, *m* + 7, and *m* + 8 labeling were seen in control cells (Appendix Fig S6).

Double LDHA/B KO cells reorganize their mitochondrial respiratory chain to support growth under 0.1% O₂ concentration

To corroborate the RNA sequencing results (Figs 4C and D and EV4A), we exposed P3 cells to 21% or 0.1% O₂ and analyzed the mitochondrial respiratory chain subunit expressions by Western

Figure 4. Correlation between transcriptomic and metabolomic analysis reveals dysregulated metabolic pathways in double LDHA/B knockout.

Control or LDH KO P3 cells were infused 0, 24, and 48 h with [¹³C] glucose at 0.1% O₂ (n = 3 independent cell dishes).

- A Principal component analysis of metabolomic data from cell extracts.
- B Metabolites from cell medium. *Top*, concentration of metabolite consumed ([¹³C] glucose) or secreted (pyruvate, lactate, acetate, formate) by cells. Data are represented as mean ± s.d. and analyzed using two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test: for all metabolites, sgCont/sgLDHA/sgLDHB vs. sgLDHA/B, P < 0.0001. *Bottom*, amount of labeled isotopes relative to the total amount of this element, expressed as a percentage (fractional contribution) Data are represented as mean ± s.d.
- C Circular metabologram illustrating metabolic and transcriptomic differences in metabolite pathways between LDH KO P3 cells. The metabologram is divided in two parts, the left corresponds to metabolomic analysis and the right to the transcriptomic analysis. The outer circle corresponds to the log₂ fold change for each metabolite (*left*) and transcripts (*right*). The central circle displays the average fold change of all analytes.
- D Metabolic changes of central 13-labeled-carbon metabolism in LDH KO P3 cells infused with [¹³C₆] glucose at 1% O₂ for 48 h. Metabolites are labeled with a colored oval and enzyme transcripts with a colored square, colors correspond to the log₂ fold changes between sgControl and sgLDHA/B (blue, increase in sgControl; red, increase in sgLDHA/B; gray, not measured or not computable). For legend, see also Fig 2; 2,3-PG: 2,3-Phosphoglycerate; 2HG: 2-Hydroxyglutarate; 6PG: 6-Phosphogluconate; DHAP: Dihydroxyacetone Phosphate; F1P: Fructose-1-Phosphate; F6P: Fructose-6-Phosphate; FbP: Fructose-bisPhosphate; G3P: Glyceraldehyde-3-Phosphate; G6P: Glucose-6-Phosphate; GLY: Glycine; SER: Serine; Gly3P: Glycerol-3-Phosphate; P5P: Pyridoxal-5-Phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; PPP: Pentose Phosphate Pathway; PRPP: Phosphoribosylpyrophosphate.

Source data are available online for this figure.

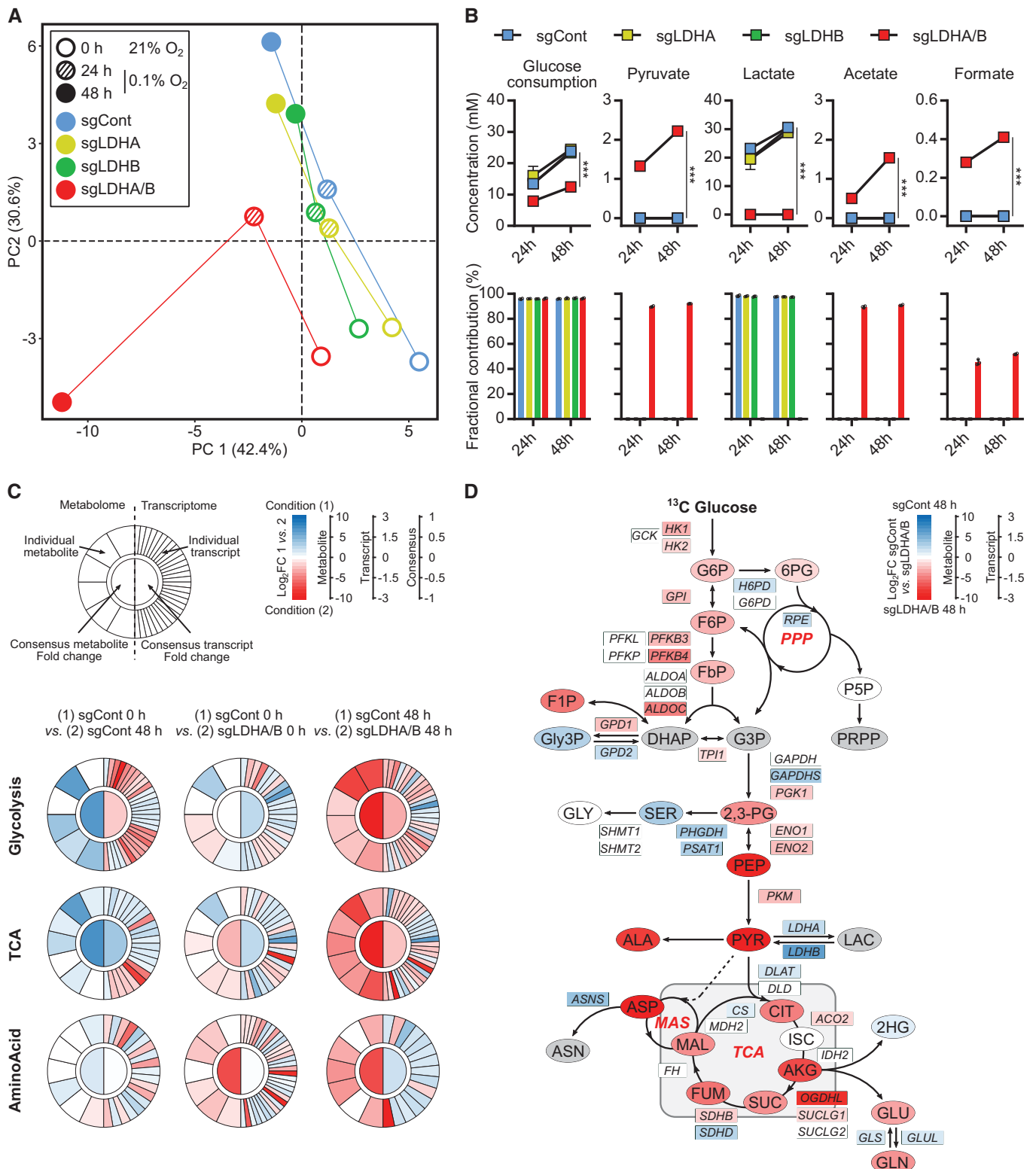


Figure 4.

blot. NDUFB8, SDHA, UQCRC2, and COXII protein levels increased at 0.1% O₂ in double LDHA/B KO cells, but only NDUFB8 and COXII at 21% O₂ (Fig 5A). Expression of the subunit V ATP5A complex did not change in high or low oxygen conditions (Fig 5A). Only

minor changes were observed for single LDHB or LDHA KO cells (Fig 5A). Immunostaining of mitochondria networks revealed an increase in the mitochondrial mass and modifications in network shape, defined as aspect ratio, only in double LDHA/B KO cells

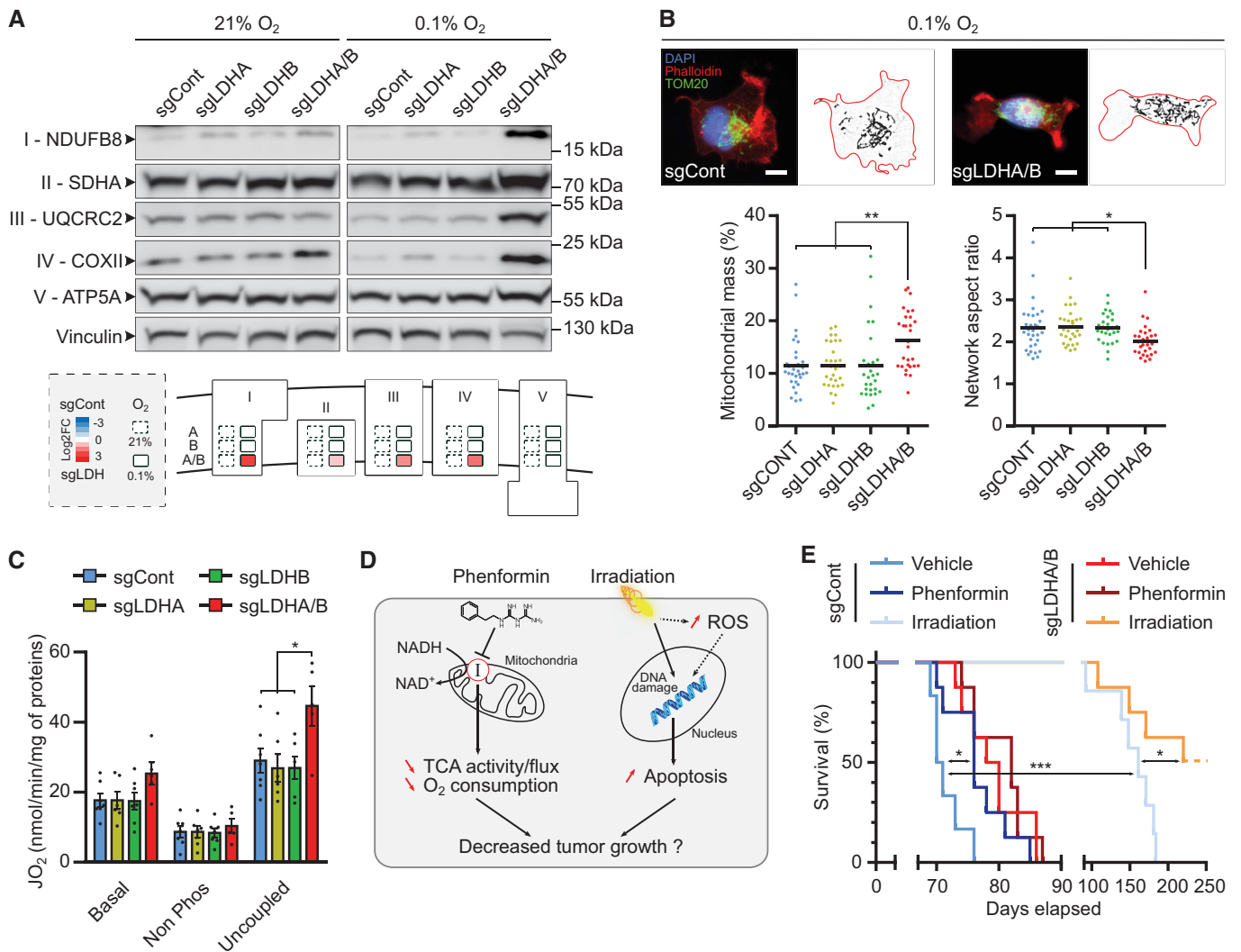


Figure 5. LDHA/B knockout remodels mitochondrial functions and sensitizes tumors to radiation.

A Western blot analysis of mitochondrial respiratory chain subunits from LDH KO P3 cells upon exposure to 21% or 0.1% O₂. Roman numbers indicate the respiratory complex number. The diagram below represents densitometry quantification of the immunoblots normalized to vinculin and expressed as log₂ foldchange to control cells in 21% and 0.1% O₂ ($n = 3$ independent experiments).

B Epifluorescence (top) and quantitative image analysis (bottom) of immune-stained mitochondria (TOM20, green) from LDH KO P3 cells (Phalloidin, red; DAPI, blue) upon exposure to 0.1% O₂ ($n = 2$ independent experiments, 28–32 cells per group). Data are represented as mean and analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Mitochondrial mass: sgCont vs. sglDHA/B, $P = 0.005$; sglDHA/sgLDHB vs. sglDHA/B, $P = 0.006$. Network aspect ratio: sgCont vs. sglDHA/B, $P = 0.03$; sglDHA vs. sglDHA/B, $P = 0.02$; sglLDHB vs. sglDHA/B, $P = 0.04$. Mitochondrial mass corresponds to the area covered by the mitochondria relative to the entire cell area. Network aspect ratio is the ratio of the major axis to minor axis of the mitochondrial network. Scale bar: 10 μ m.

C LDH KO P3 cell mass-specific respiration obtained by oxygraphy analysis ($n = 4$ independent experiments). Data are represented as mean \pm s.e.m. and analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test: sgCont vs. sglDHA/B, $P = 0.015$; sglDHA/sgLDHB vs. sglDHA/B, $P = 0.005$. For details, see Fig 2H.

D Schematic representation of phenformin or irradiation effects on tumor cells.

E Kaplan–Meier survival curves of xenotransplanted mice with LDHA/B KO (red) or control (blue) P3 cells, treated with phenformin or irradiated with 10 Gy ($n = 6–8$ mice per group). Data are analyzed using Log-rank (Mantel–Cox) test: sgCont Vehicle vs. sgCont Phenformin, $P = 0.019$; sgCont Vehicle vs. sgCont Irradiation, $P = 0.0002$; sgCont Irradiation vs. sglDHA/B Irradiation, $P = 0.024$.

Source data are available online for this figure.

(Fig 5B). Under uncoupling conditions, double LDHA/B KO cells possessed higher respiratory capacity than the other cells (Fig 5C). Next, we evaluated cell viability by using 2-deoxyglucose (2-DG) and Atpenin A5 (AtpA5) to respectively inhibit glycolysis and OXPHOS via the respiratory complex II (Appendix Fig S7A). At 21% O₂, 2-DG induced toxicity in control and LDHA/B KO cells.

However, under hypoxia, control cells were more sensitive to 2-DG than LDHA/B KO cells (Appendix Fig S7B, higher panels). Interestingly, AtpA5 induced a higher death rate in double LDHA/B KO cells than in control cells in both oxygen conditions, but these effects appeared moderate (Appendix Fig S7A and B, lower panels). To inhibit redox balance, we chose to use phenformin as an *in vivo*

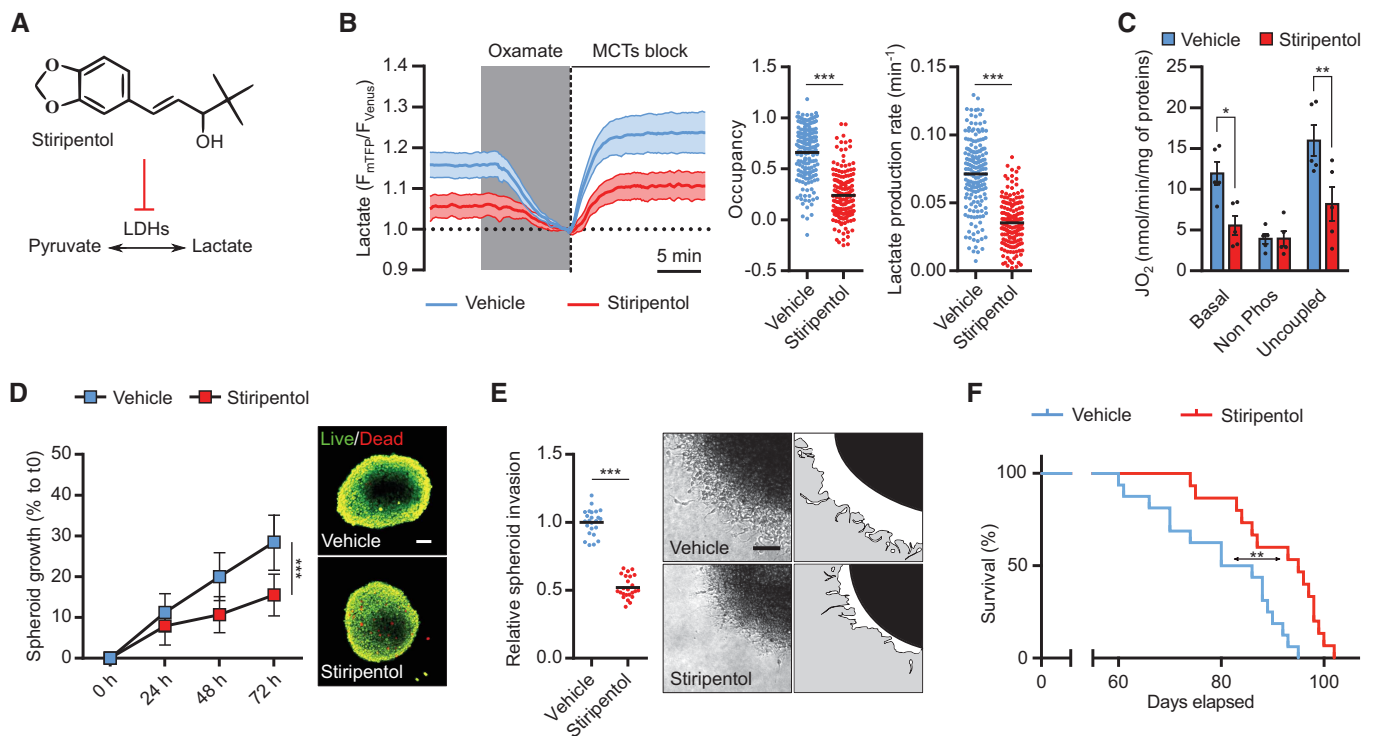


Figure 6. An antiepileptic drug reduces GB growth and invasion.

- A Stiripentol, an aromatic allylic alcohol drug that inhibits LDH.
- B Intracellular lactate level was analyzed with a fluorescent biosensor in P3 cells treated with vehicle or 500 μ M stiripentol. *Left*, lactate level monitored in basal condition, followed by sequential exposure to 6 mM oxamate and MCTCs block (1 μ M AR-C1558585 + 1 mM diclofenac). The response to oxamate and MCTCs block was used to determine, *Middle*, the basal lactate level (expressed as biosensor occupancy) and, *Right*, the lactate production rate ($n = 4$, 33–45 cells analyzed per condition). Data are represented as mean \pm s.e.m. (*Left*) or as mean (*Middle and Right*) and analyzed using unpaired *t*-test (Occupancy) and Mann–Whitney test (Lactate production). For both analyses, $P < 0.0001$.
- C P3 cell mass-specific respiration in cells treated with 500 μ M stiripentol, obtained by high-resolution oxygraphy analysis ($n = 5$ independent experiment). Data are represented as mean \pm s.d. and analyzed using two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test: Basal, $P = 0.013$; Non-Phos, $P > 0.99$; Uncoupled, $P = 0.003$ For details, see Fig 2H.
- D *Left*: P3 spheroid growth recorded over 72 h during incubation with stiripentol at 0.1% O_2 ($n = 3$ independent experiments, one experiment including eight spheroids per condition). Data are represented as mean \pm s.d., and growth at 72 h is analyzed using unpaired *t*-test: $P < 0.0001$. *Right*: Viability of spheroids at 72 h, incubated with calcein (green) or ethidium homodimer-1 (red). Scale bar: 100 μ m.
- E *Left*: P3 spheroid invasion in collagen I gel, incubated 24 h with 500 μ M stiripentol at 0.1% O_2 . Invasion rate is expressed as fold change from control ($n = 3$ independent experiments, one experiment including eight spheroids per condition). Data are represented as mean and analyzed using unpaired *t*-test: $P < 0.0001$. *Right*: Representative images of invasive spheroids for each condition. Scale bar: 100 μ m.
- F Kaplan–Meier survival curves of xenotransplanted mice with P3 cells. Mice were treated either with vehicle (blue) or stiripentol at 150 mg/kg (red) ($n = 15$ –16 mice per group). Data are analyzed using Log-rank (Mantel-Cox) test: $P = 0.002$.

Source data are available online for this figure.

respiratory complex I inhibitor and irradiation to interfere with metabolic adaptations of double LDHA/B KO tumor cells (Fig 5D). Phenformin treatment improved the survival of control tumor-bearing mice but not of LDHA/B KO tumor-bearing mice (Fig 5E), but cranial irradiation massively increased global mouse survival, with higher efficiency for mice bearing double LDHA/B KO tumors (Fig 5E).

The use of anti-epileptic drug targeting LDH activity efficiently reduces GB development

By carefully analyzing the literature, we found that the anti-epileptic drug stiripentol (Fig 6A) was characterized to cross the blood–brain barrier for inhibiting cerebral LDHA/B activity in preclinical therapy

studies in mice (Sada et al, 2015). We first validated LDH inhibition *in vitro* in P3 cells by intracellular lactate recording with the FRET biosensor *Laconic*. We found that lactate level decreased, and its production was inhibited by 50% after 24 h treatment with 500 μ M of stiripentol (Fig 6B). Interestingly, a decrease of lactate production was correlated with a drastic inhibition of basal and uncoupled respiration in stiripentol-treated P3 cells (Fig 6C). Furthermore, stiripentol significantly reduced P3 spheroid proliferation by 50% at 72 h (Fig 6D) and invasion (Fig 6E). To evaluate stiripentol *in vivo* antitumoral properties, P3 tumor-bearing mice were intraperitoneally injected with 150 mg/kg of stiripentol. Stiripentol treatment significantly increased survival compared to the control group (median survival was 80 days for control mice and 97 days for stiripentol-treated mice) (Fig 6F). To conclude, the antiepileptic

drug stiripentol is an excellent candidate to reduce GB growth and invasion.

Discussion

A joint property of many solid cancers, including GBs, is the upregulation of glycolysis, and it has been postulated that blocking glycolysis could be a good strategy to treat GBs. However, by using adapted cell models such as GB stem-like cells, metabolic plasticity has been described (Garnier *et al*, 2019). A metabolic symbiosis between glycolytic and oxidative areas has also been suggested as one of the main resistance drivers, mainly through a different regional expression of MCT1 and MCT4 (Allen *et al*, 2016). Our study pinpoints lactate as one of the main metabolic drivers, through both LDHA and LDHB activities, supporting tumor development and invasion in GB. Histological analysis of LDHA and LDHB expression demonstrated a clear pattern with LDHA predominantly expressed in the central hypoxic area, in agreement with our previous data (Talasila *et al*, 2017). In contrast, LDHB was expressed in peripheral and invasive tumor areas. Only a few cells were found positive for LDHA in peripheral and invasive regions of the tumor, such as in the corpus callosum. This pattern was confirmed by using spatial transcriptomics data from a recent publication (Ravi *et al*, 2022), in which the hypoxic area is characterized by high LDHA and CA9 expression and the invasive regions by high LDHB expression. These results strongly suggest that GBs are specifically organized to sustain tumor growth and invasion via a metabolic symbiosis based on LDH regional expression and, consequently, on lactate itself. This pattern was also confirmed in the collagen-embedded invasive spheroid model, where LDHA was mainly found in the hypoxic core of spheroid (Guyon *et al*, 2020) and a few invasive cells. LDHB is exclusively localized at spheroid borders and in invasive cells. This observed differential spatial distribution was reinforced by analyzing a single-cell database which includes RNAseq data from central and invasive GB regions (Darmanis *et al*, 2017). These results demonstrate that the spatial distribution of LDHA or LDHB echoes the expression of the lactate transporters MCT1 and MCT4 (Allen *et al*, 2016), supporting the hypothesis of a lactate shuttle between tumor cells, as described in the astrocyte-neuron lactate shuttle (ANLS) (Pellerin *et al*, 1998). We evidenced that lactate—as a single carbon source being retroconverted into pyruvate—can fuel the TCA cycle via stimulation of oxidative phosphorylation, an observation that becomes evident when inhibiting the respiratory chain complex I with rotenone. Our findings also show that lactate alone can regulate tumor invasion over proliferation in cells starved for most carbon sources by quickly fueling the TCA cycle. When glucose is present, lactate and acidification (by HCl) regulate GB invasion (Seliger *et al*, 2013). Acidification of the microenvironment participates in cell invasion by upregulating many factors, such as TGF β (Seliger *et al*, 2013). Tracing of metabolites with [$^{13}\text{C}_3$] lactate in starved GB stem-like cells quickly generated labeled pyruvate, which fuels the TCA cycle or is converted into alanine, which was found secreted into the extracellular space. The TCA cycle plays a central role in energy metabolism through acetyl-CoA oxidation but also in biosynthetic pathways (*e.g.*, non-essential amino acids or fatty acids; Owen *et al*, 2002). We showed that the TCA cycle and the coupled respiratory chain are essential in GB invasion as specific

inhibition with rotenone impairs this process. Moreover, exogenous lactate provides an essential and rapid carbon pool for citrate-mediated fatty acid biosynthesis (Chen *et al*, 2016; Minami *et al*, 2021). Consistent with a previous study (Chen *et al*, 2016), we observed a more minor $m + 2$ isotopologue contribution of α -ketoglutarate and succinate than citrate.

Single KO of LDHA does not significantly impact the stem-like GB cell models used in this study, which is different from LDHA KO neuroblastoma cells previously described (Dorneburg *et al*, 2018). When LDHA is absent, compensatory mechanisms are observed in our study, even under low oxygen conditions. KO LDHB cells were more aggressive in *in vitro* and *in vivo* experiments. Since LDHB preferentially mediates the retroconversion of lactate into pyruvate, its deletion led to an accumulation of extracellular lactate and protons, consequently higher invasive potential and a higher production of VEGF, inducing a strong vascular response and lower survival of implanted animals. Indeed, VEGF is one of the strongest inducer of neoangiogenesis and was shown to be activated via lactate and tumor acidosis, thus increasing endothelial cell proliferation (Vegran *et al*, 2011; Sonveaux *et al*, 2012). LDHB KO was previously characterized to be linked to autophagy, and reduction of cell proliferation (Brisson *et al*, 2016), which was not investigated in our study. Double LDHA/B KO decreased both proliferation and invasion and was also linked to the increase in apoptosis, thus improving mouse survival via reduction of the tumor mass. While complementary roles of LDHA and LDHB in brain tumor development have been reported in a neuroblastoma model (Dorneburg *et al*, 2018), double LDHA/B KO in GB stem-like cells induced a substantial decrease in tumor development via lactate production and consumption impairment. In an elegant publication, Zdravlevic and colleagues showed that LDHA or double LDHA/B ablation impaired melanoma and colon adenocarcinoma growth (Zdravlević *et al*, 2018). Cerebral tumors rely on low oxygen concentrations, which can partially explain these differences between the models. As lactate is immunosuppressive (Fischer *et al*, 2007), we are currently investigating macrophages/microglia activation in our *in vivo* models, as they represent the main immune cells in GB (Müller *et al*, 2017). Glioblastoma cells, among them GB stem-like cells, evolve in a different microenvironment than melanoma cells or adenocarcinoma cells, and thus, metabolic regulations during tumor growth may be different.

Accumulation and secretion of incompletely catabolized intermediates could reflect hyperactive metabolism (Meiser *et al*, 2018) or a blockade of essential pathways. The best example is the Warburg effect, where a high glycolytic rate leads to pyruvate excess that cannot be consumed by mitochondria, resulting in significant lactate production and secretion. In addition, GB LDHA/B KO cells lost the ability to maintain the redox balance under anaerobic conditions. Therefore, the double KO globally impacts cellular metabolism. This is associated with a decrease in glucose consumption, accumulation of the majority of intermediates from glycolysis and TCA, and secretion of formate or acetate. One possible explanation for fermentative by-product overflow is that the pyruvate-derived acetate is produced to maintain a lower redox potential to compensate for LDH KO (Liu *et al*, 2018). We also observed an increase in the expression of the mitochondrial respiratory complexes in LDHA/B KO cells in hypoxia to counteract the metabolic stress in these extreme conditions. To increase apoptosis in double LDHA/B KO tumors, phenformin was

used as an inhibitor of respiratory complex I. However, this treatment failed to increase apoptosis in double LDHA/B KO tumors which is possibly due to the compensation by other respiratory complexes or alternative metabolic pathways such as fatty acid oxidation. Of note, control tumors were found sensitive to phenformin treatment, as suggested by others (Jiang *et al*, 2016). After cranial irradiation, on the contrary, a strong increase in mouse survival was globally observed with a higher efficiency for double LDHA/B KO tumors, validating a combinatory strategy for inhibiting GB growth.

In a recent study, the use of anti-epileptics as anticancer drugs has been proposed, which could be beneficial for treating GB patients (Jung *et al*, 2019). Therefore, we took advantage of the use of stiripentol, an antiepileptic drug approved by the FDA for the treatment of Dravet Syndrome, because it also potently inhibits both LDHA and LDHB activity (Sada *et al*, 2015). Our results demonstrate that stiripentol inhibits lactate production, but we are the first to describe an inhibitory activity of cell respiration. Both inhibitory activities led to redox imbalance, thus reducing cell proliferation and invasion, and consequently increasing the survival of GB-bearing mice treated with stiripentol.

Altogether, we conducted a detailed analysis of the metabolic consequences of the deletion or inhibition of LDH enzymes in GB cells and demonstrated that targeting both LDHA and LDHB is required for efficient inhibition of tumor growth by destabilizing metabolic symbiosis between hypoxic and oxygenated areas. These results are of great translational significance because these enzymes may represent attractive candidates for further therapeutic development in GB.

Materials and Methods

Ethical issues

All mice were housed under specifically pathogen-free conditions at the Animalerie Mutualisee de Talence (University of Bordeaux, France) on a 12-h dark/light cycle with unlimited access to food and water. All experiments were performed with 8- to 11-week-old male mice and were randomly allocated to the treatment groups. Male RAG γ 2C $^{-/-}$ mice were born, housed, and treated in the same animal facility. All animal procedures have been done according to the institutional guidelines and approved by the local ethics committee (agreement number: A5522). The regional ethical committee approved the collection of biopsy tissue at Haukeland University Hospital, Bergen, Norway (REK 013.09), and by Humanitas Hospital (Milan, Italy).

Antibodies and reagents

The detailed information on primary and secondary antibodies used in this study is listed in Dataset EV1. For immunofluorescence, DAPI was used to stain DNA in blue, and Phalloidin-Rhodamine was used to stain the cytoskeleton in red. Calcein-AM and ethidium homodimer-1 were directly added to cultures in their usual media. Calcein-AM is converted into green fluorescent calcein by intracellular esterase and is an indicator of cell viability. Injured or dead cells uptake ethidium homodimer-1 which stained the DNA in red. Spheroids are incubated in these reagents for 45 min at 37°C, and then

images were directly taken. Reagents, products, and their corresponding references are listed in Dataset EV1.

Cell culture

Patient-derived GB P3 and BL13 cells were generated from patient samples as explained in a previous article (Daubon *et al*, 2019b). Cells were cultured in Neurobasal medium (NBM) supplemented with B27, heparin (100 U/ μ l), 20 ng/ml basic FGF, and Penicillin–Streptomycin (1,000 U/ml) at 37°C in a 5% CO $_2$ incubator. These cell lines underwent mycoplasma testing before their use. Negative mycoplasma contamination status was verified using specific PCR primers. All cell lines were used between passages 10 and 30 in culture to perform experimental procedures. Stable cell lines were generated by infecting lentiviral particles. For the generation of lentiviral particles, HEK293T cells were transfected with the lenti-CRISPR v2 vector with single guide RNA (sgRNA), psPAX2 (packaging construct), and pMD2.G (viral envelope). The culture medium was replaced by Opti-MEM with 20 mM HEPES 6 h after transfection. After 2–3 days of culture, the supernatant was collected and passed through a 0.22 μ m syringe filter. The virus-containing media supplemented with 8 μ g/ml polybrene was used to infect P3 and BL13 cells. The infected cells were selected in media with puromycin (0.75 μ g/ml) or blasticidin (10 μ g/ml) and the LDHA or/and LDHB deletion was assessed by Western blot.

sgRNA constructs

LDHA and LDHB sgRNAs were designed online (<http://crispr.mit.edu/>). The target sequences were 5'-TGCGAATACGCCACGCG ATGGG-3' for Control, 5'-CCGATTCGGTTACCTAATGGGG-3' for LDHA, and 5'-AAGATCACTGTAGTGGGTGT-3' for LDHB. The sgRNAs were then cloned into the lentiCRISPR v2 vector by BsmBI digestion.

Spheroid experimental assays

Protocols are described in detail in a previous article (Guyon *et al*, 2020). Briefly, P3 and BL13 spheroids of uniform size were prepared from 10 4 dissociated cells in NBM with 0.4% methylcellulose in a 96-well round-bottom plate. The spheroids were used after 3 days of formation. For spheroid growth, each spheroid was washed with PBS and individually replaced in fresh complete neurobasal medium with 0.4% methylcellulose supplemented with different treatments in a 96-well round bottom plate. For spheroid invasion, spheroids were washed in PBS and individually included in a 96-well flat-bottom plate in 100 μ l of type I collagen matrix prepared on ice with 1 mg/ml collagen type I and NaOH (initial concentration: 1 M, volume added correspond to 0.023 volume of collagen type I). The matrix was incubated at 37°C for 30 min and then, a complete neurobasal medium with different treatments was added on the matrix.

Intracranial implantation

For *in vivo* experiments, 5 spheroids of P3 or BL13 knock-out for LDHA, LDHB, or LDHA/B (only LDHA/B for BL13) and control cell lines were stereotactically implanted into the brain of immunodeficient RAG γ 2C $^{-/-}$ mice ($n = 8$ for survival or $n = 5$ for stopping at a given point, 7–9-week-old) housed and treated in the

animal facility of Bordeaux University (“Animalerie Mutualisée Bordeaux”). The animals were anesthetized with ketamine (1.5 mg/kg) and xylazine (150 µg/kg), and a burr hole was drilled 2.2 mm to the left of the bregma, and the spheroids were implanted into the cerebral cortex at 3 mm depth using a 10 µl Hamilton syringe. An analgesic procedure was applied with the subcutaneous injection of buprenorphine (0.1 mg/kg, once 10 min before and once 12–24 h after implantation). After 4 days, started the bevacizumab injections (10 mg/kg ip), and/or stiripentol (100 mg/kg ip), or phenformin (50 mg/kg ip) injection 3 times a week. The animals were euthanized by cervical dislocation at the end of the experiment, and brains were removed for further histological and immunohistological analyses.

Histological samples preparation

For the frozen process, mice brains were placed in a cryotube after extraction, directly frozen in liquid nitrogen without fixation, and stored at -80°C . Sections (10 µm) were prepared using a cryostat (CM1900, Microsystems) and mounted on slides. Before immunolabeling process (see below), cryo-sections were dried at room temperature for 10 min. They were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at room temperature and then washed 3-times in phosphate-buffered saline (PBS). For the paraffin process, mice brains or other samples were fixed with 4% PFA for 15 min at room temperature and then washed 3-times in PBS. Samples were dehydrated serially in 70, 96, and 100% ethanol then toluene, and paraffinized. Sections (10 µm) were prepared using a microtome (Leica) and mounted on slides. Before immunolabeling process (see below), paraffin-embedded sections were deparaffinized in toluene and hydrated serially in 100, 96, and 70% ethanol and distilled water then for 1 h at 95°C in citrate buffer before the staining procedure.

Immunolabeling process

Samples were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 15 min, quickly washed in PBS, and blocked with 1% bovine serum albumin and 2% fetal donkey serum (FDS) in PBS (blocking buffer) for 1 h. Samples were incubated with primary antibodies in blocking buffer overnight at 4°C , followed by a 3-time PBS wash and incubation with secondary antibodies in blocking buffer for 1 h, for staining DNA or/and cytoskeleton, samples were treated with DAPI or/and Phalloidin Rhodamine, respectively. Samples were washed 3-times in PBS and were mounted using Prolong Gold antifade reagent.

Western blot

Cells were washed twice in PBS and, depending on the analysis, two procedures were used for protein lysis. (1) Cells were lysed in RIPA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1% TritonX-100, 1 mM EDTA) containing proteases and phosphatases inhibitors. Protein concentrations were determined using a bicinchoninic acid assay. Cell lysates were resuspended in Laemmli Buffer (LB - 62.5 mM Tris, 10% glycerol, 2.5% SDS, 5% β -mercaptoethanol, pH 6.8). (2) Cells were directly lysed in LB. All protein extracts (1 and 2) were separated on an acrylamide gel

(10% for LDHA and B, 4–12% precast gels [Invitrogen] for OXPHOS proteins) and transferred to a nitrocellulose membrane. After blocking in blocking buffer for 1 h at room temperature, membranes were incubated with different primary antibodies overnight at 4°C . After 3 washes in TBST (20 mM Tris, 0.5 N NaCl, 0.1% Tween-20, pH = 8) and 1 in TBS (20 mM Tris, 0.5 N NaCl, pH = 8), membranes were incubated with IR-Dye 680 or 800 labeled secondary antibodies, or secondary antibodies coupled with HRP.

Image acquisition and analysis

For Western blot analysis, membranes were imaged using Odyssey infra-red scanner (LI-COR). The densitometry of proteins was quantified using Image Studio Lite Software with normalization against tubulin or vinculin. Uncropped immunoblot are depicted in Appendix Figs S8–S10. For cell or spheroid experiment assays, images were acquired with an Eclipse Ti Nikon microscope equipped with NIS (Nikon imaging element) software based on $\times 4$, $\times 10$, or $\times 20$ objective lens (Nikon), a Hamamatsu Digital CCD C10600-10B camera. Images were acquired in brightfield or/and color filters (red/green) at the plane level where the contrast is the most pronounced. Fiji software with different open-access macros was used for image analysis (Github). Images of the spheroid growth were acquired at 0 h, and every 24 h (total duration dependent on the experiments), growth was quantified as the percent of change of the spheroid area relative to 0 h. Images of the spheroid invasion were acquired at 24 h, and invasion was quantified as the invasive area (total area—core area) normalized to the core area and expressed as a fold change relative to the control group for each independent experiment. For samples from the immunolabeling process, images were acquired with a confocal microscope (Nikon Elipse Ti) or epifluorescence microscope (Nikon). The pipeline analysis of mitochondrial morphology and mass was adapted in Fiji software (Koopman *et al*, 2006). The slide scanner was a Nanozoomer 2.0HT with a fluorescence imaging module (Hamamatsu Photonics France) using objective UPS APO 20X NA 0.75 combined with an additional lens 1.75 \times , leading to a final magnification of 35 \times . Virtual slides were acquired with a TDI-3CCD camera. Fluorescent acquisitions were done with a mercury lamp (LX2000 200W - Hamamatsu Photonics, Massy, France) and the set of filters adapted for DAPI, and/or green fluorescent protein (GFP)/Alexa 488, and/or Alexa 568 and or Alexa 647/Cy5 fluorescence. Images from Appendix Fig S1 were analyzed as previously described analysis (Daubon *et al*, 2019b).

TCGA glioblastoma cohort

The TCGA Glioblastoma (GBM) RNAseqV2 normalized data (level 3, $\log_2(x + 1)$ transformed RSEM normalized count, version 2017-10-13), the associated clinical data and complementary clinical data from GDC pancan were downloaded from the xenabrowser website datapages (<https://xenabrowser.net/datapages/>).

For the genes LDHA and LDHB, primary tumor samples from the GBM cohort were split into three groups of equivalent size defined by the level of their expression. Overall survival (in months) was used to estimate survival distributions using the Kaplan–Meier method, and the three distributions were compared using the log-rank test.

Ivy-GAP cohort

The expression of HIF1A, LDHA, and LDHB was downloaded from the Ivy Glioblastoma Atlas Project (Ivy-GAP) website (<https://glioblastoma.alleninstitute.org/rnaseq/search/index.html>) with associated clinical data. Spearman's correlation was computed between HIF1A and LDHA and between HIF1A and LDHB for all samples and for each anatomic structure separately.

Spatial transcriptomics analysis

LDHA, LDHB, and CAIX/CA9 expression was analyzed as previously described (Ravi *et al*, 2022) in three different patient samples.

Sample preparation and transcriptomic profiling

P3 sgControl, sgLDHA, sgLDHB, and sgLDHA/B were cultivated under 0.1% or 21% oxygen for 48 h. Total RNA was extracted from fresh frozen cells with the Qiagen RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's protocol. Quality and quantity of RNA was checked using a Fragment Analyzer (Agilent) with the company's Standard Sensitivity RNA Kit (DNF-471). Libraries were prepared using the TruSeq stranded mRNA Kit (Illumina). All barcoded samples were pooled and sequenced together in 75 nt paired-end mode with an Illumina NextSeq500 in 2 runs to reach sufficient coverage. Runs were demultiplexed with bcl2fastq (v2.20.0.422, Illumina).

Transcriptomic sequencing was performed in collaboration with Core Unit for Molecular Tumor Diagnostics (CMTD), National Center for Tumor Diseases (NCT), Dresden-Germany. The R package DESeq2 was used to identify differentially expressed genes using a stringent threshold: absolute value of Log₂ Fold Change (LFC) > 1 and *P*-value adjusted for multiple testing (*P*-adjust) < 0.01. KEGG pathways enrichment analysis was done with the R package ClusterProfiler (Yu *et al*, 2012). Gene Ontology (GO) terms enrichment analysis was done with the R package BACA with the EASE score set at 0.01. Only GO terms from Biological Pathways level 5 were used for this analysis. GO terms were clustered to get annotation clusters with a similarity of genes > 0.85. Finally, read counts were transformed using variance stabilizing transformations (VST).

Bioinformatics analysis

Quality of obtained fastq files was initially checked by FastQC v0.11.4 (Wingett & Andrews, 2018) followed by adapter removal and quality trimming using Trim Galore v0.4.2. Mapping of reads to the human reference genome (GRCh38 Ensembl release 95) was done using STAR v2.5.3a with standard settings (Dobin *et al*, 2013) and duplicates were marked using Picard tools v1.141.

Quality analysis of mapped reads was done using RSeQC v3.0.0 (Wang *et al*, 2012) to analyze read distributions across gene bodies. Raw read counts per gene were determined by counting gene-specific reads in exons of protein-coding genes using FeatureCounts v1.5.3 (Liao *et al*, 2014). Finally, a gene expression data matrix was created by removing genes without any reads and lowly expressed genes (< 1 read per million in more than 50% of samples) followed by cyclic loess normalization resulting in normalized log₂-counts per million for 14,111 protein-coding genes that were measured in each sample.

The R package DESeq2 (Love *et al*, 2014) v1.22.2 was used to identify differentially expressed genes. Enrichment analysis was performed using the ClusterProfiler (Yu *et al*, 2012) R package v3.10.1. Gene Ontology (GO) terms enrichment analysis was visualized

using Bubble Chart to Compare Annotations (BACA) using the *P*-value threshold at 0.01. Only GO terms from Biological Pathways level 5 were used for this analysis. GO terms were clustered to get annotation clusters with a similarity of genes > 0.85. PathView R package v.1.22.3 was used to visualize KEGG metabolic pathways.

Sample preparation and metabolic profiling

Metabolite extraction was performed using 80% methanol and 0.2% of myristic acid d27 (internal standard). After 5 min of incubation, cells were scraped and collected in a new tube. Following a centrifugation at 20,000 g for 10 min at 4°C, the supernatant was transferred to a new vial for MS analysis. Pellet was used for protein quantification.

10 µl of each sample was loaded into a Dionex UltiMate 3000 LC System (Thermo Scientific Bremen, Germany) equipped with a C-18 column (Acquity UPLC-HSS T3 1.8 µm; 2.1 × 150 mm, Waters) coupled to a Q Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific) operating in negative ion mode. A step gradient was carried out using solvent A (10 mM TBA and 15 mM acetic acid) and solvent B (100% methanol). The gradient started with 0% of solvent B and 100% of solvent A and remained at 0% B until 2 min post-injection. A linear gradient to 37% B was carried out until 7 min and increased to 41% until 14 min. Between 14 and 26 min the gradient increased to 100% of B and remained at 100% B for 4 min. At 30 min the gradient returned to 0% B. The chromatography was stopped at 40 min. The flow was kept constant at 250 µl/min at the column and was placed at 25°C throughout the analysis. The MS operated in full scan mode (*m/z* range: [70–1,050]) using a spray voltage of 3.2 kV, capillary temperature of 320°C, sheath gas at 10.0, auxiliary gas at 5.0. The AGC target was set at 3e6 using a resolution of 140,000, with a maximum IT fill time of 512 ms. Data collection was performed using the Xcalibur software (Thermo Scientific). The data analyses were performed by integrating the peak areas (El-Maven—Polly—Elucidata).

Metabolomic profiling was performed in collaboration with MetaboHUB-MetaToul ([¹³C]₆ Glucose) and VIB Metabolomics ([¹³C]₆ Lactate). The Principal Component Analysis (PCA) was done on the total geometric mean abundance of each metabolite in each condition. PCA is realized with the `dudi.pca` function from the R package «`ade4`» and visualized with `ggplot`. Metabolite abundance between two conditions was analyzed using the non-parametric Mann–Whitney test with a Benjamini–Hochberg correction for multiple comparisons. For visualization purposes, comparisons between two conditions may be Log₂-transformed.

Metabolomics supplemental method: [¹³C]₆ glucose—¹³C Isotopic profiling**Sample preparations**

For cells in suspension (fast filtration method), 1 ml of cell culture is dropped on a filter (Sartolon Polyamide 0.2 µm) in order to eliminate cultivation medium. The filter is then rinsed with washing solution, quickly removed from the filtration unit, put on an aluminum foil, and frozen in liquid nitrogen. Every filter is then extracted into a centrifuge tube containing the 5 ml of cold sampling solution (see table below). The centrifuge tubes are then vortexed and placed 1 h at –20°C. After 1 h, the tubes are centrifuged 5 min at 2,000 g and the supernatant is put in a new tube for evaporation.

Types of metabolites	Sampling solution composition	Temperature of extraction	Duration of extraction	Evaporation	Solution of resuspension
Central metabolites	ACN(4)/MeOH(4)/ H ₂ Omq (2) 125 mM formic acid	-20°C	1 h minimum	SpeedVac	Water
Intracellular amino acids	ACN(4)/MeOH(4)/ H ₂ Omq (2) 125 mM formic acid	-20°C	1 h minimum	SpeedVac	Water
Coenzyme A	ACN(4)/MeOH(4)/ H ₂ Omq (2) 125 mM formic acid	-20°C	1 h minimum	SpeedVac	2% methanol, 98% water, 25 mM formic acid, pH adjusted at 3.5

For cell supernatants, the sampling procedure is based on the separation of the cells from the medium thanks to the combination of filtration and centrifugation. This gives access only to the exometabolome content for metabolomics or fluxomics studies. The supernatant can be stored at -80°C before shipment and analysis evaporated. Then samples are prepared either for NMR or MS analysis manually or automatically using a robotic station.

To control the quality of the analysis, blank samples are done for each type of sample (culture medium, conditions, treatment...). These blank samples are obtained from a "cell-free" culture made in parallel and sampled in the same way and time as the culture with cells.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) profiling

The acquisition of 1D 1H NMR Avance II 800 MHz equipped with a 5 mm CQPCI Z-Gradient cryoprobe. Following parameters were used for the acquisition: Pulse program: zgpr30; Pulse angle 30°; Time Domain (TD) 64 k; Number of dummy scan: 4; Number of scan: 32; Acquisition time: 2.04 s; Pulse P1 length: 7.70 µs; Pulse P1 power: -12.39 dB; Pulse P9 power: 43.79 dB; Acquisition temperature: 280°K. Raw data obtained after acquisition are FID. A Fourier transform was applied for each spectrum with a specific smoothing (efp with LB = 0.3 and SI = 128 K). Phase and baseline correction was also performed using automatic tools from TopSpin 3.5 software before the automatic integration of specific signals belonging to exo-metabolites present in the samples. Absolute quantification of metabolites of interest was performed using the internal standard TSP-d4 as reference. The quality of the analysis is based on the good resolution of the spectrum: width at half height for TSP-d4 signal < 2.5 Hz.

Liquid chromatography/Mass Spectrometry analysis

Central metabolites were separated on an ionic chromatography column IonPac AS11 (250 × 2 mm i.d.; Dionex, CA, USA). Solvent used was KOH at a flow rate of 350 µl/min. Solvent was varied as follows: 0 min: 2%, 2 min: 2%, 10 min: 5%, 16 min: 35%, 20 min: 100% and 24 min: 100%. The column was then equilibrated for 6 min at the initial conditions before the next sample was analyzed. The volume of injection was 15 µl. High-resolution experiments were performed with an ICS5000+, ion chromatography system (Dionex, CA, USA) coupled to an LTQ Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a heated electrospray ionization probe. MS analyses were performed in negative FTMS mode at a resolution of 60,000 (at 400 *m/z*) in full-scan mode, with the following source parameters: the capillary temperature was 350°C, the source heater temperature, 300°C, the sheath gas flow rate, 50 a.u. (arbitrary unit), the auxiliary gas flow rate, 5 a.u., the S-Lens RF level, 60%, and the source voltage, 3.5 kV.

Amino acids were separated on a PFP column (150 × 2.1 mm i.d., particle size 5 µm; Supelco Bellefonte, PEN, USA). Solvent A was 0.1% formic acid in H₂O and solvent B was 0.1% formic acid in acetonitrile at a flow rate of 250 µl/min. Solvent B was varied as follows: 0 min: 2%, 2 min: 2%, 10 min: 5%, 16 min: 35%, 20 min: 100% and 24 min: 100%. The column was then equilibrated for 6 min at the initial conditions before the next sample was analyzed. The volume of injection was 5 µl. High-resolution experiments were performed with a Vanquish HPLC system coupled to an Orbitrap Qexactive+ mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a heated electrospray ionization probe. MS analyses were performed in positive FTMS mode at a resolution of 70,000 (at 400 *m/z*) in full-scan mode, with the following source parameters: the capillary temperature was 320°C, the source heater temperature, 300°C, the sheath gas flow rate, 40 a.u. (arbitrary unit), the auxiliary gas flow rate, 10 a.u., the S-Lens RF level, 40%, and the source voltage, 5 kV.

All the metabolites were determined by extracting the exact mass with a tolerance of 5 ppm. For central metabolites isotopic profile analysis and amino acids isotopic profile analysis, their concentrations have to be included in the dynamic range of the method, respectively. This range was determined during the method validation with the PA-PT sample and corresponds to the total area of the cluster/number of isotopologues with a bias of < 5%.

Data quality

Filters and supernatants were received on 03.04.19 and analyzed on 10.04.19 (MS) and 11.04.19 (NMR). All the acceptability criteria were satisfied, and values meet MetaToul's acceptance as shown in the table below.

		Acceptability criteria
MS calibration ≤ 7 days	Day of injection (11.04.19)	Passed
Bias on Pascal Triangle sample ≤ 5%	PEP: -1.4% max	Passed
	FruBP: -2.5% max	Passed
	ATP: 2.4% max	Passed

Data extraction and quality

The data extraction of the raw mass spec data files yielded information that could be loaded into a relational database. Peaks were identified using IsoCor peak integration software (Millard *et al*, 2012).

Normalization

Data correction was performed to correct variation resulting from the difference of cell number into each condition. For abundance

interpretation, sample P3 LDHA/B at 24 and 48 h was concentrated 2 times.

Metabolomic and transcriptomic representation

Metabolome and transcriptome were independently analyzed (see above). Due to the difficulty in examining detailed metabolic networks using several cell lines and conditions, two representations are proposed. The first one, called metabologram (Hakimi *et al*, 2016), has the ability to visualize data at pathway level relative to the second one, which is the classical detailed network map of central carbon. In order to avoid redundancy of data, the metabologram showed all the isotope abundances in metabolites and the network map showed only the [¹³C]-labeled abundance in metabolite in order to trace the pathway of [¹³C]-initial metabolite. For each pathway and after the stringent threshold based on log₂ FC and *P*-value (*P* < 0.05), transcripts are selected according to the KEGG pathway database.

Intracellular lactate recording

Cultured P3 spheroids were gently dissociated and seeded on 18 mm glass coverslips treated with Matrigel. Constructs coding for the lactate-sensitive FRET biosensor Laconic (San Martín *et al*, 2013) have been described previously and are available through Addgene (Plasmid #44238). Adenoviral vectors encoding the FRET biosensor were custom-made by Vector Biolabs. The lactate-sensitive biosensor Laconic was expressed by exposing cells to 1×10^6 PFU of adenoviral particles (serotype 5) overnight. After 48–72 h post-infection, cells were imaged on wide-field mode with an inverted LEICA DMI6000B microscope (Leica Microsystems, Germany), equipped with a motorized stage Scan IM (Märzhäuser, Germany), a 40× oil-immersion objective (NA 1.25), a excitation system Lumencor spectra 7 (Lumencor, US) and a Coolsnap HQ2 CDD camera (Photometrics, US). Cells were superfused with an imaging solution consisting of (in mM): 10 HEPES, 112 NaCl, 24 NaHCO₃, 3 KCl, 1.25 MgCl₂, 1.25 CaCl₂, 10 glucose and bubbled with air/5% CO₂ at 37°C with a constant flow of 3 ml/min. For fluorescent ratio measurements, cells expressing Laconic were excited at 430 nm for 0.05–0.1 s, and emission was collected with band-pass filters mounted on a motorized filter wheel, at 465–485 nm for mTFP and 542–556 nm for Venus, with image acquisition every 10 s. The ratio between mTFP and Venus was computed and is proportional to the intracellular lactate level. To quantify differences in lactate level, biosensor occupancy was computed as a proxy of intracellular lactate level with the following equation: Occupancy = (R-Rmin)/(Rmax-Rmin), in which R: basal mTFP/Venus ratio (before any drug treatment), Rmin: steady-state mTFP/Venus ratio induced by oxamate (6 mM), Rmax: steady-state mTFP/Venus ratio induced by MCTs block (1 μM AR-C155858 and 1 mM diclofenac). Lactate production rate was computed by fitting a linear rate to the first minutes of lactate accumulation during MCTs block. Fluorescence ratios were normalized to Rmin before quantifications.

LDHA immunoprecipitation and enzymatic activity assay

LDHA was immunoprecipitated, and the enzymatic activity was measured as previously described (Ji *et al*, 2017) with some modifications.

Immunoprecipitation

In brief, cells were incubated for 4 h in a buffer containing 0.3% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), and inhibitors of proteases and phosphatases. Lysates, obtained by centrifugation at 13,000 *g* for 10 min, were pre-cleared with protein A/G agarose beads (16% of sample volume) for 1 h. After a short centrifugation, pellets were discarded and the protein content of the supernatants was measured by Bradford assay. Samples, diluted to obtain equal protein concentration, were incubated overnight with anti-LDHA antibodies (LDHA sc-137,243, Santa Cruz Biotechnology) at the final concentration of 9 ng of Ab/μg of proteins. Then, protein A/G agarose beads (16% of sample volume) were added to the lysates, which were incubated for further 4 h. After a short centrifugation, the pellets containing LDHA proteins coupled to the agarose beads were washed once and resuspended in Tris-HCl 0.2 M pH 7.3. All the centrifugation steps were performed at 4°C, incubations were carried out at 4°C with gentle shaking. When indicated, cells were incubated at 0.1% O₂ for 48 h.

Enzymatic assay

LDHA-immunoprecipitated proteins were added to the reaction buffer (0.2 M Tris-HCl pH 7.3, 0.05% BSA, 10 mM MgCl₂, 2 mM pyruvate, 0.5 mM NADH) and the enzymatic activity was determined by measuring NADH oxidation (reduction in absorbance) at 340 nm at 25°C using a CLARIOstar (BMG Labtech).

LDH and LDHB activities

In the LDH assay (ab102526), LDH reduces NAD to NADH, which then interacts with a specific probe to produce a color (OD max = 450 nm) based on whole lysates (LDHA + LDHB isozymes) while LDHB activity is measured on LDHB enzyme which was immune-captured within the wells of the microplate (ab140361) and determined by following the production of NADH catalyzed by the enzyme (LDHB isozymes, alone). Recommendations from the manufacturer were followed for the optimal procedure.

Elisa VEGF

Supernatants were collected from all cell lines and a VEGF Human ELISA Kit (Thermo Fisher), and procedure was followed based on manufacturer instructions.

Statistical analysis

No statistical methods were used to predetermine the sample size. The experiments were not randomized, and investigators were not blinded to allocation during experiments and outcome assessment. GraphPad Prism software and RStudio were used for analyses. Equality of variances was made with a *F*-test for two groups and a Brown-Forsythe test for at least three groups. According to homoscedasticity, comparisons of two groups were made by an unpaired two-tailed *t*-test or a Mann-Whitney test. Comparisons of at least three groups were performed using a one-way ANOVA followed by a Dunnett's or Tukey's multiple comparisons test or Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparisons test. A two-way ANOVA test was used to compare two or more two groups with two variables or more than two variables (*e.g.*, 21%

The paper explained

Problem

Lactate is a central metabolite in brain function but also in tumor development. Glioblastomas are very heterogeneous and severe brain tumors with minimal treatment for patients. Yet, a better understanding of how brain tumor cells adapt to oxygen constraints via metabolic rewiring is crucial.

Results

Using multiple models such as immunostainings on 3D invasive spheroids or patient-derived tumors and spatial transcriptomics data on patient material, we described a regional expression of lactate dehydrogenase (LDH) A and B in glioblastoma, suggesting a metabolic symbiosis between glycolytic and oxidative cells through lactate transfer. Indeed, LDHA is more expressed in hypoxic areas, and a few invasive cells, and LDHB is expressed in oxygenated/vascularized and invasive regions. We then showed that lactate, massively produced in hypoxic areas, fuels TCA cycle to sustain the invasion and proliferation of glucose-starved cells. Only double LDHA/B KO led to a drastic decrease in tumor development and invasion. However, metabolic adaptation through respiratory chain remodeling and activity happened in double LDHA/B KO cells, even under low oxygen concentration. Thus, cranial radiation of the LDHA/B KO tumors further improved mouse survival. Finally, we repurposed an antiepileptic drug, stiripentol, to directly target LDHA and LDHB activity, which led to decreased cell respiration, proliferation, and invasion, and further increased survival in intracranially implanted mice.

Impact

Metabolic symbiosis in tumors is a central phenomenon which could be a good therapeutic target to efficiently treat patients with glioblastoma. Finding drugs crossing the blood–brain barrier and having specific inhibition activity on major metabolic enzymes, such as LDHs, led to a massive decrease in glioblastoma development in mouse models. Potential clinical studies can be based on these promising results.

and 0.1% O₂) or repeated measures at different times followed by a Tukey's multiple comparisons test. Survival analyses were made using log-rank Mantel-Cox test. All the tests used were indicated in the figure legends. *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

Data availability

Transcriptomics data for this study have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA): accession number PRJEB45718.

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique - France (CNRS) and INSERM (recurrent fundings) and the "Ligue Contre le Cancer" (N°228841#1) and the Fondation ARC (N°216415#1), Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales (N°225119#1), PLBIO INCa (N°227441#1), Cancéropôle GSO (N°2020-EC29), and the SIRIC-BRIO to TD and AB and by Helse Vest, Haukeland Hospital, The Norwegian Research Council and Stiftelsen Kristian Gerhard Jebsen Research Foundation for RB. CB is a recipient of SIRIC BRIO funding for her postdoctoral position. The authors thank Dr Jubayer A Hossain, Dr Matthias Preussler, and Matteo Gambarretti for

preliminary experiments, Pr Marina Kreutz, Pr Kathrin Jenner, Sonja-Maria Decking and Nathalie Babl, and then Maxime Toujas and Lucie Brisson for their help during the revision process, Arnaud Villacreces and Dr Jean-Max Pasquet from the « Celloxia, modeling the hypoxic niche » facility for their technical assistance (Univ. Bordeaux, INSERM U1035, F-33000 Bordeaux, France), the VIB-CCB Metabolomics Expertise Center for the 13C-lactate metabolic analyses, with Pr Bart Ghesquiere, and MetaToul facility for 13C-glucose analysis and their expertise (Lindsay Peyriga, Florian Bellvert, Pr Jean-Charles Portais et Maud Heuillet), Biocodex for providing stiripentol (Marc Verleye), Dr Florence Cavalli for advising the use of bioinformatics tools, Dr Yapeng Li from Peking University for proving all details on IP LDHA and activity, and Dr Arnaud Mourier for the constructive criticism of the manuscript and performed experiments. We are also grateful for the work done by Marcia Campistron and Marie-Paule Algeo from Animalerie Mutualisee de Talence. The microscopy was done in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, a member of the national infrastructure France Bioimaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).

Author contributions

Joris Guyon: Data curation; formal analysis; investigation; visualization; methodology; writing—review and editing. **Ignacio Fernandez-Moncada:** Conceptualization; formal analysis; validation; investigation; methodology. **Claire M Larrieu:** Data curation; formal analysis; investigation. **Cyrielle L Bouchez:** Data curation; investigation. **Antonio C Pagano Zottola:** Data curation; formal analysis; investigation; methodology. **Johanna Galvis:** Software; investigation; methodology. **Tiffanie Chouleur:** Investigation. **Audrey Burban:** Investigation. **Kevin Joseph:** Resources; validation; methodology. **Vidhya M Ravi:** Resources. **Heidi Espedal:** Investigation. **Gro Vatne Røslund:** Investigation. **Boutaina Daher:** Investigation. **Aurelien Barre:** Formal analysis; methodology. **Benjamin Dartigues:** Formal analysis; methodology. **Slim Karkar:** Methodology. **Justine Rudewicz:** Formal analysis; methodology. **Irati Romero-Garmendia:** Investigation. **Barbara Klink:** Resources. **Konrad Grützmann:** Resources; methodology. **Marie-Alix Derieppe:** Investigation. **Thibaut Molinié:** Investigation. **Nina Obad:** Investigation. **Céline LEON:** Investigation. **Giorgio Seano:** Writing—review and editing. **Hrvoje Miletic:** Writing—review and editing. **Dieter Henrik Heiland:** Resources. **Giovanni Marsicano:** Supervision; writing—original draft. **Macha Nikolski:** Supervision; methodology; writing—original draft; writing—review and editing. **Rolf Bjerkvig:** Resources; supervision; funding acquisition; writing—original draft. **Andreas Bikfalvi:** Supervision; funding acquisition; writing—original draft; writing—review and editing. **Thomas Daubon:** Conceptualization; data curation; formal analysis; supervision; funding acquisition; validation; investigation; methodology; writing—original draft; project administration; writing—review and editing.

Disclosure and competing interests statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Allen E, Miéville P, Warren CM, Saghafinia S, Li L, Peng M-W, Hanahan D (2016) Metabolic Symbiosis enables adaptive resistance to anti-angiogenic therapy that is dependent on mTOR signaling. *Cell Rep* 15: 1144–1160
- Altenberg B, Greulich KO (2004) Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84: 1014–1020
- Baumann F, Leukel P, Doerfelt A, Beier CP, Dettmer K, Oefner PJ, Kastenberger M, Kreutz M, Nickl-jockschat T, Bogdahn U *et al* (2009) Lactate promotes

- glioma migration by TGF- β 2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. *Neuro-Oncol*: 368–380
- Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ (1996) Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 1079–1089
- Brisson L, Bański P, Sboarina M, Dethier C, Danhier P, Fontenille M-J, Van Hée VF, Vazeille T, Tardy M, Falces J et al (2016) Lactate dehydrogenase B controls lysosome activity and autophagy in cancer. *Cancer Cell* 30: 418–431
- Chen Y-J, Mahieu NG, Huang X, Singh M, Crawford PA, Johnson SL, Gross RW, Schaefer J, Patti GJ (2016) Lactate metabolism is associated with mammalian mitochondria. *Nat Chem Biol* 12: 937–943
- Chesnelong C, Chaumeil MM, Blough MD, Al-Najjar M, Stechishin OD, Chan JA, Pieper RO, Ronen SM, Weiss S, Luchman HA et al (2014) Lactate dehydrogenase a silencing in IDH mutant gliomas. *Neuro Oncol* 16: 686–695
- Colen CB, Shen Y, Ghoddoussi F, Yu P, Francis TB, Koch BJ, Monterey MD, Galloway MP, Sloan AE, Mathupala SP (2011) Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: an in vivo study 1. *Neoplasia* 13: 620–632
- Contreras-Baeza Y, Sandoval PY, Alarcón R, Galaz A, Cortés-Molina F, Alegría K, Baeza-Lehnert F, Arce-Molina R, Guequén A, Flores CA et al (2019) Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) is a high affinity transporter capable of exporting lactate in high-lactate microenvironments. *J Biol Chem* 294: 20135–20147
- Darmanis S, Sloan SA, Croote D, Mignardi M, Chernikova S, Samghababi P, Zhang Y, Neff N, Kowarsky M, Caneda C et al (2017) Single-cell RNA-seq analysis of infiltrating neoplastic cells at the migrating front of human glioblastoma. *Cell Rep* 21: 1399–1410
- Daubon T, Guyon J, Raymond A-A, Dartigues B, Rudewicz J, Ezzoukhy Z, Dupuy J-W, Herbert JMJ, Saltel F, Bjerkvig R et al (2019a) The invasive proteome of glioblastoma revealed by laser-capture microdissection. *Neurooncol Adv* 1: vdz029
- Daubon T, Léon C, Clarke K, Andrique L, Salabert L, Darbo E, Pineau R, Guérit S, Maitre M, Dedieu S et al (2019b) Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development. *Nat Commun* 10: 1146
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29: 15–21
- Dorneburg C, Fischer M, Barth TFE, Mueller-Klieser W, Hero B, Gecht J, Carter DR, de Preter K, Mayer B, Christner L et al (2018) LDHA in neuroblastoma is associated with poor outcome and its depletion decreases neuroblastoma growth independent of aerobic glycolysis. *Clin Cancer Res* 24: 5772–5783
- Drent M, Cobben NAM, Henderson RF, Wouters EFM, van Dieijen-Visser M (1996) Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur Respir J* 9: 1736–1742
- Fack F, Espedal H, Keunen O, Golebiewska A, Obad N, Harter PN, Mittelbronn M, Bähr O, Weyerbrock A, Stuhr L et al (2015) Bevacizumab treatment induces metabolic adaptation toward anaerobic metabolism in glioblastomas. *Acta Neuropathol* 129: 115–131
- Fantin VR, St-Pierre J, Leder P (2006) Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9: 425–434
- Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S et al (2007) Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 109: 3812–3819
- Garnier D, Renoult O, Alves-Guerra M-C, Paris F, Pecqueur C (2019) Glioblastoma stem-like cells, metabolic strategy to kill a challenging target. *Front Oncol* 9: 118
- Gatenby RA, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4: 891–899
- Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M (2003) Cost of migration: Invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* 21: 1624–1636
- Goetze K, Walenta S, Ksiazkiewicz M, Kunz-Schughart LA, Mueller-Klieser W (2011) Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int J Oncol* 39: 453–463
- Guyon J, Andrique L, Pujol N, Røslund GV, Recher G, Bikfalvi A, Daubon T (2020) A 3D spheroid model for glioblastoma. *J Vis Exp JoVE* <https://doi.org/10.3791/60998>
- Hakimi AA, Reznik E, Lee C-H, Creighton CJ, Brannon AR, Luna A, Aksoy BA, Liu EM, Shen R, Lee W et al (2016) An integrated metabolic atlas of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 29: 104–116
- Hisanaga K, Onodera H, Kogure K (1986) Changes in levels of purine and pyrimidine nucleotides during acute hypoxia and recovery in neonatal rat brain. *J Neurochem* 47: 1344–1350
- Ji Y, Yang C, Tang Z, Yang Y, Tian Y, Yao H, Zhu X, Zhang Z, Ji J, Zheng X (2017) Adenylate kinase hCINAP determines self-renewal of colorectal cancer stem cells by facilitating LDHA phosphorylation. *Nat Commun* 8: 15308
- Jiang W, Finniss S, Cazacu S, Xiang C, Brodie Z, Mikkelsen T, Poisson L, Shackelford DB, Brodie C (2016) Repurposing phenformin for the targeting of glioma stem cells and the treatment of glioblastoma. *Oncotarget* 7: 56456–56470
- Jung E, Alfonso J, Osswald M, Monyer H, Wick W, Winkler F (2019) Emerging intersections between neuroscience and glioma biology. *Nat Neurosci* 22: 1951–1960
- Koopman WJH, Visch H-J, Smeitink JAM, Willems PHGM (2006) Simultaneous quantitative measurement and automated analysis of mitochondrial morphology, mass, potential, and motility in living human skin fibroblasts. *Cytometry A* 69A: 1–12
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didilis V, Gatter KC, Harris AL (2003) Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* 89: 877–885
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Simopoulos C, Sivridis E (2005) Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* 5: 25–30
- Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV (2010) Inhibition of lactate dehydrogenase a induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2037–2042
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30: 923–930
- Liberti MV, Locasale JW (2016) The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci* 41: 211–218
- Liu X, Cooper DE, Cluntun AA, Warmoes MO, Zhao S, Reid MA, Liu J, Lund PJ, Lopes M, Garcia BA et al (2018) Acetate production from glucose and coupling to mitochondrial metabolism in mammals. *Cell* 175: 502–513.e13
- Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, Hawkins C, Ng HK, Pfister SM, Reifenberger G et al (2021) The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol* 23: 1231–1251

- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15: 55. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- MacDonald MJ (1995) Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. *J Biol Chem* 270: 20051–20058
- Meiser J, Schuster A, Pietzke M, Vande Voorde J, Athineos D, Oizel K, Burgos-Barragan G, Wit N, Dhayade S, Morton JP et al (2018) Increased formate overflow is a hallmark of oxidative cancer. *Nat Commun* 9: 1368
- Millard P, Letisse F, Sokol S, Portais J-C (2012) IsoCor: correcting MS data in isotope labeling experiments. *Bioinformatics* 28: 1294–1296
- Minami N, Tanaka K, Sasayama T, Kohmura E, Saya H, Sampetean O (2021) Lactate reprograms energy and lipid metabolism in glucose-deprived oxidative glioma stem cells. *Metabolites* 11: 325
- Müller S, Kohanbash G, Liu SJ, Alvarado B, Carrera D, Bhaduri A, Watchmaker PB, Yagnik G, Di Lullo E, Malatesta M et al (2017) Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome Biol* 18: 234
- Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, Richman AR, Silverbush D, Shaw ML, Hebert CM et al (2019) An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma. *Cell* 178: 835–849.e21
- Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW (2002) The key role of Anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* 277: 30409–30412
- Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, Stella N, Magistretti PJ (1998) Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci* 20: 291–299. <https://doi.org/10.1159/000017324>
- Ravi VM, Will P, Kueckelhaus J, Sun N, Joseph K, Salié H, Vollmer L, Kuliesiute U, von Ehr J, Benotmane JK et al (2022) Spatially resolved multi-omics deciphers bidirectional tumor-host interdependence in glioblastoma. *Cancer Cell* 40: 639–655.e13
- Rizwan A, Serganova I, Khanin R, Karabeber H, Ni X, Thakur S, Zakian KL, Blasberg R, Koutcher JA (2013) Relationships between LDH-A, lactate and metastases in 4T1 breast tumors. *Clin Cancer Res* 19: 5158–5169
- Sada N, Lee S, Katsu T, Otsuki T, Inoue T (2015) Targeting LDH enzymes with a stiripentol analog to treat epilepsy. *Science* 347: 1362–1367
- Sakadžić S, Roussakis E, Yaseen MA, Mandeville ET, Srinivasan VJ, Arai K, Ruvinskaya S, Devor A, Lo EH, Vinogradov SA et al (2010) Two-photon high-resolution measurement of partial pressure of oxygen in cerebral vasculature and tissue. *Nat Methods* 7: 755–759
- San Martín A, Ceballos S, Ruminot I, Lerchundi R, Frommer WB, Barros LF (2013) A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. *PLoS One* 8: e57712
- Scherer HJ (1940) The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain* 63: 1–35
- Seliger C, Leukel P, Moeckel S, Jachnik B, Lottaz C, Kreutz M, Brawanski A, Proescholdt M, Bogdahn U, Bosserhoff A et al (2013) Lactate-modulated induction of THBS-1 activates transforming growth factor (TGF)- β 2 and migration of glioma cells in vitro. *PLoS One* 8: e78935
- Sheng SL, Liu JJ, Dai YH, Sun XG, Xiong XP, Huang G (2012) Knockdown of lactate dehydrogenase a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *FEBS J* 279: 3898–3910
- Sonveaux P, Copetti T, De Saedeleer CJ, Végran F, Verrax J, Kennedy KM, Moon EJ, Dhup S, Danhier P, Frérart F et al (2012) Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One* 7: e33418
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U et al (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987–996
- Talasila KM, Røslund GV, Hagland HR, Eskilsson E, Flønes IH, Fritah S, Azuaje F, Atai N, Harter PN, Mittelbronn M et al (2017) The angiogenic switch leads to a metabolic shift in human glioblastoma. *Neuro Oncol* 19: 383–393
- Végran F, Boidot R, Michiels C, Sonveaux P, Feron O (2011) Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF- κ B/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res* 71: 2550–2560
- Vollmann-Zwerenz A, Leidgens V, Feliciello G, Klein CA, Hau P (2020) Tumor cell invasion in glioblastoma. *Int J Mol Sci* 21: 1932
- Wang J, Miletic H, Sakariassen PØ, Huszthy PC, Jacobsen H, Brekkå N, Li X, Zhao P, Mørk S, Chekenya M et al (2009) A reproducible brain tumour model established from human glioblastoma biopsies. *BMC Cancer* 13: 1–13
- Wang L, Wang S, Li W (2012) RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics* 28: 2184–2185
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309–314
- Wingett SW, Andrews S (2018) FastQ screen: a tool for multi-genome mapping and quality control. *FIGO Res* 7: 1338
- Xie H, Hanai J, Ren J, Kats L, Burgess K, Bhargava P, Signoretti S, Billiard J, Duffy KJ, Grant A et al (2014) Targeting lactate dehydrogenase-a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. *Cell Metab* 19: 795–809
- Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y (2012) clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 16: 284–287
- Ždravlević M, Brand A, Di Ianni L, Dettmer K, Reinders J, Singer K, Peter K, Schnell A, Bruss C, Decking S-M et al (2018) Double genetic disruption of lactate dehydrogenases a and B is required to ablate the 'Warburg effect' restricting tumor growth to oxidative metabolism. *J Biol Chem* 293: 15947–15961



License: This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles publiés dans des journaux scientifiques :

- Guyon J, Fernandez-Moncada I*, **Larrieu CM***, Bouchez CL*, Pagano Zottola AC*, Galvis J, Chouleur T, Burban A, Joseph K, Ravi VM, Espedal H, Røsland GV, Daher B, Barre A, Dartigues B, Karkar S, Rudewicz J, Romero-Garmendia I, Klink B, Grützmann K, Derieppe MA, Molinié T, Obad N, Léon C, Seano G, Miletic H, Heiland DH, Marsicano G, Nikolski M, Bjerkvig R, Bikfalvi A, Daubon T. **Lactate dehydrogenases promote glioblastoma growth and invasion via a metabolic symbiosis.** EMBO Mol Med. 2022 Dec 7;14(12):e15343. doi: 10.15252/emmm.202115343. Epub 2022 Oct 24. PMID: 36278433; PMCID: - PMC9728051.
- **Larrieu CM**, Storevik S, Guyon J, Pagano Zottola AC, Bouchez CL, Derieppe MA, Tan TZ, Miletic H, Lorens J, Tronstad KJ, Daubon T, Røsland GV. **Refining the Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinases in Glioblastoma Development.** Cancers (Basel). 2022 Aug 2;14(15):3769. doi: 10.3390/cancers14153769. PMID: 35954433; PMCID: PMC9367285.
- Moubarak MM, Pagano Zottola AC, **Larrieu CM**, Cuvellier S, Daubon T, Martin OCB. **Exploring the multifaceted role of NRF2 in brain physiology and cancer: A comprehensive review.** Neurooncol Adv. 2023 Dec 23;6(1):vdad160. doi: 10.1093/oaajnl/vdad160. PMID: 38221979; PMCID: PMC10785770.
- Atehortua Martinez LA, Curis E, Mekdad N, **Larrieu C**, Courtin C, Jourdren L, Blugeon C, Laplanche JL, Megarbane B, Marie-Claire C, Benturquia N. **Individual differences in cocaine-induced conditioned place preference in male rats: Behavioral and transcriptomic evidence.** J Psychopharmacol. 2022 Oct;36(10):1161-1175. doi: 10.1177/02698811221123047. Epub 2022 Sep 19. PMID: 36121009; PMCID: PMC9548661. (*Travaux relatifs à ma thèse d'exercice pour l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie*).

Communications orales :

- Claire Larrieu, Role of lactate metabolism in glioblastoma development and relapse. MetaBoDay, Bordeaux, 2023 – **Prix de la meilleure présentation orale (PhD Student)**

Posters :

- Role of lactate metabolism in glioblastoma development and relapse - Métabolisme & Cancer, Nice, 2023.
- Refining the role of pyruvate dehydrogenase kinases (PDHKs) in glioblastoma development - 4th SUNRiSE Meeting (Solid Tumor Cancer Stem Cell) : Stem Cells and Cancer, Paris, juin 2022
- Targeting pyruvate dehydrogenase kinases : Impact on glioblastoma progression - 21ème Congrès du Groupe français de Bioénergétique (GFB), Bordeaux, 2021

ABSTRACT

Metabolic adaptations sustaining glioblastoma development and relapse - study of the role of lactate metabolism

Glioblastoma (GB) is the most frequent and most aggressive brain cancer in adult. Additionally to strong proliferative and infiltrative capacities responsible for bad prognosis and frequent relapse, GB cells also exhibit high metabolic plasticity.

Depending on their location, their microenvironment or their energetic needs, GB cells are able to switch from a glycolytic metabolism, producing pyruvate and lactate, to an oxidative one. In fact, glycolytic and oxidative cells live side by side in the tumor and form a metabolic symbiosis supporting survival, progression and resistance to treatment of these malignant cells.

Our work first confirms the establishment of this metabolic symbiosis in GB. It is based on a precise metabolic architecture between a glycolytic hypoxic tumor mass, expressing markers such as LDHA, and an invasive population expressing in contrast oxidative driven markers. On the model of the “Astrocyte-Neuron lactate shuttle” identified in physiological condition, our work shed light on lactate exchanges between tumor central and invasive cell population, actively promoting aggressiveness of GB.

Disturbing this intratumoral lactate symbiosis, by blocking directly (LDHs) or indirectly (PDHKs) the actors of this pathway, has shown encouraging results. Indeed, genetic or pharmacological disruption of the lactate pathway in a GB stem-like cell model derived from patients altered tumor progression *in vitro* and *in vivo*.

Diagnosis of GB patients is often made in late stages, when neurological manifestation appears, due to an already massive and invasive tumor. Therapy initiation is then urgent and surgical resection, when it is possible, is usually the first step of therapeutic protocol in GB patients. Yet, invasive cells that escape resection invariably switch towards a proliferative phenotype and grow new tumors.

Traumatic and invasive act for the patient, tumor surgical excision is also a huge disturbance for the tumor itself by completely disorganizing tumor metabolic symbiosis. Indeed, tumor resection, i.e. removal of a huge lactate-producing hub, induces lactate concentration fluctuation in the brain and, more importantly, in the remaining post-resection cells. By using *in vitro* cellular models, we show that tumor growth is tightly regulated by redox metabolism and ROS production stimulated by lactate fluctuations. We also developed an *in vivo* mouse resection model to study these metabolic dysregulations with a preserved postoperative tumor microenvironment. RNA-Seq analysis of laser capture microdissected areas from brain of mice implanted with GB revealed a reshaping of metabolism in relapse-initiating cells. These modulations, further confirmed at protein level by immunohistochemistry, suggest the central role of lactate metabolism in the relapse process. Based on the previous results, we are currently testing antioxidant therapy as pre- and post-surgical treatment to prevent GB tumor recurrence.

Thus, lactate metabolism and exchange play a pivotal role in the development and relapse of GB. Targeting this pathway represents an intriguing approach in GB therapy.

Key words : Glioblastoma, Metabolism, Lactate, GB recurrence, Tumor resection

